

# Stress hos rognkjeks etter transport og overføring til merd

Målet med denne undersøkelsen er å få mer kunnskap om påvirkningene fra transport ved utsett i merd og skaffe bedre forståelse for hvilke forhold som påvirker fiskevelferd og overlevelse for rognkjeks i merd. I tillegg til kartlegging av primær og sekundær stressrespons ble nye metoder for vurdering av slimcellestatus (QuantiDoc) benyttet som mål på endringer i toleranse overfor miljøendringer. Prosjektet ble gjennomført av Akvaplan-niva og finansiert gjennom FHF-prosjekt 901426.

Thor Jonassen<sup>1</sup>, Karin Pittman<sup>2</sup>, Atle Foss<sup>1</sup>, og Mette . Remen<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Akvaplan-niva, <sup>2</sup>Institutt for biovitenskap, Universitetet i Bergen  
thor@akvaplan.niva.no

## Om prosjektet

Prosjektnummer: 901426 - Toleranse for transportstress og miljøoverganger hos berggyllt og rognkjeks

Varighet 01.12.2017 til 20.12.2018

Hovedmål var å etablere en bedre kunnskapsbasis for sikring av fiskevelferd under transport og overføring av berggyllt og rognkjeks til sjø, basert på undersøkelser av transportforhold i felt og kontrollerte forsøk.

En har liten kunnskap om miljøtoleranse hos berggyllt og rognkjeks spesielt i forbindelse med transport og overføring til merd. I tillegg har en mistanke om at økt dødelighet i sjø etter transport kan være relatert til miljømessige belastninger knyttet til selve transporten eller store miljøsprang fra kar på land til laksemerder i sjø.

Kontrollerte simulerte transportforsøk med rognkjeks under forskjellige miljøbetingelser viste relativt stabil vannkvalitet under transport, men at økt tetthet førte til økt stress tidlig i transporten og at stressnivået ble redusert med økende transporttid. Økt temperatur fra 8 til 12 °C påvirket ikke stressnivået, men større temperatursprang og temperaturoppgang ble ikke undersøkt.

For berggyllt finnes det generelt lite kunnskap på dette området til tross for at både produksjonen og transport forventes å øke. Det er derfor et stort behov for utvikling av kunnskap om transport og miljøtoleranse også hos berggyllt for å sikre fiskevelferd under transport og redusere risikoen for dødelighet etter utsett i merd.

## Gjennomføring

Utvikling av stress hos rognkjeks ble undersøkt gjennom fire kommersielle transportere av rognkjeks fra kar til merd, samt en uke etter overføring til merd. De to første transportene var direkte transportere med bil (T1 og T2) og de to siste direktetransportere med hurtiggående brønnbåt (T3 og T4). For hver gruppe ble seks blodprøver tatt før transport, etter direktetransporten (i brønn like før overføring til merd) og etter en uke i merd for måling av kortisol (primærstress), ioner og pH fra blodplasma (sekundært stress). I tillegg ble det tatt ut 5-6 fisk før transport og etter en uke i merd for analysing av slimcellestatus i skinn (QuantiDoc-metoden). Beskrivelse av prøvetakings- og analysemetodene er gitt i vedlegg 1.

Uttak av fisk fra kar eller tanker på bil og båt skjedde direkte med hån og fisken ble

avlivet med overdose bedøvelse (Finquel, 200 mg/l) før prøvetaking. Det tok ca. 15-45 sekunder fra fisken ble tatt ut til den var død. I merd skjedde uttak av fisk med hån fra skjul plassert ved merdkant.

En oppsummering av forholdene under de fire transportene og i merd etter transport er gitt i **Tabell 1**.

## Resultater og diskusjon

Plasmakortisol som mål på primær stressrespons ble målt på rognkjeks i de fire transportgruppene før transport, like etter transport (fra transporttank før overføring til merd) og i merd en uke etter transport. Resultatene er vist i (**Figur 1**). Ingen av gruppene hadde innlagt sekundærtransport, men ble transportert med bil (T1 og T2) eller brønnbåt (T3 og T4) direkte til merd.

Uavhengig av transportgruppe var plasmakortisol signifikant høyere etter transport sammenlignet med før transport og etter en uke i merd ( $p < 0,001$ ), og det var spesielt T3 og T4 som påvirket denne trenden ( $p < 0,05$ ).

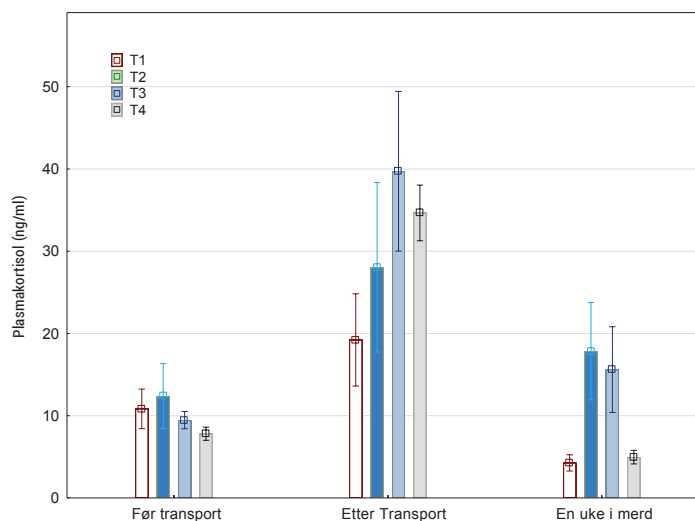
Det gjennomsnittlige stressnivået etter primærtransport er kun halvparten av gjennomsnittlig nivå fra 15 kommersielle transporter av rognkjeks rapportert i et tidligere prosjekt og en tredjedel av nivåer målt etter sekundærtransport hvor fisken ble omlasting fra bil til båt. Dette tyder på at transportmetodene og prosedyrene for håndtering av fisk i forbindelse med transport har blitt mer skånsomme og tilpasset arten.

Det var ingen signifikant forskjell mellom transportgruppene på de forskjellige måletidspunktene ( $p < 0,001$ ), men en klar tendens til høyere stressnivå etter transport i gruppene transportert med båt (T3 og T4) sammenlignet med gruppene transportert med bil (T1 og T2).

Båttransportene var av kortere varighet enn biltransportene (**Tabell 1**). T1 hadde lengst transporttid av alle gruppene og lavest stressnivå etter transport. Både på laks og rognkjeks er det tidligere vist at fiskens mulighet til å stresse ned etter en håndtering og miljøovergang, f.eks. opplasting til transport, øker med

**Tabell 1. Transportforhold for fire forskjellige transporter av rognkjeks.**

Transportbeingelser, rognkjeks	T1, 17/4	T2, 19/4	T3, 6/12	T4, 6/12
Transportmetode	Bil	Bil	Brønnbåt	Brønnbåt
Transporttid (timer)	14	10	6	5
Fiskestørrelse (g)	30	31	40	38
Sultperiode (dager)	1,5	1,5	1,5	1,5
Antall fisk transportert	27 000	21 000	48 000	52 000
Antall fiskekar/brønner	12	12	3	3
Kastørrelse (m <sup>3</sup> )	2	2	3 stk (4,6 og 13 m <sup>3</sup> )	3 stk (4,6 og 13 m <sup>3</sup> )
Fisketetthet under transport (m <sup>3</sup> )	34	27	92	88
<b>Vannkvalitet under transport</b>				
O2-start	120	120	103	89
O2-slutt	104	107	108	98
pH-start	8,12	8,1	7,4	7,33
pH-slutt	7,43	7,36	7,66	7,75
Temp °C start	7	7	8,2	8,2
Temp °C slutt	7,2	7,1	8,7	8,5
<b>Forhold i merd etter overføring</b>				
Temp i merd ved levering (°C)	7,5	5,7	8,7	8,5
Merdstørrelse	160 m	200 m	200 m	160 m
Antall laks	176 100	125 000	199 000	199 000
Generasjon laks	18G, 82 g	17G	18G	18G
Blanding av leppefisk totalt	ja	ja	ja	ja
% innblanding rensefisk totalt	14	15	11,5	13
Antall rognkjeks	13 500	10 500	14 100	14 200
% innblanding rognkjeks	7,7	8,4	7,1	7,2
% dødelighet etter 7 dager	0	0	0,5	0,5
% dødelighet etter ca. 3 mnd	1,2%	34%	45%	11%
% dødelighet etter 7 mnd	14%	40%	-	-



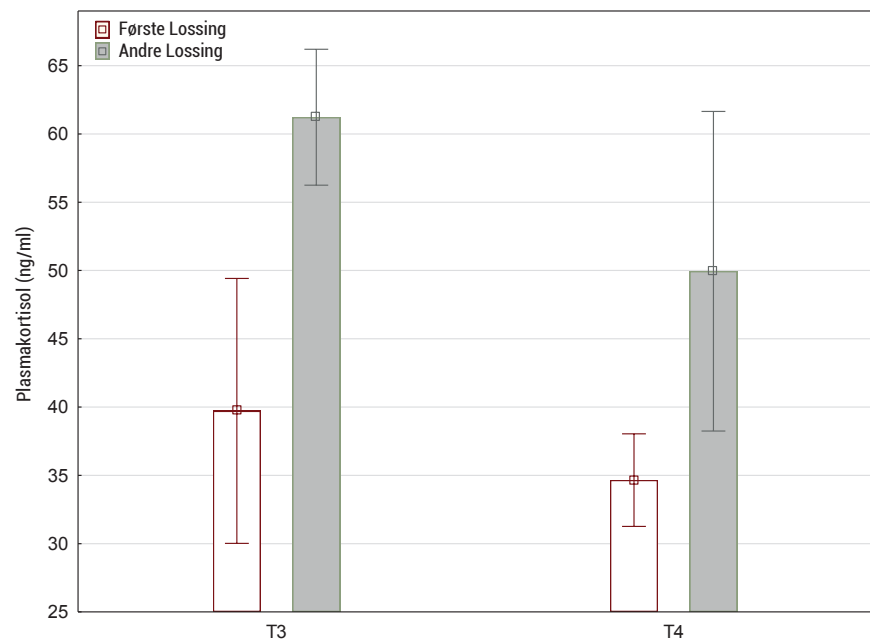
**Figur 1.** Utvikling i gjennomsnittlig stressnivå (plasmakortisol) på forskjellige stadier under transport for fire transporter av rognkjeks. Vertikale linjer på søylene viser standard feil (SEM).

transporttiden og gjør fisken bedre i stand til å møte nye stressorer etter overføring til merd.

Selv om stressnivåene gjennom transporten og etter utsett var relativt lave, var det forhøyede nivåer i T2 og T3 sammenlignet med utgangsnivåene før transport, som tyder på kronisk stress. Kronisk stress reduserer bl.a. fiskens

motstandsevne mot sykdommer og evne til å motstå additivt stress, og det er tidligere vist at transportstress påvirker overlevelsen hos atlantisk laks.

Plasmakortisol målt etter utsett i merd treffer bra som prediktor for den høye dødeligheten som kommer senere i T2 og T3 (ca. 3 mnd. i sjø, Tabell 1), men ikke med dødelighet etter 1 uke, som var lav



**Figur 2.** Stressutvikling hos rognkjeks gjennom to fortløpende lossinger fra samme brønn under to forskjellige brønnbåttransporter (T3 og T4). Vertikale linjer på søylene indikerer standard feil (SEM).

**Tabell 2. Rapporterte normalverdier av ionesammensetningen i blodplasma hos fisk (gjengitt fra Noble m.fl. 2018) sammenlignet med data fra ustresset (fra kar før transport) og stresset (etter transport) rognkjeks.**

Lonekonsentrasjoner (mmol/l)	K+	Na+	Cl-
Sjøvann	9,3	513	439
Rognkjeks før transport (ustresset)	2,93-3,99	142-194	126-136
Rognkjeks etter transport (ustresset)	1,49-4,47	179-200	125-147
Marin fisk	5,1	196	180
Ferskvannsfisk	2,9	125	130
Laks i sjøvann	3,4	140-175	135-160
Laks i ferskvann	2,9	130-150	111-135

for alle gruppene. Det er vanskelig å si om dødeligheten etter utsett i merd er en lokalitetseffekt eller noe som er påvirket av forhold i yngelfasen.

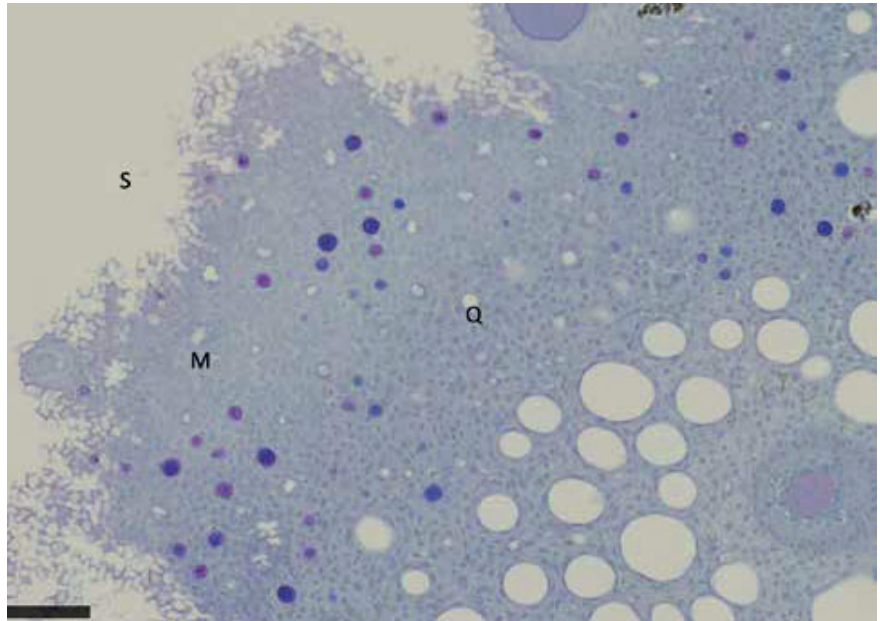
Ser man dødelighetsutviklingen i sammenheng med miljøforholdene, hvor lokalitetene T2 og T3 ble satt ut var strømsterke, og driftsforhold, hvor økt dødelighet og utvikling av sår ble observert etter spyling av nøter og håndtering i forbindelse med avlusning, forklarer sannsynligvis mekaniske skader (f.eks. skrubbsår) og driftsbetinget additivt stress en stor del av forskjellene i dødelighet. Systematiske observasjoner av rognkjeks i merd viser at 25 - 70 % av rognkjeksen kan være plassert mot notveggen, mens helt ned i 25 % kan være observert pelagisk eller hvilende (Aas 2018). Plassering langs notveggen gjør fisken svært eksponert for sårskader fra spyling og gnagsår fra nota ved bølger og sterk strøm. Maksimal svømmekapasitet hos rognkjeks på ca. 300g ligger mellom 25-34 cm/s, avhengig av temperatur, og selv om rognkjeksen kan holde seg fast på et fast substrat under strømhastigheter på over 80 cm/s i noen minutter, klarer den ikke feste seg igjen ved så høye hastigheter. Dette viser hvor krevende de tre lokalitetene med høy strømhastighet (T1, T2 og T3) er for rognkjeks.

## pH og osmotisk stress

Det var ingen entydig endringer i pH gjennom transportforløpet og etter utsett, med unntak av T1, og indikerer generelt gode transportforhold og liten aktivitetsøkning etter utsett. Lokaliteten T1 ble satt ut på betegnes som spesielt strømtsatt, hvor redusert pH kan være indikasjon på økt svømmeaktivitet for denne gruppen.

Det var en generell trend med økt osmotisk stress gjennom transportforløpet for rognkjeks indikert med en økt konsentrasjonen av  $\text{Na}^+$  og  $\text{Cl}^-$  -ioner i plasma etter transport for alle gruppene sammenlignet med før transport, og kun en liten reduksjon etter en uke i merd.

Osmotisk stress er tidligere målt under transport av rognkjeks som osmolalitet (mengde oppløste partikler per kg væske) i blodplasma, og viste signifikant



**Tverrsnitt av hud hos rognkjeks med slimceller** (små celler, farget mørkeblå, M) og Q-celler (store celler, farget hvit-lyseblå) samt frynsete overflate celler (S).

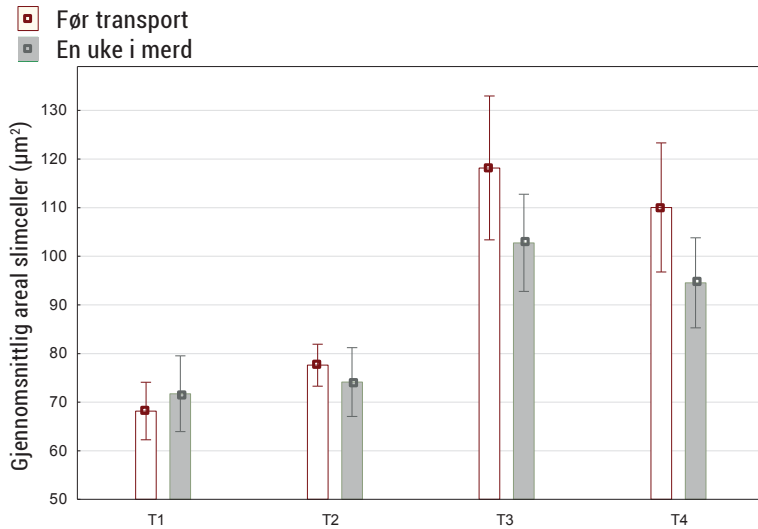
høyere verdier etter sekundærtransport sammenlignet med før transport og etter primærtransport. Fravær av slike klare treder i denne undersøkelsen kan skyldes det generelt lavere stressnivået på fisken. Selv om man ser en økning i plasmaioner utover i transportforløpet, spesielt for  $\text{Na}^+$  og  $\text{Cl}^-$ , som indikerer økt osmotisk belastning, er nivåene av plasmaionene i rognkjeks jevnt over lavere enn hos annen marin fisk, og på nivå med normalverdier for laks i sjøvann (Tabell 2).

Ved levering av fisk med brønnbåt blir det ofte overført fisk fra samme brønn til flere

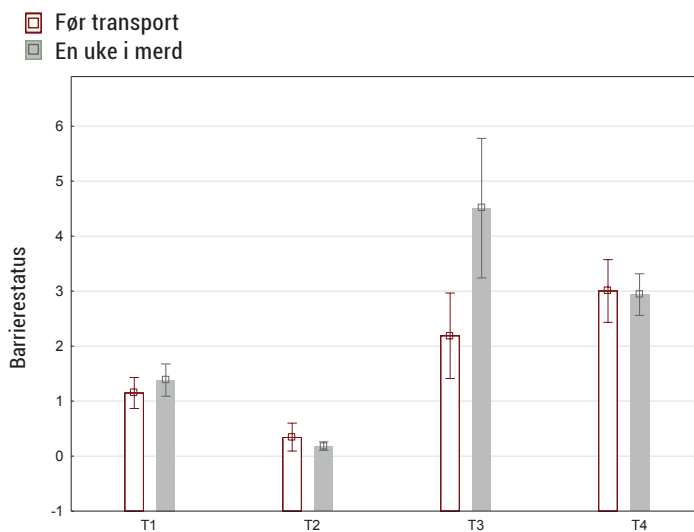
merder. Dette var tilfelle for transport T3 og T4. Her ble det tatt blodprøver av fisk like før levering til første merd og deretter like før levering til neste merd fra same brønn for å måle om lossing over lengre tid fra samme brønn ga økt stress. Tiden mellom første og siste måling (lossing) var ca. 45 min.

For begge gruppene økte gjennomsnittlig plasmakortisol signifikant fra første til andre levering (Figur 2,  $p < 0,05$ ). T3 ble lastet og losset på dagtid (start kl. 08:30, overskyet), mens T4 ble lastet og losset i mørke (start kl. 19:30). Transporttidene var

# Fish Tech



**Figur 3.** Gjennomsnittlig areal (µm<sup>2</sup>) av slimceller i hud hos rognkjeks fra fire forskjellige transportere. Vertikale linjer på søylene indikerer standard feil (SEM).



**Figur 4.** Gjennomsnittlig tetthet (%) av slimceller i hud hos rognkjeks fra fire forskjellige transportere. Vertikale linjer på søylene indikerer standard feil (SEM).

like, men tiden for opplastingen av T3 var lengre enn T4 (hhv 3,5 og 1 time).

### Skinnhelse

Skinnet og slimlaget utgjør fiskens barriere mot ytre miljø og førstelinjeforsvaret mot infeksjoner, og responderer på endringer i miljøet. Kvantitative analyser av areal (µm<sup>2</sup>) og tetthet (% dekning av huden) av slimceller i hud, samt barrierestyrke i huden som funksjon av areal og tetthet av slimceller er brukt som mål på skinnhelse

(analysert av QuantiDoc®). Metoden er dokumentert som relevant mål på velferd og helse hos laks, hvor tetthet og barrierestyrke er positivt korrelert med økende fiskevelferd og helse (robusthet overfor ytre miljø).

Rognkjeks har generelt lite slimceller på huden, og spesielt beinknutene på rygg og hode mangler slimceller og er derfor spesielt utsatt for infeksjon. Innledende tester på rognkjeks har vist reduksjon av arealet til slimcellene ved økt stress, men spesielt interessant for rognkjeks er de nyoppdagete cellene kalt Q-celler, som er svært framtreddende i huden og viser en klar respons på stress og miljøendringer, spesielt i forhold til tettheten av Q-celler (Jonassen m.fl., upubliserte data). Disse cellene er opptil 200 ganger større enn slimcellene og har over 10 ganger høyere tetthet sammenlignet med slimceller. Cellene inneholder ikke glycoproteiner, collagener eller fett slik som vanlige hudceller, og man skimter en indre struktur i disse runde celler. Det ser ut som disse Q-cellene, og ikke slimceller, er det bærende førstelinjeforsvaret hos rognkjeks (Karin Pittman, pers. med.).

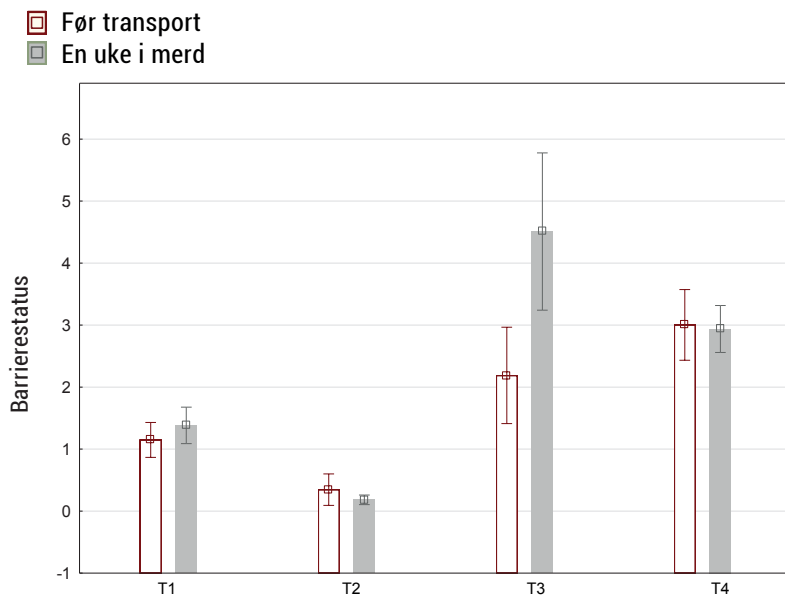
Rognkjeksens hudoverflate er også uvanlig, karakterisert med en frynsete overflate som gir en forøket spesifikk overflate sammenlignet med hud- og slimceller som gjerne er mer **avrundede**. Utviklingen av både slimceller og Q-celler er i dette prosjektet analysert på fisk før transport og etter en uke i sjø som indikator på respons på stress og miljøendringer (**Bilde 1**).

For slimceller i huden var gjennomsnittlig celleareal (**Figur 3**), tetthet (**Figur 4**) og barrierestyrke (**Figur 5**) høyere for gruppene T3 og T4 sammenlignet med T1 og T2 både før og etter transport. Det var ingen systematisk endring i disse parameterne etter utsett i merd. Nivåforskjellene mellom gruppene kan skyldes fiskebakgrunn eller anleggsspesifikke forskjeller, men det er også spekulert i om sesong kan spille inn. Fisk fra T1 og T2 ble transportert med bil fra samme anlegg og ble satt ut samtidig (1 dag mellomrom) på våren, mens T3 og T4 ble satt ut i desember og transportert med samme båt fra samme anlegg og satt ut samtidig (10 timers mellomrom) i samme fjord (**Tabell 1**).

Som for slimceller var det også for Q-celler nivåforskjeller mellom gruppene T1/T2 og T3/T4 i gjennomsnittlig celleareal og tetthet (**Figur 6**), som kan være relatert til fiskebakgrunn eller sesong.

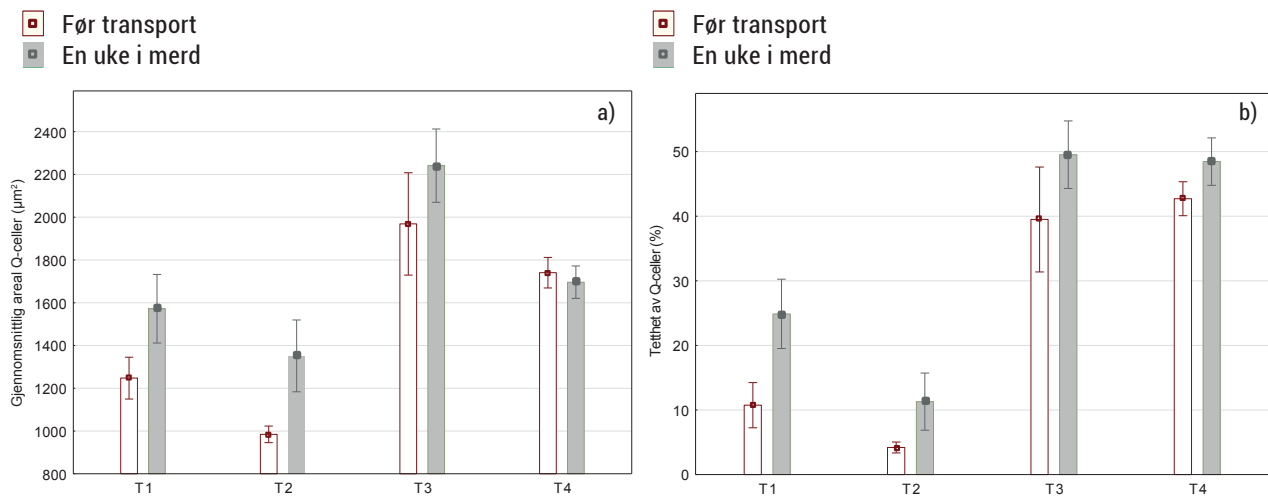
For Q-celler var det derimot en mer systematisk endring etter utsett i merd, hvor tettheten av Q-cellene generelt økte etter utsett i merd (**Figur 6b**,  $p < 0,05$ ). Utvikling i arealet av Q-cellene (**Figur 6a**) økte også etter overføring til merd, men kun for gruppene med samme opphav satt ut om våren (T1 og T2,  $p < 0,05$ ).

Dette indikerer at morfometriske analyser av utviklingen i Q-celler hos rognkjeks kan være en nyttig responsvariabel i forhold til miljø, men at den er svært kontekstspesifikk hvor bl.a. fiskens bakgrunn (miljø, genetikk, ernæring osv.) sannsynligvis vil påvirke miljøresponsen. Det ble gjort regresjonsanalyser for å se på sammenhengen mellom skinnhelse og variasjon i plasmakortisol, pH og



**Figur 5.** Gjennomsnittlig areal av Q-celler (a) og tetthet av Q-celler (b) i hud hos rognkjeks fra fire forskjellige transportere. Vertikale linjer på søylene indikerer standard feil (SEM).

# HighComp



**Figur 6.** Gjennomsnittlig areal av Q-celler (a) og tetthet av Q-celler (b) i hud hos rognkjeks fra fire forskjellige transportert. Vertikale linjer på søylene indikerer standard feil (SEM).

plasmaioner (Tabell 3). Plasmakortisol og pH viste ingen samvariasjon med noen av målene på skinnhelse.

For alle målene for skinnhelse (areal og tetthet av slimceller og Q-celler, samt barrierestatus for slimceller) var det en signifikant positiv lineær sammenheng med konsentrasjonen av natriumioner (Na<sup>+</sup>). For Cl<sup>-</sup> var det en tilsvarende negativ sammenheng med areal av slimceller og tettheten av Q-celler. Areal og tetthet av slimceller økte også med økende konsentrasjon av K<sup>+</sup>-ioner. Dette tyder på en sammenheng mellom skinnhelse og ionebalanse (osmoregulering).

Et intakt slimlag fungerer som en fysisk barriere som i sjøvann reduserer dehydrering og bidrar til å opprettholde osmotisk balanse. Hos laks er det for eksempel vist at innblanding av 20% sjøvann under smoltifisering ga redusert antall slimceller, redusert tykkelse på epiteliet og redusert slimkvalitet, og medførte økt infeksjon med *Moritella viscosa* etter overføring til sjø.

Sammenlignet med primære stressparametere som kortisol, som fanger opp et øyeblikksbilde, er helse- og velferdsbaserte parametere som f.eks. kvantitative mål på skinnhelse mer robuste siden de akkumulerer negative effekter av stressfaktorer over tid. Slike parametere er også mer direkte relatert til

fiskens forsvarmekanismer (sekundære stressresponser), som indikatorer på immunforsvar og barrierestyrke i forhold til ytre miljø. På den måten er de gode indikatorer på funksjonsforstyrrelser og redusert fiskevelferd, men trenger videre uttesting på rognkjeks for å kunne tolkes i forhold til respons på spesifikke miljø- og stressfaktorer.

### Oppsummering og koplinger til miljø og drift

Selve om det ikke var en sammenheng mellom stressnivået på rognkjeks etter transport og dødelighet etter utsett i merd kan transportstresset ha påvirket dødelighetsutviklingen på de forskjellige transportgruppene undersøkt her, slik det er observert på andre arter. Tatt i betraktning de moderate stressnivåene etter transport sammenlignet med tidligere observasjoner fra transportert rognkjeks og tilsvarende beskjedne sekundære stressresponser, hadde fisken et relativt godt utgangspunkt for å møte nye miljøforhold og regulere stress etter utsett i sjø.

Likevel var det nivåer av plasmakortisol for to av transportgruppene (T2 og T3) en uke etter utsett i sjø som indikerte kronisk stress, og det var en betydelig høyere dødelighet i disse gruppene (T2 og T3) 3 mnd. etter utsett. Selv om transportstresset



**Tabell 3. Regresjonskoeffisient (R) og p-verdier (p) fra regresjonsanalyser mellom skinnhelse (slimceller og Q-celler) og blodfysiologi (analyser av kortisol, pH og ioner fra plasma) hos rognkjeks.**

Rognkjeks	Kort			pH			Na+			Cl-			K+		
	b	R <sup>2</sup>	P	b	R <sup>2</sup>	P	b	R <sup>2</sup>	P	b	R <sup>2</sup>	P	b	R <sup>2</sup>	P
n=42															
Areal slimceller	-0,10	0,01	0,53	0,12	0,01	0,47	0,34	0,12	< 0,05	-0,37	0,14	< 0,05	0,35	0,12	< 0,05
Celletetthet slimceller	-0,17	0,03	0,28	0,01	0,00	0,94	0,39	0,15	< 0,05	-0,29	0,09	0,070	0,33	0,11	< 0,05
Barrierestatus slimceller	-0,21	0,04	0,18	0,00	0,00	0,97	0,43	0,18	< 0,05	-0,30	0,09	0,060	0,30	0,09	0,060
Areal Q-celler	-0,11	0,01	0,50	-0,14	0,02	0,36	0,49	0,24	< 0,01	-0,23	0,05	0,136	0,23	0,05	0,134
Tetthet Q-celler	-0,25	0,06	0,10	-0,06	0,00	0,69	0,57	0,33	< 0,01	-0,43	0,19	< 0,05	0,29	0,08	0,060

vil være en del av et additivt stress, peker likevel tilbakemeldingene fra oppdrettere i større grad mot operasjonelle forhold (spyling av nøter) og spesielle miljøsituasjoner i merden (kraftig strøm) som primære årsakssammenhenger til den observerte dødeligheten enn mot transportbetingelsene og fiskekvalitet. Dødfisken var også preget av sårskader i perioden(e) med høy dødelighet.

Det var forskjeller mellom lokalitetene i forhold til eksponering for strøm og bølger under dårlige værforhold, men det var ikke nødvendigvis en klar kopling til disse forholdene alene (f. eks. T1 og T2 som begge var strømekspontert). Samvirkende faktorer som f.eks. skjul (med varierende beskyttelse (skjerming) eller heftemulighet ved sterkt strøm) kan påvirke betydningen av sterk strøm på f.eks. overlevelse.

Selv om rognkjeks har god toleranse for relativt høye temperaturer og regulerer stress effektivt ved 14 °C, har temperatur betydning både isolert sett og en forsterket betydning spesielt ved høye strømhastighet siden energiforbruket for svømming øker med økende temperatur, og vil kunne gi kronisk stress, avmagring og taperfisk, eventuelt utmattet fisk som ender i notveggen og pådrar seg sårskader som åpner for infeksjoner og alvorlig osmotisk stress pga. vanntap gjennom huden. Forekomst av taperfisk var spesielt rapportert i grupper med høy dødelighet

sommerstid på strømsterke lokaliteter (spesielt gruppe T2).

Den mest tydelige koplingen til høy dødelighet rapportert fra oppdretter var operasjonelle forhold som spyling av nøter og håndtering i forbindelse med avlusning av laks. Det var også rapportert at rognkjeks satt ut like før avlusning, og som dermed gjennomgikk hyppig håndtering og annet stress tidlig etter utsett, mistet appetitt, ble avmagret og inaktive og til slutt døde. Forståelsen for rensefisk som forebyggende tiltak mot lus, og ikke behandling, er viktig.

I tillegg viste tilbakemeldingene fra oppdretter at bruk av rognkjeks (og sannsynligvis rensefisk generelt) i kombinasjon med andre tiltak (behandling) mot lus dårlig lar seg kombinere og medfører uakseptabel fiskevelferd. Et eksempel var da rognkjeks ble satt ut ved høye lusetall i forsøk på å dempe den videre utviklingen, men hvor det endte opp med avlusning kort tid etter. Strategien bør derfor være å unngå utsett av rensefisk og heller starte utfisking av rensefisk i perioder hvor lusepresset øker og sannsynligheten for at avlusninger må gjennomføres øker, og heller prioritere tidlig utsett av rensefisk når lusetallene er stabilt lave •