

Velferd hos rensefisk – operative velferdsindikatorer (OVI) - RENSVEL

Åsa Maria Espmark, Chris Noble, Jelena Kolarevic, Gerd Marit Berge, Grete Hansen Aas, Stig Tuene, Martin Haugmo Iversen, Heidrun Wergeland, Lill-Heidi Johansen, Erik Burgerhout, Bjarne Gjerde og Ingrid Lein





Nofima er et næringsrettet forskningsinstitutt som driver forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien.

Nofima har om lag 370 ansatte.

Hovedkontoret er i Tromsø, og forskningsvirksomheten foregår på fem ulike steder: Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra og Tromsø

Hovedkontor Tromsø:

Muninbakken 9–13
Postboks 6122 Langnes
NO-9291 Tromsø

Ås:

Osloveien 1
Postboks 210
NO-1431 ÅS

Stavanger:

Måltidets hus, Richard Johnsensgate 4
Postboks 8034
NO-4068 Stavanger

Bergen:

Kjerreidviken 16
Postboks 1425 Oasen
NO-5844 Bergen

Sunndalsøra:

Sjølsengvegen 22
NO-6600 Sunndalsøra

Alta:

Kunnskapsparken, Markedsgata 3
NO-9510 Alta

Felles kontaktinformasjon:

Tlf: 02140
E-post: post@nofima.no
Internett: www.nofima.no

Foretaksnr.:

NO 989 278 835 MVA



Creative commons gjelder når ikke annet er oppgitt

Rapport

Tittel: Velferd hos rensefisk – operative velferdsindikatorer (OVI) - RENSVEL	ISBN 978-82-8296-589-7 (pdf) ISSN 1890-579X
Title: Welfare in cleaner fish – operational welfare indicators (OWI) - RENSVEL	Rapportnr.: 12/2019
Forfatter(e)/Prosjektleder: Åsa Maria Espmark, Chris Noble, Jelena Kolarevic, Gerd Marit Berge, Grete Hansen Aas (NTNU), Stig Tuene (NTNU), Martin Haugmo Iversen (Nord universitet), Heidrun Wergeland (UiB), Lill-Heidi Johansen, Erik Burgerhout, Bjarne Gjerde og Ingrid Lein	Tilgjengelighet: Åpen
Avdeling: Produksjonsbiologi	Dato: 15. mai 2019
Oppdragsgiver: Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering (FHF)	Ant. sider og vedlegg: 114 + 89
Stikkord: Operative velferdsindikatorer, rensefisk, rognkjeks, berggylt, produksjonsformer, miljøfaktorer, merd, kar, helse, immunitet, håndtering, protokoll	Oppdragsgivers ref.: FHF 901136
Sammendrag/anbefalinger: Hovedmålet med prosjektet har vært å utvikle og levere robuste og kunnskapsbaserte operative velferdsindikatorer som kan brukes for å sikre god velferd hos rensefiskartene berggylt og rognkjeks. Prosjektet har også hatt som mål å gi ny kunnskap om grenseverdier for miljøfaktorer som kan være kritiske for artenes velferd. Sammen med informasjon fra eksisterende litteratur har det blitt utarbeidet en protokoll som, i tillegg til å være en del av denne rapporten, vil bli tilbudt oppdrettere alene. I prosjektet har vi utført kontrollerte forsøk for å finne optimale forhold for oksygen, tetthet, lys og immunitetsutvikling og studert effekt av håndtering. I tillegg har vi utført feltstudier på klumping, ernæring, optimale skjul og immunitetsutvikling. Resultatene viser at rognkjeks og berggylt responderer veldig forskjellig på stress og har veldig ulike behov. De responderer også forskjellig fra hva vi er vant til å se hos laks. Rognkjeks viser liten grad av stressrespons, men tilsynelatende manglende stressrespons kan være evolusjonære tilpasninger til stress og fare. LABVler som er egnet for dokumentasjon av stress er plasmakortisol, klorid, og magnesium. Laktat er egnet som LABVI kun hos berggylt. Finneslitasje, katarakt og vekst er OVler som kan benyttes for dokumentasjon av stress hos både berggylt og rognkjeks.	
English summary/recommendation: The objectives of the RENSVEL project are to deliver robust science based knowledge on operational welfare indicators in Ballan wrasse and lumpfish. The project also aimed to provide new knowledge on potential thresholds for OWIs that may be critical for the species' welfare. A knowledge based summary of key OWIs for each species has also been developed, addressing key environmental, group and individual OWIs such as oxygen, behavior and morphological indicators such as fin damage and also LABWIs such as cortisol, chloride and magnesium.	

Forord

Det er mange som fortjener en stor takk for at alt arbeid i RENSVEL har blitt gjennomført. Med stor fare for å glemme noen, ønsker vi her å rette en stor takk til teknikere, ingeniører og brukerpartnere for hjelp under planlegging og gjennomføring av forsøk, eller stilt sine ressurser i form av fasiliteter, fisk og folk til rådighet. Videre ønsker vi å rette en stor takk til styringsgruppen for gode diskusjoner og innspill i løpet av hele prosjektperioden.

Prosjektet «Velferd hos rensefisk – operative velferdsindikatorer (OVI) – RENSVEL» er finansiert av Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering (FHF).

Innhold

1	Sammendrag	1
2	Innledning	3
2.1	Faglig bakgrunn	3
2.2	Prosjektorganisering	5
3	Problemstilling og formål	7
3.1	Redegjørelse for prosjektets effektmål	7
3.2	Redegjørelse for prosjektets resultatmål	8
4	Prosjektgjennomføring	9
4.1	Identifisering av mulige OVler for berggylt og rognkjeks	9
4.2	Produksjonsformer for rognkjeks og berggylt	10
4.3	Kritiske miljøfaktorer	21
4.3.1	Lys til berggylt og rognkjeks	21
4.3.2	Vannstrøm berggylt	31
4.3.3	Grenseverdi for oksygen hos berggylt	33
4.3.4	Tettet av fisk – rognkjeks	38
4.4	Velferd, ernæring og skjul i merd	47
4.4.1	Ernæring	48
4.4.2	Skjul og velferd i merd, berggylt og rognkjeks	55
4.5	Helse og velferd	64
4.5.1	Samarbeid med transportstress (FHF prosjekt #901158 ledet av Akvaplan-Niva)	64
4.5.2	Vaksinasjon	64
4.5.3	Effekt av håndtering, berggylt og rognkjeks	78
4.6	Utvikle protokoll med OVler	105
5	Hovedfunn	106
6	Leveranser	108
6.1	Presentasjoner	108
6.2	Publikasjoner	109
6.3	Media	110
6.4	Styringsgruppemøter	110
6.5	Studenter	110
7	Referanser	112

Vedlegg

1 Sammenheng

Med økende bruk av rensefisk i akvakultur er det behov for grunnleggende kunnskap om stress og velferd hos disse artene. For næringen vil det være viktig å ha tilgang til operative velferdsindikatorer (OVI) og kunnskap om grenseverdier for påvirkning for å få best mulig nytte av hver enkelt rensefisk som settes inn i merdene for lusekontroll.

Hovedmålet med prosjektet har vært å utvikle og levere robuste og kunnskapsbaserte operative velferdsindikatorer (OVI) som kan brukes for å sikre god velferd hos rensefiskartene berggylt (*Labrus berggylta*) og rognkjeks (*Cyclopterus lumpus* L.). Prosjektet har også hatt som mål å gi ny kunnskap om grenseverdier for miljøfaktorer som kan være kritiske for artens velferd.

Innledningsvis i prosjektet ble det laget en oversikt over OVler som har blitt brukt i de kontrollerte forsøkene og feltforsøkene som er utført. OVlene har så blitt systematisert, og sammen med informasjon fra eksisterende litteratur har det blitt utarbeidet en protokoll som, i tillegg til å være en del av denne rapporten, vil bli tilbudt oppdrettere som en isolert protokoll.

I prosjektet har vi utført kontrollerte forsøk for å finne optimale forhold for oksygen, tetthet, lys og immunitetsutvikling og studert effekt av håndtering. I tillegg har vi utført feltstudier på klumping, ernæring, optimale skjul og immunitetsutvikling. Resultatene viser at rognkjeks og berggylt responderer veldig forskjellig på stress og har veldig ulike behov. De responderer også forskjellig fra hva vi er vant til å se hos laks.

Rognkjeks viser liten grad av stressrespons, men tilsynelatende manglende stressrespons kan være evolusjonære tilpasninger til stress og fare. Våre forsøk viser at rognkjeks responderer på stress med endringer i LABVI og morfologi, selv om nivåene er lave. Berggylt viser en stressrespons som kan sammenlignes med det vi kjenner fra laks. LABVier som er egnet for dokumentasjon av stress er plasmakortisol, klorid, og magnesium, selv om artsforskjellene er store. Laktat er egnet som LABVI kun hos berggylt. Finneslitasje, katarakt og vekst er OVler som kan benyttes for dokumentasjon av velferd hos begge arter.

Selv om både rognkjeks og berggylt i våre forsøk i kar og i felt tolererer behandlingene vi gir dem godt, er overlevelsen i merd altfor lav. Det må jobbes videre med å produsere robust fisk slik at fisken overlever og har god velferd i merd.

English summary

With the increasing use of cleaner fish in aquaculture there is a need for more knowledge about the stress and welfare of these species especially as their survival, when deployed in cages, is far too low. Work must be undertaken to help produce robust, resilient fish that do well in the cages and have good welfare. A better understanding of some key Operational Welfare Indicators (OWIs) will help the industry and other stakeholders develop a good foundation for assessing the welfare of cleaner fish.

The main objectives of the RENSVEL project are to increase our science-based knowledge on some key species specific Operational Welfare Indicators (OWIs) for both Ballan wrasse (*Labrus berggylta*) and lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.). The project also aimed to provide new knowledge on potential thresholds for OWIs that may be critical for welfare of each species. A knowledge based summary of key OWIs for each species has also been developed, addressing some environmental, group and

individual OWIs such as oxygen, behaviour, morphological indicators such as fin damage and also LABWIs such as cortisol, chloride and magnesium.

Initially, the project created an overview of OWIs that have been used in previous controlled experiments and field trials. The OWIs were then systematised, and together with information from existing literature, put together into species specific fact sheets which, in addition to being part of this report, will also be available as separate documents.

In the project, we have conducted controlled experiments on oxygen saturations, density, light conditions, immunity development and the effect of handling on cleaner fish. We have also conducted field studies on clumping behaviour, nutrition, shelters/environmental enrichment and immunity development.

Some results from the RENSVEL project show that lumpfish and Ballan wrasse respond differently to a stressor and also respond differently from what we are used to seeing in salmon. Lumpfish show a limited stress response, but this apparent lack of a stress response can be an evolutionary adaptation to stress and danger. Our experiments show that lumpfish respond to stress with changes in LABWIs and some morphological OWIs, even though the response levels are low. Ballan wrasse show a stress response that is comparable to what we know in Atlantic salmon. Suitable LABWIs for both species include plasma cortisol, chloride, and magnesium, although there are differences in the responses of each species. We suggest lactate is only suitable as a LABWI in Ballan wrasse. A range of morphological welfare indicators, including fin damage, cataracts and condition/emaciation state and growth are OWIs that can be used for welfare and stress documentation are applicable to both Ballan wrasse and lumpfish.

As stated above, the survival of both lumpfish and Ballan wrasse in cages is far too low. Work must continue on producing more robust fish and refining their e.g. handling and nutrition so that they have better survival and have better welfare in the cage.

2 Innledning

2.1 Faglig bakgrunn

Problemstilling/FoU-utfordring

Med økende bruk av rensefisk, særlig villfanget bergnebb og oppdrettet berggylt og rognkjeks, er det behov for grunnleggende kunnskap om stress og velferd hos disse artene. For næringen vil det være viktig å ha tilgang til operative velferdsindikatorer (OVI) og kunnskap om grenseverdier for påvirkning for å få best mulig nytte av hver enkelt rensefisk som settes inn i merdene for lusekontroll.

Hypotesen er at god velferd vil sikre både overlevelse, trivsel og effektiv lusebeiting hos rensefisken.

Kunnskapsstatus og tidligere utført arbeid

Det finnes lite dokumentert kunnskap om velferd og stress hos rensefisk. En skiller ofte mellom effekt av kort og langvarig stresspåvirkning. Kronisk stress påvirker immunforsvaret negativt, noe som fører til at cellens kapasitet til å dempe infeksjoner, reduseres (Tort 2011). Resultatet blir oppkonsentrering av smittestoff i kroppen og økt sannsynlighet for sykdom hos organismer med latent infeksjon (Ebrecht m.fl. 2004). Ved Universitetet i Nordland er det utført forsøk som viser effekter av kort og lengre stresspåvirkning hos rensefisk. Disse forsøkene avslørte at utskillelse av plasmakortisol, både hos leppefisk og rognkjeks, er lavere enn hos laks. Rognkjeks, skiller imidlertid ut signifikant mindre plasmakortisol enn berggylt, gitt at de er eksponert for den samme type stress (Iversen m.fl., 2015). Sekundære og tertiære stressresponser som osmolalitet, innhold av klor og magnesium i blod, og vekst ble hemmet hos rognkjeks som følge av langvarig stress (etter 21 dager) (Hansen m.fl., 2015). I tillegg viser atferden til disse to artene at berggylt aktivt prøver å svømme vekk fra trusselen, mens rognkjeks derimot suger seg fast til underlaget for å unngå å bli oppdaget av eventuelle predatorer (Davenport, 1985; Davenport og Thorsteinsson, 1990; Iversen m.fl, 2015; Voskoboinikova og Kudryavtseva, 2014). Håving og avliving for prøvetaking er stressende for fisken og gir ofte økning i plasmakortisol, noe som er en utfordring i forbindelse med tolkning av resultater. Kortisol avsettes også i avføring, noe som innebærer at avføringsprøver kan benyttes til kortisolmålinger uten å ta livet av fisken, og uten at resultatene påvirkes av stress forbundet med prøvetaking (Palme 2005, Bertotto m.fl. 2007). I FHF-prosjekt: 901005: «Strategier for å begrense PD», undersøkte forskere ved NTNU Ålesund sammenhengen mellom stress (faeceskortisol), mengde antistoff (IgM) og effektiviteten til laksens lymfocytter og utbrudd av PD. Teknikker som er utviklet til slike analyser for laks vil sannsynligvis også være svært relevante i forbindelse med dokumentasjon av velferd på rensefisk.

Ved Nofima har det pågått en Strategisk Institutt Satsnings (SIS), «Rognkjeks: produksjon og helse». I dette prosjektet, som inneholdt arbeidspakker på produksjon, helse, stamfisk og genetikk, ble det utført forsøk som viste at oksygentilgangen har mye å si for vekst og velferd, og at rognkjeks er følsom for lave oksygennivåer. I samme prosjekt ble det standardisert en smittemodell for *Vibrio ordalii* og brukt modellen til å teste 19 familiegrupper for mottagelighet for *V. ordalii*. Dette som ledd i en vurdering av muligheten for å selektere for økt sykdomsresistens.

Når det gjelder temperaturstress, har forskere ved Akvaplan-Niva tidligere undersøkt effekt av temperatur på vekst og overlevelse hos rognkjeks av ulik størrelse i kar (Nytrø m.fl., 2014). For fisk på 11-20 g, noe som er i omtrent samme størrelsesområde som for rognkjeks i merd, fant de best vekst ved 16 °C. Til tross for at optimaltemperaturen for rognkjeks på denne størrelsen er relativt høy, ble

det registrert god overlevelse gjennom vinteren når minimumstemperaturen har gått ned mot 3 °C (Ane Vigdisdatter Nytrø, pers. med.). Akvaplan-Niva har fulgt opp disse resultatene videre i FHF-prosjektet "Bruk av rognkjeks i merd" (FHF prosjekt #900979). Så vidt vi vet er det ikke utført tilsvarende studier for berggylt.

I det tre-årige FHF-prosjektet Leppeprod (FHF prosjekt #900554), undersøkte forskere i Nofima effekt av to ulike størrelser berggylt i forsøksmerder med stor laks (>2 kg). Berggylta overlevde godt, men det ble ikke funnet lakselus i tarmen hos berggylt ved avslutning av forsøket. Det ble antatt at dette skyldtes den lave temperaturen (7 °C), men i ettertid er det i kommersiell sammenheng observert lakselus i tarmen på oppdrettet berggylt helt ned mot 6 °C i (Ingrid Overrein, pers. med.). I regi av samme prosjekt undersøkte Skiftesvik m.fl. (2013) lusebeiteaktiviteten hos vill og oppdrettet berggylt, og fant ingen forskjell. Berggylta fikk ikke tilleggsfôr i løpet av forsøksperioden, noe som resulterte i at kondisjonsfaktoren falt signifikant i løpet av 6 uker (Skiftesvik m.fl., 2013). Etter den tid er det blitt mye mer fokus på at rensefisken må gis egnet fôr i tillegg til lus for å opprettholde god energistatus og velferd, og for at rensefisken skal være robust nok til å interessere seg for å spise lakselus.

I forkant av RENSVEL manglet vi kunnskap om hvor mange døgngader som er nødvendig for å oppnå beskyttelse etter vaksinerings hos rensefisk. Vaksineselskapene anbefaler likevel ca. 450 døgngader, da man har god erfaring med dette fra andre fiskeslag. I næringen har det imidlertid nå etablert seg en praksis hos flere der de setter fisken ut etter bare ca. 250 døgngader. Det manglet også kunnskap om hvilke temperaturer som er nødvendig og hvilken størrelse fisken bør ha for å oppnå en god immunitetsutvikling. Studier gjennomført i NFR prosjektet «The cleaner-fish lumpfish: Immunity, diseases and health» ved UiB, gir noen resultater relatert til døgngader og immunitetsutvikling hos rognkjeks (Heidrun Wergeland, pers. med.). Det ble sett på immunforsvar etter vaksinasjon som gir en god indikasjon på beskyttelse. I tillegg til at rensefisken muligvis blir vaksinert for tett opp mot utsett, er også prosedyrene ved vaksinerings av en slik art at fisken kan utsettes for mye stress. Dette igjen kan føre til redusert vaksineeffekt og en mindre robust fisk til utsett. Dagens praksis, spesielt for rognkjeks, er å vaksinere rensefisk uten verken sedasjonsmidler eller bedøvelse. Rognkjeks opptrer svært rolig ved håndtering og vaksinasjon, og dette kan være noe av årsaken til at noen feilaktig mener det er unødvendig med sedasjon eller bedøvelse. Men selv om fisken tilsynelatende tåler behandlingen, vet en lite om hvilken reell belastning dette er for fisken og hvilke langtidseffekter det kan få for fiskens helse og velferd. Sedasjon med Aqui-S kan også brukes for å redusere håndteringsstress. Erfaring fra tidligere sier at ved bedøvelse, fester rognkjeks seg til underlaget, men at dette ikke skjer ved sedasjon. Tidligere resultater viser at optimal dose på henholdsvis 3 og 5 mg/L Aqui-S vet. for berggylt og rognkjeks gir god sikkerhetsmargin og vil ikke gi noen dødelighet selv etter langtidseksponering på 24 timer. Videre viste resultatene at berggylt hadde en kraftig stressreaksjon sammenliknet med rognkjeks og at sedasjon ved 3 ppm gir en signifikant reduksjon i plasmakortisol etter 1 time sammenliknet med kontroll (0 ppm) (Iversen m.fl., 2015).

RENSVEL har samarbeidet med andre pågående prosjekter på rensefisk. NFR-prosjektet "Basic immunology studies and development of tools to monitor immune responses in cleaner fish" ved UiB, startet i 2015 med Nofima og Vaxxinova som samarbeidspartnere. Målet var å få bedre innsikt i immunresponser i rognkjeks og berggylt, med spesielt fokus på karakterisering av adaptive immunresponser. NFR-prosjektet «The cleaner-fish lumpfish: Immunity, diseases and health» (UiB) skaffet kunnskap om rognkjeksens helse og immunsystem, og utviklet vaksiner mot de vanligste sykdommene som rognkjeks kan få. I det Strategiske Institutt Programmet ved Nofima, «SIS Fiskehelse», ble det arbeidet det med å utvikle velferdskår og et målesystem for evaluering av

skinnhelse for rognkjeks. Videre ble det jobbet med å utvikle et verktøy for stressmåling basert på måling av slimproduksjon i tarm, gjelle og hud kombinert med histologi og genmarkører for stressrelaterte komponenter. Allerede ved utforming av prosjektbeskrivelse i RENSVEL ble det bestemt å utelate transportstress fra prosjektet ettersom det var et overordnet ønske at det ble et samarbeid mellom RENSVEL og prosjektet «Transportstress hos rognkjeks» (FHF prosjekt #901158 ledet av Akvaplan-Niva). Det har vært avholdt et felles styringsgruppemøte mellom de to prosjektene og informasjonsutveksling har funnet sted.

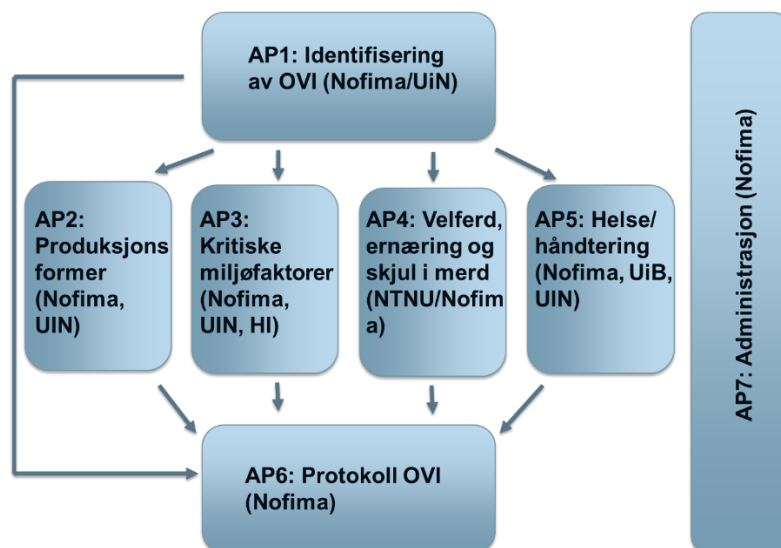
I dag blir det mer og mer fokus på å bruke oppdrettet rensefisk, i motsetning til villfanget. Flere større oppdrettere har som mål å bli selvforsynt med egenprodusert rensefisk. Store aktører, som f. eks. Mowi har som mål å være selvforsynt med rensefisk. Det er også rettet kritikk mot bruk av villfanget rensefisk på grunn av velferdsutfordringene av å sette villfanget fisk i fangenskap (Poppe 2015), og overfiske av villfisk (Halvorsen 2015). På grunn av at en ser for seg at oppdrettet rensefisk vil få stadig større betydning ble RENSVEL avgrenset til oppdrettet rognkjeks og berggylt.

2.2 Prosjektorganisering

FHF er eier av prosjektet, mens Nofima ved Åsa Maria Espmark, har vært prosjektleder. Medlemmer og roller i prosjektgruppen og styringsgruppen er gitt nedenfor. I tillegg har vi vært hatt studentoppgaver knyttet til prosjektet.

Prosjektgruppe

Prosjektgruppa har bestått av forskere fra **Nofima** (Åsa Maria Espmark, Chris Noble, Ingrid Lein, Gerd Marit Berge, Jelena Kolarevic, Lill-Heidi Johansen, Erik Burgerhout), **Nord Universitetet** (Martin Haugmo Iversen), **NTNU Ålesund** (Grete Hansen Aas og Anne Steene), **UiB** (Heidrun Wergeland). Rollene til disse er definert i prosjektstrukturen i figur 1 I tillegg har **HI** (Anne Berit Skiftesvik) vært en del av prosjektgruppen med data inn i AP3.



Figur 1 Arbeidspakkestruktur med ansvarsfordeling.

Styringsgruppe

RENSVEL har hatt en styringsgruppe bestående av fem næringsaktører. Disse har vært Merete Sandberg (erstattet av Espen Lie Dahl i 2016), Olav Breck, Kjetil Heggen, Lars Jørgen Ulvan og Halvard Hovland.

3 Problemstilling og formål

Hovedmål

Hovedmålet med prosjektet er å utvikle og levere robuste og kunnskapsbaserte operative velferdsindikatorer (OVI) som kan brukes for å sikre god velferd hos rensefiskartene berggylt (*Labrus berggylta*) og rognkjeks (*Cyclopterus lumpus* L.). Prosjektet skal også gi ny kunnskap om grenseverdier for miljøfaktorer som kan være kritiske for artens velferd.

Delmål

1. Kartlegge faktorer som utløser stressrespons hos rognkjeks og berggylt.
2. Klarlegge hvordan ulike risikofaktorer påvirker velferd hos rognkjeks og berggylt.
3. Klarlegge hvordan ernæringsstatus påvirker fiskevelferd hos begge arter.
4. Klarlegge om utforming av skjul påvirker overlevelse og velferd gjennom vinteren i merd.
5. Optimalisere prosedyrene for vaksinerings i forhold til fiskestørrelse og døgngrader.
6. Klarlegge om sedasjon/bedøving har positiv effekt i forhold til håndteringsstress ved vaksinasjon.
7. Vurdere grad av håndteringsstress (e.g. sortering, pumping, trenging)
8. Utarbeide en artsspesifikk protokoll med OVI som er velegnede til å evaluere velferd hos rognkjeks og berggylt.
9. Anbefale, med basis i vitenskapelig kunnskapsgrunnlag, konkrete tiltak for reduksjon av stress/optimalisert velferd i produksjon og bruk av rensefisk.

3.1 Redegjørelse for prosjektets effektmål

RENSVEL skal komme næringen til nytte gjennom å:

Gi ny kunnskap om hvordan overlevelse og velferd hos rensefisk kan forbedres gjennom optimalisering av ulike kritiske faktorer

- I RENSVEL har vi gjennom kontrollerte forsøk kommet med anbefalinger til næringen hva angår optimal lyssetting, vannstrøm, oksygenmetning og tetthet i kar. Vi viser til kapittel 4.3.

Bidra til å gi næringen gode artsspesifikke OVI'er

- I kapittel 4.1 og 4.6 er det redegjort for anbefalte OVI'er både for berggylt og rognkjeks, basert på resultater i RENSVEL og eksisterende litteratur.

Bidra til god overvintring av rensefisk, og dermed til bedre tilgang på rensefisk om våren når tilgangen på vill rensefisk er begrenset

- I kapittel 4.4 blir det redegjort for kontrollerte forsøk og overvåking i merd som kan fungere som anbefalinger for optimalt hold av rensefisk i merd ved ulike årstider.

Bedre næringens omdømme gjennom bedre velferd hos rensefisken

- Sammen med flere FHF prosjekter som har rensefisk velferd i fokus mener vi RENSVEL er et viktig bidrag til å få næringen til å prioritere fiskevelferd. I løpet av RENSVEL sin prosjektperiode

er det er merkbar endring i næringen sitt fokus på velferd, blant annet ved at flere oppdrettere nå setter dedikerte medarbeidere til kun å sikre fiskens velferd.

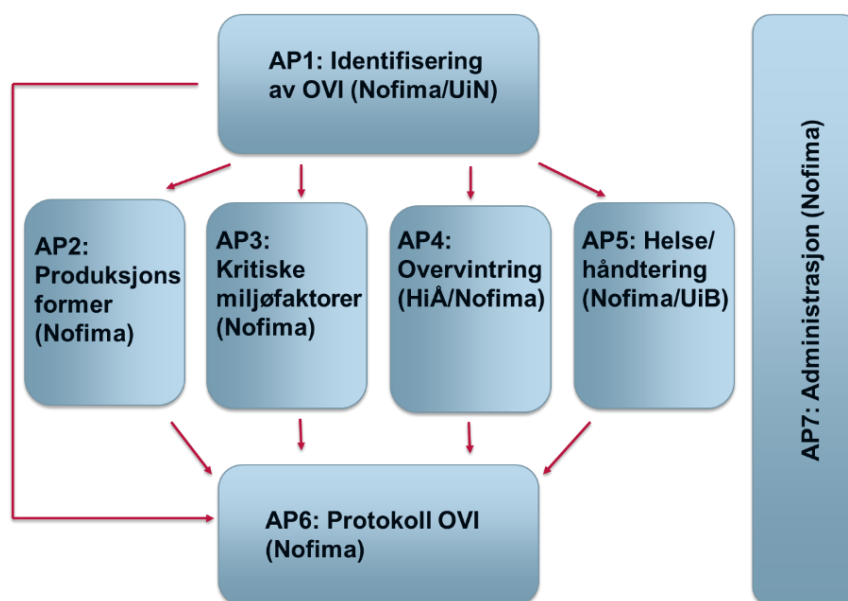
Bidra til at næringen på en forsvarlig måte blir selvforsynt med oppdrettet rensefisk med god velferd

- I løpet av prosjektperioden har vi også merket et endret fokus på oppdrettet rensefisk i motsetning til villfanget, og en bevisstgjøring på nytten av oppdrettet fisk som er større grad av kontroll og mindre utfisking av villfisk. Flere oppdrettere velger egenprodusert rensefisk.

3.2 Redegjørelse for prosjektets resultatomål

For resultatomål og leveranser henvises det til kapittel 7.

4 Prosjektgjennomføring



Figur 2 Arbeidspakkestruktur som tidligere vist i figur 1.

4.1 Identifisering av mulige OVler for berggylt og rognkjeks

I arbeidspakke 1 ble det laget en oversikt over OVler (operasjonelle velferdsindikatorer) og LABVler (laboratoriebaserede velferdsindikatorer), som ble brukt ved planlegging av forsøkene i arbeidspakkene 2-5. Denne oversikten ble brukt som utgangspunkt under utformingen av protokollen som er presentert i arbeidspakke 6 (Kapittel 4.6). Et mål med implementeringen i AP2-5 var å standardisere målemetodene så mye som mulig slik at resultatene fra de ulike forsøkene ble. Vi ønsket en så omfattende bruk av indikatorene som mulig slik at vi fikk et godt grunnlag for å kunne vurdere dem som OVI. Konklusjonen over egnetheten blir presentert senere i denne rapporten.

Inndeling av oversikt

Vi delte inn aktuelle OVI/LABVler i kategoriene: Fysiologi, Morfologi, Atferd, Vannkvalitet og Helse. For hver av disse ble det definert analysemetoder. Tilsvarende oversikt ble laget for rognkjeks og berggylt, på individnivå og gruppenivå. En rekke av indikatorene ble testet i de ulike forsøkene. Protokollen (Kapittel 4.6) er blant annet basert på erfaring fra implementeringen, det vil si at noen indikatorer har falt fra mens andre har kommet til.

Velferdsdefinisjoner

I tillegg til å definere operasjonelle velferdsindikatorer, ønsket vi å adoptere operasjonelle velferdsdefinisjoner. Det finns en rekke definisjoner av velferd, der noen bygger på objektive behov, mens andre bygger mer på individenes følelser.

Man kan skille mellom:

1. Følelsesbaserte definisjoner som sier noe om subjektiv mental tilstand. Her er kravet til god velferd at individet skal føle seg bra, være fri for negative opplevelser som smerte eller frykt og ha tilgang til positive erfaringer, for eksempel nærvær av andre individer av samme art når det gjelder sosiale arter. Denne bruken av begrepet velferd avhenger av at dyret har bevisste subjektive erfaringer og at vi evner å tolke disse erfaringer.

2. Funksjonsbaserte definisjoner som fokuserer på et dyrs evne til å tilpasse seg sitt nåværende miljø. Her forutsetter god velferd at dyret skal være godt tilpasset sine biologiske systemer (og spesielt de som er involvert i å håndtere utfordringer med endringer), fungerer hensiktsmessig og ikke blir tvunget til å respondere utover det de mestrer. Denne definisjonen er basert på ting som er relativt enkle å observere og måle.
3. Naturbaserte definisjoner stammer fra oppfatningen at hver dyreart har en iboende biologisk natur som de må få uttrykke. Her krever god velferd at dyret kan leve et naturlig liv og kunne utøve sin naturlige atferd. Denne tilnærmingen, som reflekterer en oppfatning av at det som er naturlig er iboende bra, fokuserer på noe vi kan måle, nemlig hva dyr gjør når de er i naturen og når de er i fangenskap.

I RENSVEL valgte vi tre definisjoner basert på en blanding av følelsesbaserte og funksjonsbaserte definisjoner, da vi er av den oppfatning at de best dekker det utgangspunkt vi har med fisk i oppdrett. Disse definisjonene gir en objektiv hjelp til å definere gode OVler.

1. “the quality of life as perceived by the animals themselves”, “...searching for indicators of the degree of fulfilment of the animal’s welfare needs and the effects on the animals’ wellbeing.” (Stien et al., 2013).
2. “The welfare of an individual is its state as regards its attempts to cope with its environment.” (Broom, 1986).
3. “...simple working definition of good welfare was that the animal (1) was healthy and (2) had what it wanted.” (Dawkins, 2008).

De ovennevnte tre velferdsdefinisjonene alle er velegnet for akvakultur. Allikevel, for å skape synergi med andre FHF-prosjekter på fiskevelferd i akvakultur, f.eks. FHF pr. #901157 «FISHWELL: Kunnskapssammenstilling om fiskevelferd for laks og regnbueørret i oppdrett», har vi implementert følgende definisjon i RENSVEL: “*the quality of life as perceived by the animals themselves*” (Stien et al., 2013).

4.2 Produksjonsformer for rognkjeks og berggylt

Produksjonsformer for rognkjeks og berggylt

I dag foregår kommersielt oppdrett av både berggylt og rognkjeks i produksjonenheter tilsvarende de som har vært benyttet for torsk og laks, men med noen modifikasjoner. Vi vet lite om i hvor stor grad disse produksjonssystemene tilfredsstiller de to artenes behov. Det er derfor behov for å øke kunnskapen om optimale produksjonsformer som tar vare på fiskens velferd. I AP2 var det planlagt å undersøke to utfordringer; 1) effekt av nedtapping hos rognkjeks og berggylt, og 2) «klumping» hos berggylt. Dette er eksempler på artstypiske atferd som kan begrense velferden under dagens produksjonsmiljø. Etter diskusjon med referansegruppen ble det enighet om å dreie fokus noe, A2.1 *Nedtapping rognkjeks og berggylt* ble derfor strøket i revidert arbeidsplan, og det er kun A2.2 *Klumping hos berggylt* som er beskrevet nedenfor.

Klumping hos berggylt

I kommersielt oppdrett ser en ofte at berggylt samler seg i tette grupper («klumping») nær overflaten (Figur 3). Årsaken til denne atferden, og hvilken betydning den har for fiskevelferden er ikke klarlagt. For å få en bedre forståelse av dette fenomenet besøkte forskere fra Nofima i juni 2016 Mowi sitt produksjonsanlegg på Fosen i Trøndelag. Under dette oppholdet ble det gjort målinger av både direkte (fysiologi, velferdsskår, vekt/lengde) og indirekte velferdsindikatorer (vannkvalitet) for berggylt i en produksjonssituasjon.

Målet med arbeidet var å registrere velferd hos berggylt i en oppdrettssituasjon, og å dokumentere daglige stressnivåer, og eventuelle endringer i løpet av døgnet. I tillegg ble ulike vannparametere målt og analysert.



Figur 3 “Klumping” hos berggylt nær overflaten i produksjonskar.

Gjennomføring

Berggylten som ble undersøkt var produsert ved to kommersielle klekkerier (Mowi i Øygarden og Havlandet Marin Yngel (HMY) i Florø). Yngelen ble transportert til Mowi på Fosen for påvekst. Der ble fisken holdt i 20 m³ og 30 m³ sirkulære kar, og fisk med ulik opprinnelse ble holdt i atskilte kar.

Det ble tatt prøver fra to kar med fisk fra Mowi (kar 205 og 207), og to kar med fisk fra HMY (kar 201 og 202). Det ble tatt prøver av fisk på tre tidspunkt:

- Kontroll (kl. 04:00-06:00), dvs. før arbeid i hallen startet.
- Dag (kl. 17:00-19:00), dvs. på slutten av arbeidsdagen.
- Natt (kl. 23:01:00), dvs. om natten uten naturlig lys utenfra.

Ved hvert tidspunkt ble det samlet fisk fra flere steder i karet: direkte fra “klumper” med fisk, nær fôrautomat, og fra bunnen av karet.

Vannkvalitet

Målinger av vannkvalitetsparametere ble tatt fra utløpet på karene, og prøvetakingen ble gjort på slutten av arbeidsdagen mellom kl. 17:00 og 19:00. Temperatur, oksygen, konduktivitet, salinitet og karbondioksid ble registrert. Måling av temperatur og karbondioksid ble i tillegg repetert i forbindelse med prøvetaking på natt kl. 23:00-01:00.

Måling av vannhastighet

Vannhastighet ble målt i alle de fire karene hvor det ble tatt prøver av fisk (Figur 4). Innløpsrørene i karene var orientert slik at dysene vendte inn mot karveggen for å redusere vannhastigheten. Ved rensing av karene ble retningen på dysene endret for å øke vannhastigheten og lette rengjøringen. Etter rengjøring stilles innløpene tilbake inn mot veggen.

Vannhastighet i normalsituasjon (lav hastighet) ble målt for alle fire kar. I kar 207 målte vi hastigheten både i normalstilling og under rengjøring av kar.

I 20 m³ karene (kar 201, 202, 205) målte vi vannhastighet på tre dyp: 0,2 m, 0,65 m and 1,2 m, og ved tre punkter i horisontalt plan: 0,25m, 1m og 1,7m fra karkant. I 30 m³-karet (kar 207) ble vannhastigheten ved de same dypene som for 20m³-karene, og ved tre punkter i horisontalt plan: 0,25m, 1,25m og 2,3m fra karkant.



Figur 4 Måling av vannkvalitet i kar hos Marine Harvest (nå Mowi) på Fosen.

Stressmarkører

Det ble tatt prøver fra 5-10 fisk fra tre posisjoner i hvert av de fire karene, dvs. totalt 15-20 fisk per kar. Operative velferdsindikatorer fra AP1 ble evaluert: katarakt, deformiteter, gjellelokkforkortelse, skinn, munn- og finnestatus.

Det ble tatt blod fra de samme fiskene for analyse av fysiologiske stressparametere: laktat og glukose i helblod, og konsentrasjon av kortisol og magnesium i blodplasma.

Resultat/diskusjon

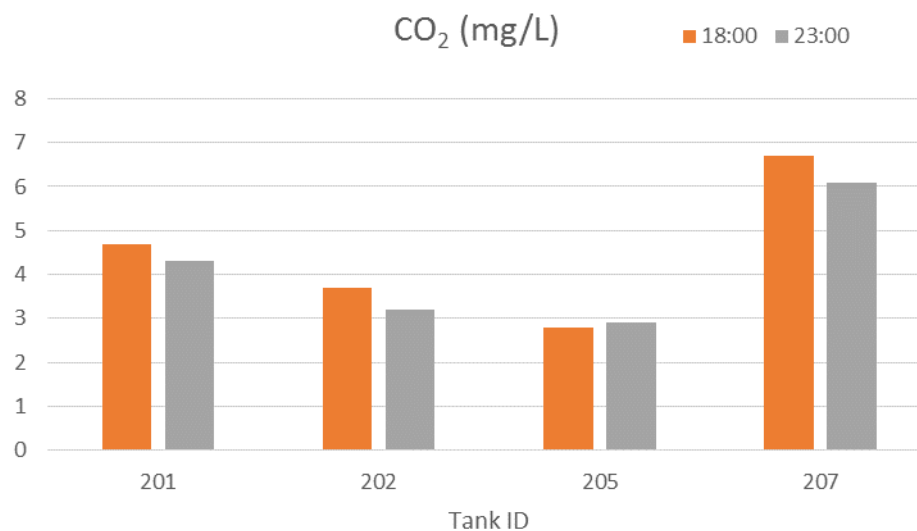
Vannkvalitet

De fleste vannkvalitetsparametere var like for alle de fire karene (Tabell 1). Det ble registrert høyere konsentrasjon av CO₂ i det største karet (207, 30m³) sammenlignet med de tre mindre karene (20m³). Dette stemmer godt overens med pH-verdiene som var lavest i kar 207, og høyest i kar 205.

Tabell 1 Måling av vannkvalitet i utløpet av karene.

Tank	Karstørrelse (m ³)	Temperatur (°C)	pH	Konduktivitet (mS/cm)	Salinitet (ppt)	O ₂ (%)	O ₂ (mg/L)	CO ₂ (mg/L)
201	20	13,6	7,48	53,8	34,9	87	7,3	4,7
202	20	13,7	7,61	53,8	34,9	85	7,1	3,7
205	20	13,7	7,73	53,8	34,8	86	7,1	2,8
207	30	13,7	7,33	53,8	34,8	87	7,3	6,7

Det ble gjort gjentatte målinger av CO₂-konsentrasjon gjennom natten. Disse viste en reduksjon i konsentrasjon av CO₂ i nesten alle kar (Figur 5), noe som kan indikere lavere generell aktivitet og hvileaktivitet hos berggylta om natten.



Figur 5 Måling av CO₂-konsentrasjon i fire kar (201, 202, 205, 207) på slutten av arbeidsdagen (~kl. 18:00), og på natt (~kl. 00).

Vannhastighet

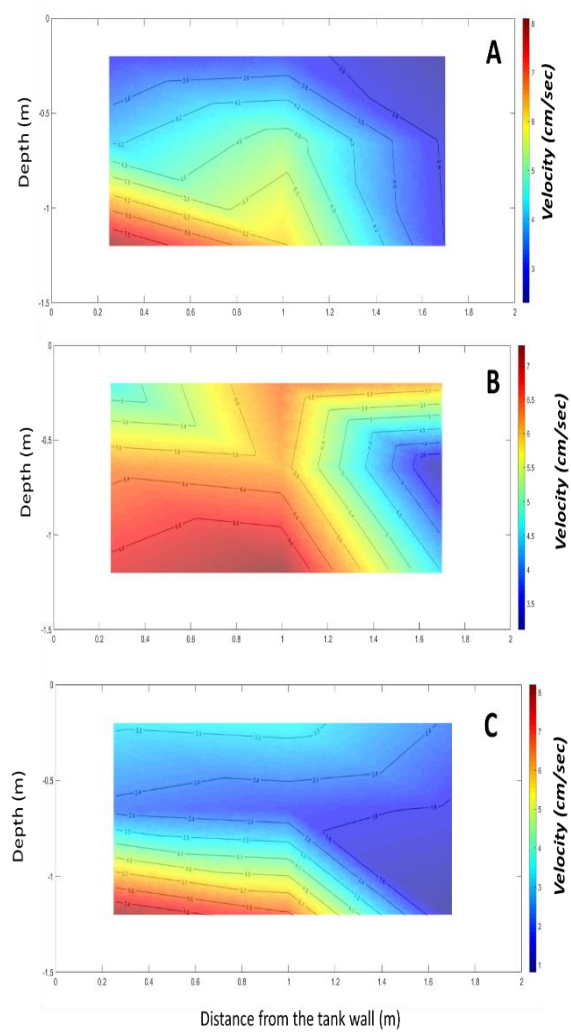
Gjennomsnittlig vannhastighet for alle de fire karene er vist i Tabell 2. Tilsvarende vannhastigheter ble funnet når man målte i enkeltkar (kar 201, 205 og 207), med unntak av kar 202 hvor relative vannhastighet var dobbelt så stor sammenlignet med de andre.

Tabell 2 Gjennomsnittlig vannhastighet i fire kar. Vannhastigheten ble målt i kar 207 ved normalkjøring (207 (-)) og 300 l/min (207 (+)). Relativ vannhastighet er kalkulert i forhold til gjennomsnittlig lengde på berggylt i hvert kar.

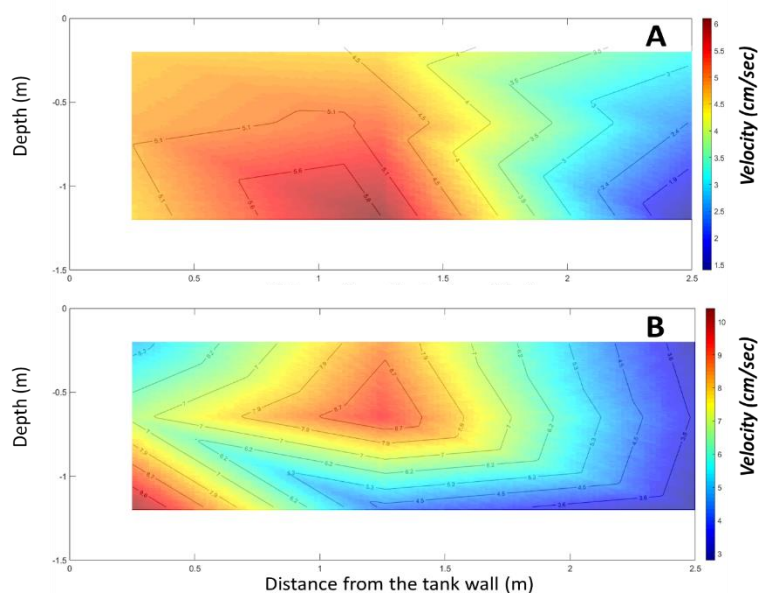
Kar nr.	Vannhastighet (cm/sec)	Relativ vannhastighet (BL/sec)
201	4,2 ± 2,0	0,4
202	5,7 ± 1,3	0,6
205	3,4 ± 2,5	0,3
207 (-)	4,1 ± 1,5	0,4
207 (+)	5,9 ± 1,5	0,5

I kar 201 og 205 (Figur 6) ble den høyeste vannhastigheten målt ved bunnen av karene og nær karveggen. Hastigheten avtok nærmere overflaten og inn mot sentrum av karene. I kar 202 (Figur 6) var områdene med høyere vannhastighet spredt mer jevnt utover hele karet, med høyest hastighet nær karveggen mot bunnen av karet, og ved vannoverflaten i midten av karet. Alle 20 m³-karene hadde to innløpsrør med ulik orientering, dette kan være en årsak til at karene har ulik hastighetsprofil. I tillegg må en ta i betraktning at målepunktene for kar 201 og 205 var identiske med hensyn til avstand fra innløpsrørene. Målingene for kar 202 ble av praktiske årsaker foretatt på litt annet sted i karet, noe som kan ha påvirket vannhastighetsprofilene.

Relativ vannhastighet i kar 207 var lik kar 201 og 205 (Tabell 2). Retningsendringen av innløpsdysene som blir gjort i forbindelse med rengjøring av karene, fører til økning i hastighet ved nesten alle målepunkter (Figur 7), og den totale gjennomsnittshastighet i karet øker (Tabell 2). Maksimal målt hastighet i kar 207 ble økt fra 6,1 til 10,4 cm / sek.



Figur 6 Hastighetsprofiler for kar med volum 20 m^3 : A) 201, B) 202; C) 205. Lavest hastighet er vist i blått, og høyest i rødt. Merk at hastighetsskalaen kan være forskjellig på figurene.

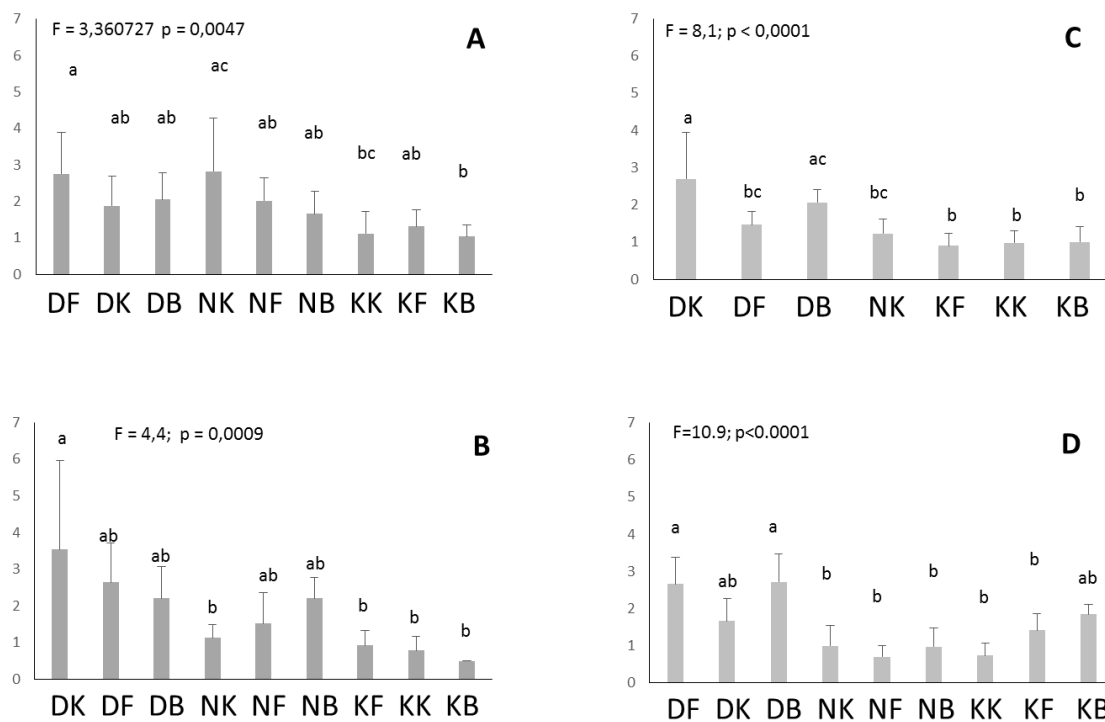


Figur 7 Hastighetsprofil for kar med volum 30 m^3 : A) 207(-) ved normal drift og B) 207 (+) ved maksimal flow. Lavest hastighet er vist i blått, og høyest i rødt. Merk at hastighetsskalaen for hvert kar kan være forskjellig.

Ytelse, stress og velferd

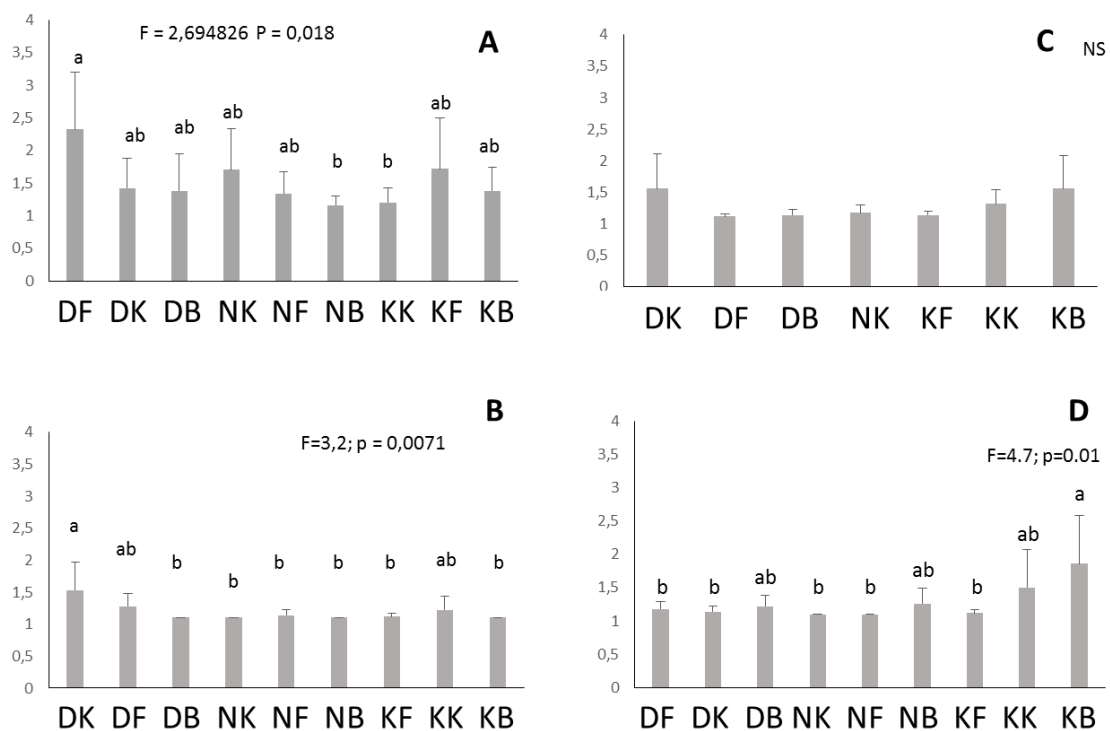
Det var signifikant forskjell i vekt mellom fisk fra ulike kar. Fisken i kar 202 var minst med enn snittvekt på $13,98 \pm 4,11 \text{ g}$. Gjennomsnittsvekten i kar 201, 205 and 207 var henholdsvis $24,97 \pm 6,77$, $23,24 \pm 5,59$ og $22,71 \pm 4,76 \text{ g}$. På karnivå var det kun i kar 207 vi fant signifikante forskjeller i vekt ved ulike prøvetakingspunkt. Fisk som ble samplet i nærheten av fôrautomaten var større en fisk som oppholdt seg i «klumpen» under natten.

Konsentrasjonen av laktat i blodet var forskjellig mellom fisk fra ulike kar (Kruskal Wallis test, $p=0,0489$). Laktatnivået var høyest i kar 201 og 202. Laktatkonsentrasjonen var den eneste stressindikatoren som varierte i forhold til prøvetidspunkt og lokalitet i kar (Figur 8). De høyeste verdiene ble registrert på dagtid i alle kar, enten for fisk som oppholdt seg i «klumpene» eller nær fôrautomatene.



Figur 8 Laktat i blod for kar 201 (A), 202 (B), 205 (C) og 207 (D). Alle prøvetidspunkt og prøvesteder er vist for hvert kar: DF) Dag v fôrautomat; DK) Dag "klump"; DB) Dag kar bunn; NF) Natt v fôrautomat; NK) Natt "klump"; NB) Natt kar bunn; KF) Kontroll v fôrautomat; KK) Kontroll "klump"; KB) Kontroll kar bunn. Ulike bokstaver viser statistisk sikre forskjeller innen hvert kar.

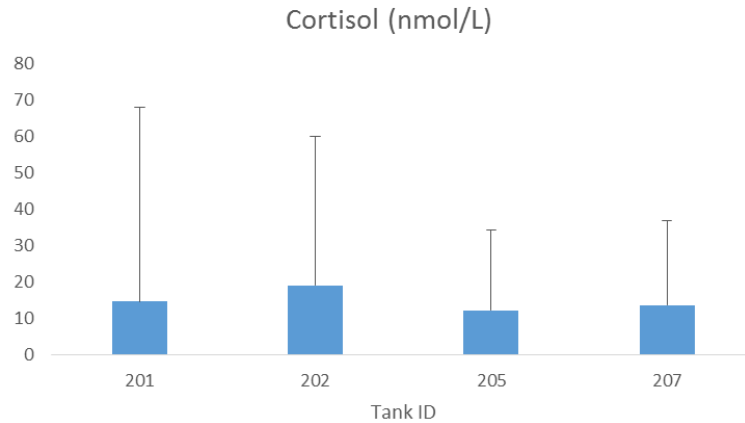
Det ble registrert statistisk signifikante forskjeller i glukosenivå for fisk i alle kar unntatt kar 205 (Figur 9). I kar 201 og 202 ble det høyeste nivået målt i nærheten av fôrautomatene på dagtid og hos fisk som oppholdt seg i "klumpene". I kar 207 ble høyest glukosenivå målt på natt hos fisk som oppholdt seg nær bunnen av karet.



Figur 9 Glukose i blod for fisk fra kar 201 (A), 202 (B), 205 (C) og 207 (D). Alle tidspunkt og prøvested er vist for hvert kar: DF) Dag v fôrautomat; DK) Dag "klump"; DB) Dag kar bunn; NF) Natt v fôrautomat; NK) Natt "klump"; NB) Natt kar bunn; KF) Kontroll v fôrautomat; KK) Kontroll "klump"; KB) Kontroll kar bunn. Ulike bokstaver viser statistisk sikre forskjeller innen hvert kar.

Gjennomsnittlig kortisolnivå for fisk i alle kar var $14,98 \pm 37,6$ nmol/L. Den store individvariasjonen var karakteristisk for alle karene. Variasjonen var større for en av fiskegruppene (opprinnelse fra Havlandet Marin Yngel) (Figur 10). Vi fant ingen statistisk sikre forskjeller i plasmakortisol hos fisk, verken mellom kar eller innen kar, dvs. mellom prøvetidspunkter eller sted for prøvetaking.

Konsentrasjonen av magnesium i plasma viste heller ingen statistisk sikre forskjeller med mellom fisk fra ulike kar, og den eneste sikre forskjellen innen kar ble funnet for kar 207. Her ble høyest magnesiumkonsentrasjon registrert hos berggytt nær fôrautomaten, og lavest hos fisk på bunnen av karet på same tidspunkt.

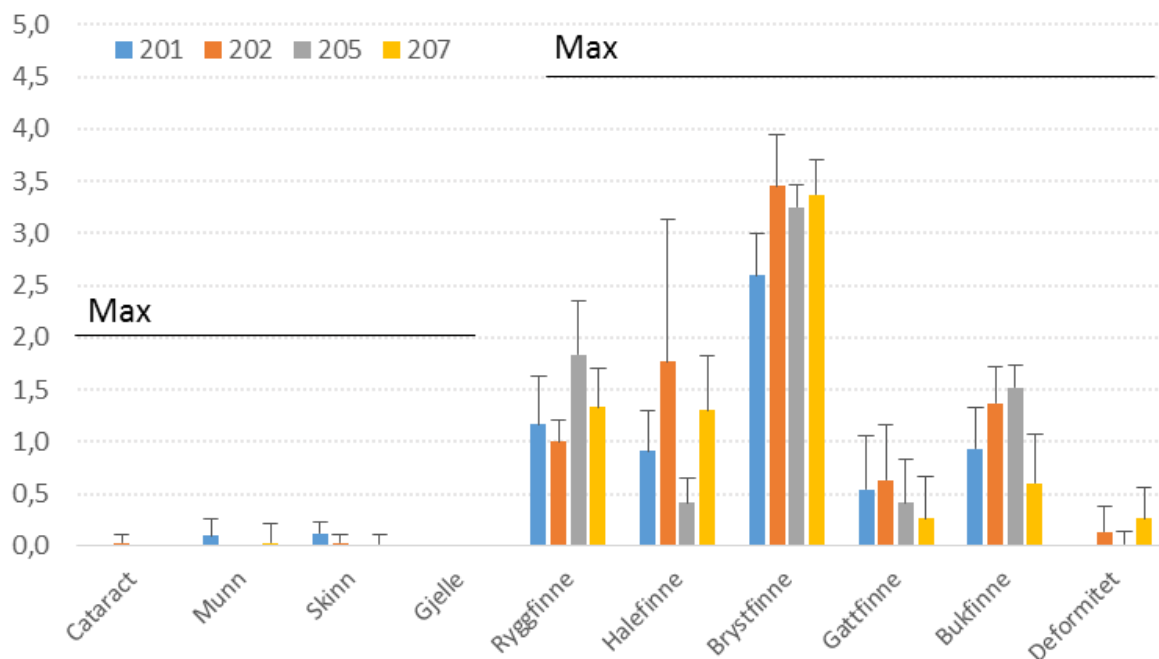


Figur 10 Gjennomsnittlig plasmakortisol ($\pm$ STD) hos fisk fra fire kar.

Ekstern velferdsskår

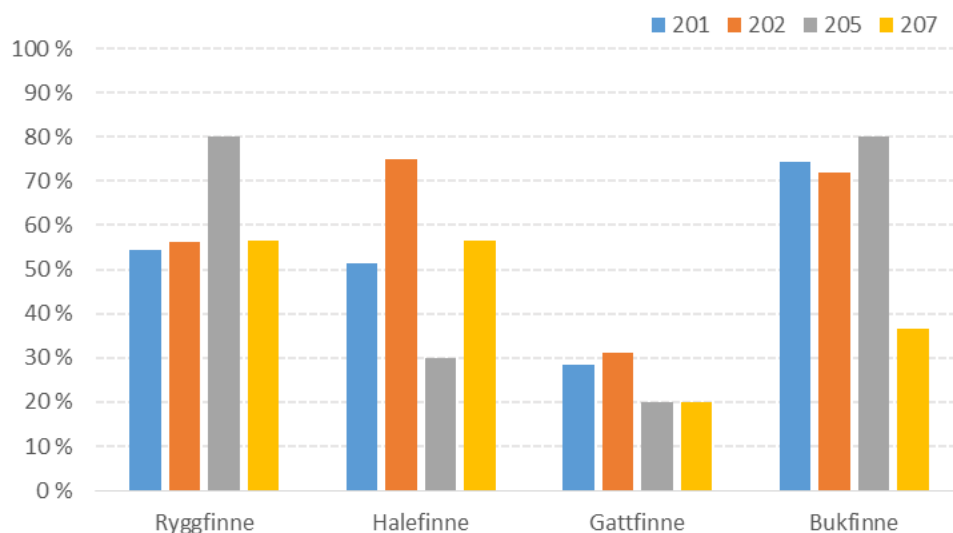
Skåring av eksterne velferdsindikatorer ble utført ved hjelp av skåringssystemet som er utviklet for laks, der høyere skår betyr høyere grad av skade. I dette skåringssystemet ble katarakt, munn og skinn status gitt en skår fra 0 (ingen endring) til 2 (alvorlig skade), mens finne status ble skåret fra 0 (ingen skade) til 5 (alvorlig skade).

En generell observasjon for alle kar var at svært få fisk hadde skinn- eller munnskader eller katarakt, og tilstedeværelsen av deformiteter var lav (Figur 11). Ulike typer finneslitasje ble registrert, særlig på brystfinne (Figur 11). Gjennomsnittlig skår for brystfinne for alle kar varierte fra $2,6 \pm 0,4$ i kar 201 til $3,5 \pm 0,5$ i kar 202. All undersøkt fisk hadde skade på brystfinnerne. Kar 202 hadde høyest registrerte skår for skade på brystfinnerne, og samtidig høyest vannhastighet av alle fire karene, noe som kan indikere at strømhastighet kan ha påvirket graden av finneskade. Det er behov for mer forskning for å bestemme hva som er optimal vannhastighet for berggylt.



Figur 11 Ekstern velferdsskår av fisk i fire kar ved Fosen. Verdier er gitt som gjennomsnitt ved ulike lokaliteter og tid på døgnet i hvert kar. Maksimal skår for de ulike indikatorene er angitt med svart linje i figuren.

Graden av skade på andre finner var: ryggfinne (mellom 54 % og 80 %); bukfinne (mellom 37 % and 80 %), halefinne (mellom 51 % and 75 %) og gattfinne (mellom 20 % and 31 %) (Figur 12).



Figur 12 Grad av finneskader (%).

Oppsummering

- Det ble ikke registrert store forskjeller i vannkvalitet i de tre karene med volum 20 m³
- Det største karet (30m³) hadde høyere CO₂-nivå, og lavere pH enn de mindre karene.
- CO₂-nivåene ble redusert i alle kar om natten, noe som kan skyldes redusert aktivitet/søvn.
- Vannhastigheten var lik i tre av fire kar, mens et kar (20 m³) hadde dobbelt så høy hastighet.
- Måling av vannhastighet viste ulike strømningsbilder i de ulike karene, dette kan skyldes ulik orientering av innløpsdyser.
- Laktat i blodet varierte etter hvor i karet, og på hvilket tidspunkt, fisken ble samlet inn.
- Høyest nivå av glukose i blod ble registrert på dagtid hos fisk i nærheten av fôringsautomatene.
- Det var ingen forskjell i plasmakortisol hos fisk, verken mellom kar, tidspunkt eller prøvepunkt.
- Det var ingen karforskjeller i magnesiumkonsentrasjon i plasma.
- De fleste undersøkte fisker hadde brystfinneskader, ellers var det få lyter som ble observert.

Det var små forskjeller i vannkvalitet mellom kar, men det ble observert en reduksjon i CO₂ om natten, noe som kan indikere at berggyllt har behov for hvile/søvn en periode i løpet av døgnet.

Det største karet hadde lavere CO₂ og pH sammenlignet med de tre mindre karene. De mindre karene hadde to innløp mens det største hadde kun et innløp, noe som kan ha påvirket vannkvaliteten. Det kan være flere faktorer som påvirker disse parameterne, blant annet biomasse som vi ikke kjenner for karene som ble undersøkt.

Det var store forskjeller i vannhastighet, dvs. hvor i karet hastigheten var størst/minst. Daglig rutine med å vende innløpsdysene så ikke ut til å ha ønsket effekt i forhold til økt vannhastighet under røkting. Resultatene viser behov for standardisering/fiksering av innløp, utforming av kar og innløp, og optimal vannhastighet for berggyllt.

4.3 Kritiske miljøfaktorer

For alle nye arter som tas inn i oppdrett er det viktig å utvikle kunnskap om hvilke miljøkrav som er avgjørende for fiskens trivsel og ytelse. Berggyllt og rognkjeks lever naturlig i svært ulike habitater. Det er derfor naturlig å anta de to artene har ulike miljøkrav. I denne arbeidspakken har vi undersøkt ulike miljøfaktorer som antas å være viktige for en eller begge arter. For alle resultatene har vi brukt operative velferdsindikatorer (OVI'er som er definert i AP1).

4.3.1 Lys til berggyllt og rognkjeks

Lys er en miljøfaktor som ser ut til å påvirke atferden hos både berggyllt og rognkjeks. I tillegg vil karfarge påvirke lysforholdene i karene. I kommersielt oppdrett av berggyllt og rognkjeks benyttes ulike karfarger og lyssettinger. Det er tidligere vist at småkveiteyngel endret atferden merkbart om de ble holdt i kar med lysegrå i stedet for sorte vegger. I de lyse karene ble kveiteyngelen mye mer urolig enn i kar med sorte vegger (Lein og Holmefjord, upublisert). Berggyllt har en særegen atferd hvor de ofte klumper seg sammen, noe som resulterer i store tettheter på begrensede områder i karene. Det antas at denne atferden kan være en form for beskyttelse, og at den kan være stressrelatert. Havforskningsinstituttet (HI) har tidligere gjort forsøk med små berggyllt hvor denne atferden ble redusert når fisken fikk diffust naturlig lys, dvs. naturlig lys gjennom et transparent plasttak. Plassering

av lys påvirker skyggekastning i karet, og dermed oppfattelsen av forstyrrelser i forbindelse med aktivitet på utsiden av karene. Lysintensitet og bølgelengde kan også påvirke fiskeatferden.

I denne arbeidspakken har vi undersøkt hvordan lys med ulike bølgelengder og ulike lysmengder påvirker prestasjon, atferd og velferd hos både rognkjeks og berggylt. Det ble gjennomført to forsøk med samme forsøksoppsett: rognkjeks i perioden 15.07-10.08.2016, og berggylt i perioden 26.05-10.08.2017. Bølgelengdene ble valgt ut fra forsøk som HI har gjort hvor de har undersøkt lysoppfattelsen hos flere rensefiskarter, deriblant rognkjeks og berggylt. Disse testene viste at begge arter oppfatter bølgelengder i blått og grønt spekter best.

Forsøksoppsett

Forsøket for hver art ble kjørt med to kar per kombinasjon av bølgelengde (Blå=450nm, Grønn=520nm, Hvit=bredspektret) og lysmengde (< 1, 5 og 20 micromol/m²/sek) som forklaringsvariabler; dvs. totalt 18 kar per forsøk.

Rognkjeks med snittvekt på 11,5 gram ble fordelt med lik biomasse (1150 g/kar) og antall (100 fisk/kar) i de 18 karene. Tilsvarende ble berggylt med snittvekt på ca. 2 gram fordelt på de 18 karene med lik biomasse per kar (1194 g/kar). På grunn av en feil ble berggylten ikke talt inn i karene, noe som gjør at vi ikke har nøyaktig estimat for prosent døde i forsøksperioden. Dødeligheten for berggylt er derfor oppgitt som akkumulert antall døde i perioden.

Forsøksgjennomføring

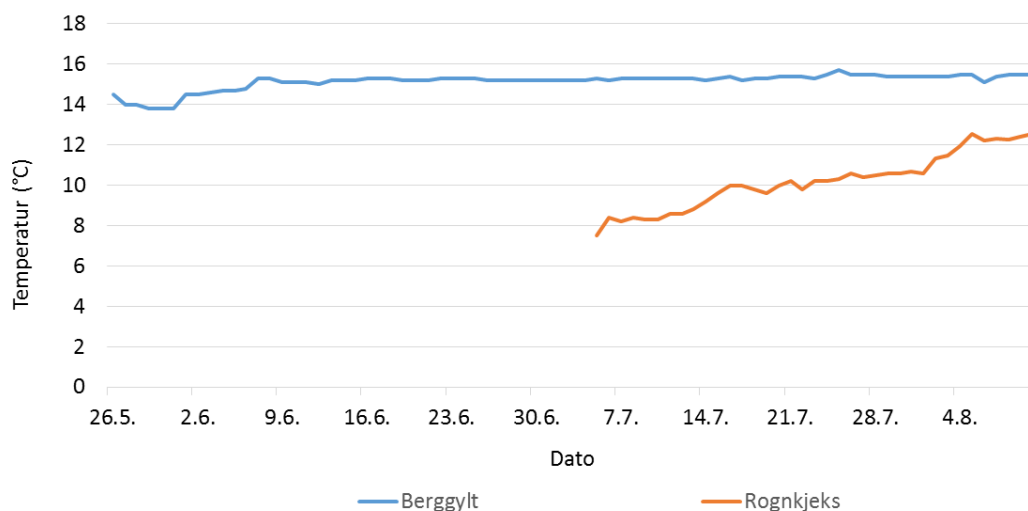
Forsøket ble gjennomført ved Nofima på Sunndalsøra i 150 liters grå kar med konisk bunn (Figur 13). Karene var utstyrt med transparent lokk og belteautomat. Forsøksdesignet er beskrevet i Tabell 3. Fisken ble fôret etter appetitt hvert 10. minutt, dvs. justert etter fôrspill. Berggylten ble fôret med Otohime C2 (0,84-1,4 mm, Pacific Aquaculture Trading LTD), og rognkjeks med Gemma Silk 1,5 mm (Skretting). Karene hadde vertikale fiksert innløp med flere hull for å oppnå lik vannstrøm i karene. Det ble brukt 4 liter vann/min per kar. Karene til berggylt var forsynt med et lite skjul for å gi fisken mulighet til hvile. Forsøket med rognkjeks ble kjørt på råvannstemperatur, mens forsøket med berggylt ble kjørt på vann oppvarmet ved hjelp av varmepumpe (Figur 14). Oksygen ble tilsatt i holdetank for hver fisketetthet, og oksygennivået ble holdt på 90-100 % for rognkjeks, og 85-95 % for berggylt. Led-lysene som ble benyttet i forsøkene ble produsert for Nofima av Evolys as. Disse var enten monokromatisk blått (bølgelengde 450 nm), monokromatisk grønt (520 nm) eller fullspektret klassisk hvitt lys. Lysene ble montert ca. 1,2 m over karene, og kunne dimmes. For å justere lysmengden tilstrekkelig lavt ble det i tillegg montert et eller flere lag med ugjennomsiktige akrylplate over karene. Platene endrer ikke bølgelengden. Det ble kjørt to kar per kombinasjon av bølgelengde og lysmengde. Lysmålinger utført av Evolys før oppstart av forsøket er vist i Tabell 4. To og to kar på samme behandling ble skilt fra de andre karene ved hjelp av svarte plastvegger (Figur 13). Ved utsett av fisk ble lysene som ga de høyeste lysmengdene dempet for å redusere stress på fisken. Lysmengden ble deretter gradvis økt til 20 micromol i løpet av tre dager.



Figur 13 Forsøkskar med grønt (bølgelengde 520nm), blått (bølgelengde 450nm) eller fullspekter hvitt lys. Bildet til høyre viser hvordan lysene var plassert over karene, og hvordan kar med ulik behandling ble skilt ved hjelp av svarte plastvegger.

Effekten av fisketetthet, biomasse og samspillet mellom fisketetthet og biomasse, på hver av de undersøkte egenskapene (vekt, katarakt, finneslitasje, deformitet, halebiting, laktat og glukose i helblod, kortisol og magnesium i plasma) ble undersøkt ved hjelp av en lineær blandet statistisk modell (SAS 9.4-programvare, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) med de nevnte effektene som faste effekter, og kar nesten innen fisketetthet og biomasse som tilfeldig effekt. Effekten av samspillet mellom fisketetthet og biomasse var ikke signifikant ($P > 0.05$) og ble derfor utelatt fra den endelige statistiske modellen.

Effekten av de faste effektene biomasse eller fisketetthet, og av forskjeller mellom to nivå av hver av disse effektene når en eller begge var signifikante, ble vurdert som signifikant for $P < 0.05$.



Figur 14 Vanntemperatur for berggylt i 2016 (blå, oppvarmet) og rognkjeks i 2017 (oransje, råvann).

Registreringer

Ved oppstart 5. juli 2016 (Rognkjeks) og 26. mai 2017 (berggylt) ble lengde, vekt og operative velferdsindikatorer registrert på 20 fisk. I tillegg ble det tatt blodprøve av de samme fiskene for analyse av glukose og laktat i helblod, og kortisol og magnesium i plasma. Ved avslutning 10. august 2016 (Rognkjeks) og 10. august 2017 (berggylt) ble samme registreringer gjort på 20 fisk per kar. Restfisk etter avslutning av forsøket ble bulkveid og talt. Kun blodanalyser fra sluttuttak er tatt med i denne rapporten.

Dødelighet og temperatur ble registrert daglig i begge forsøk. Oksygen ble målt og justert 2-3 ganger hver uke. Det ble veid opp og lagt på nytt fôr på belteautomatene hver annen dag.

Tabell 3 Planlagt forsøksoppsett. To kar per bølgelengde og lysmengde.

Farge	Bølgelengde (nm)	Lysmengde ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)		
		1	5	20
Blå	450	2	2	2
Grønn	520	2	2	2
Hvit	Fullspektret	2	2	2

Lysmålinger

Før forsøket startet ble det foretatt målinger av bølgelengde og lysmengde før og etter justering med opace akrylplater (Intensity LI-192 underwater quantum sensor (LI-COR)). Tabell Y viser ønsket lysmengde og faktisk lysmengde etter justering med akrylplater.

Tabell 4 Bølgelengde (nm) og faktisk og ønsket lysmengde ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

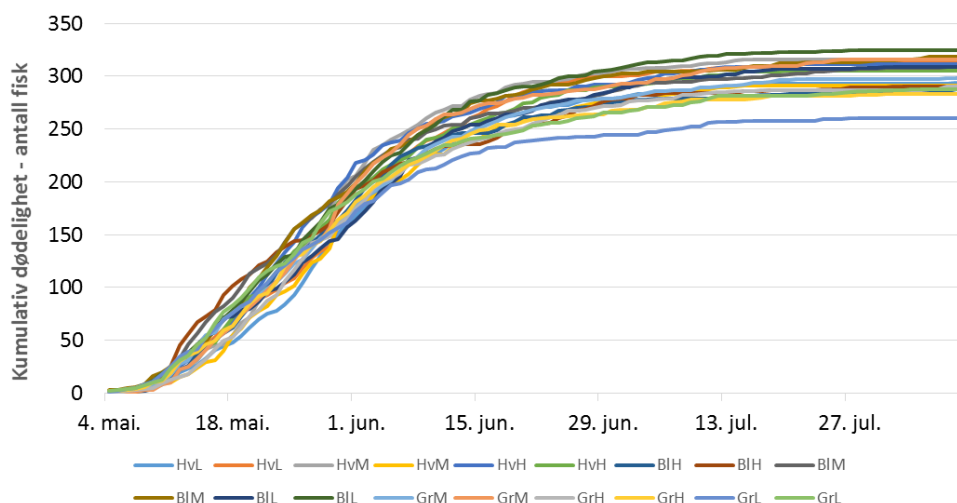
Kar nr	Farge og bølgelengde	Ønsket lysmengde $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Faktisk lysmengde $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
39 og 40	Blå – 450 nm	20	20,63
41 og 42	Blå – 450 nm	5	5,13
43 og 44	Blå – 450 nm	<1	0,84
48 og 49	Grønn – 520 nm	5	5,1
51 og 52	Grønn – 520 nm	20	20,2
55 og 56	Grønn – 520 nm	<1	0,74
33 og 34	Hvit - fullspektret	<1	0,86
35 og 36	Hvit - fullspektret	5	5,15
37 og 38	Hvit - fullspektret	20	20,14

Resultater

Overlevelse og tilvekst

Det var svært liten dødelighet av rognkjeks i løpet av forsøksperioden (0,003 %), og det ble derfor ikke påvist signifikante forskjeller i overlevelse mellom behandlinger.

For berggylt var dødeligheten stor i hele forsøksperioden uten at det ble dokumentert sykdom på fisken (Figur 15). Det var hovedsakelig den minste fisken som døde de første ukene etter transporten fra Fosen til Sunndalsøra. Av velferdsmessige årsaker ble forsøket avsluttet etter ca. 2,5 måneder i samråd med veterinær.

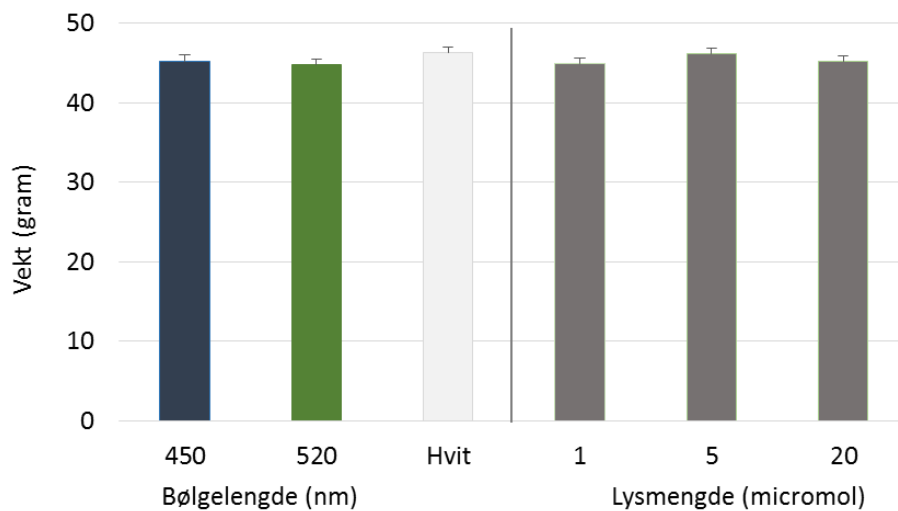


Figur 15 Kumulativ dødelighet (antall fisk) i lysforsøk med berggyt. Bølgelengde: Hv=bredspektret hvit, Bl=blå 450 nm, Gr=grønn 520 nm. Lysmengde: L=1 mmol, M=5 mmol, H=20mmol.

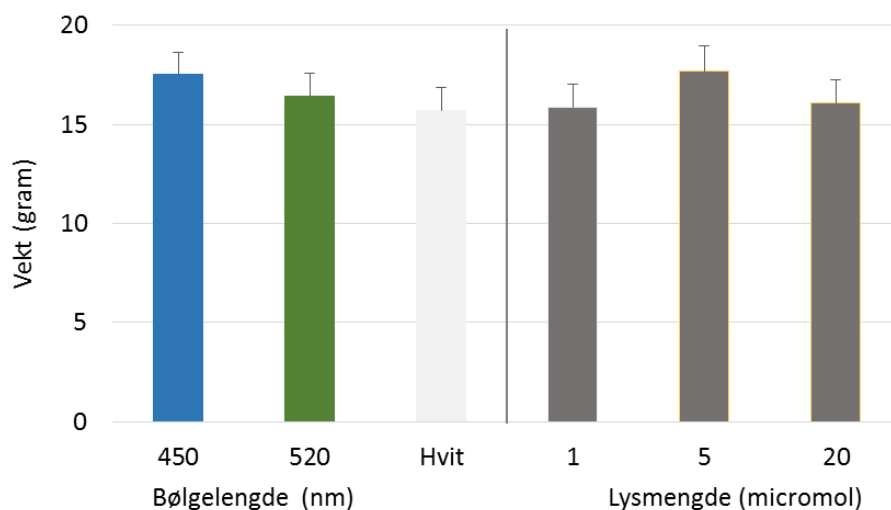
Tilvekst

Gjennomsnittsverken for rognkjeks økte fra 19,5 g ved oppstart til 45,4 g ved avslutning (Figur 16). Det var ingen signifikant effekt av verken bølgelengde eller lysmengde på tilvekst i løpet av forsøksperioden.

Gjennomsnittsverken for berggyt økte fra ca. 2 gram ved oppstart til 16,6 g i løpet av 11 uker (Figur 17). Det var ingen statistisk sikker effekt verken av bølgelengde eller lysmengde.



Figur 16 Rognkjeks: Gjennomsnittlig sluttvekt ($\pm$ se) 10 august 2018, dvs. etter 4 uker ved ulike bølgelengder og lysmengde. Gjennomsnittlig startvekt 2-3 gram.

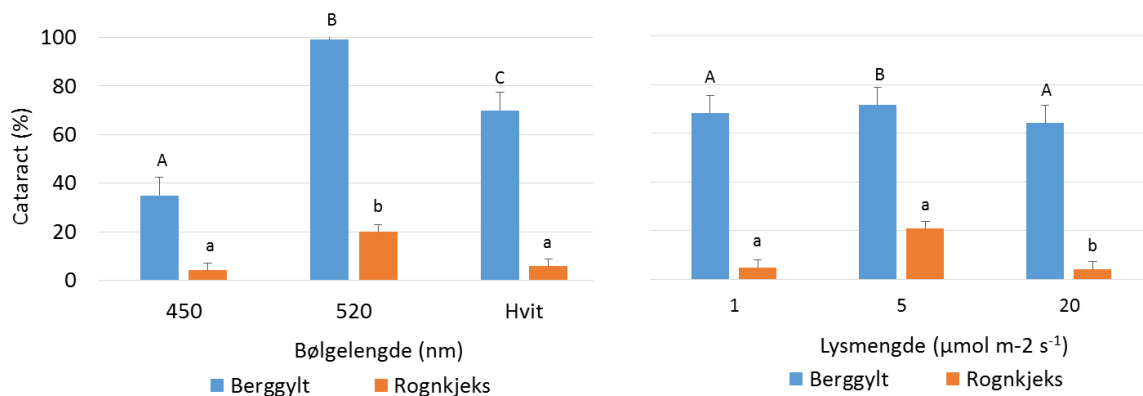


Figur 17 Berggyllt: Gjennomsnittlig sluttvekt ($\pm$ se) 10 august 2017, dvs. etter 11 uker ved ulike bølgelengder og lysmengde. Gjennomsnittlig startvekt 11,3 gram.

Velferdsindikatorer (OVI + LABVI)

Katarakt

Andel fisk med katarakt ble påvirket av både bølgelengde og lysmengde. For begge arter var det høyest andel fisk med katarakt ved bruk av grønt lys (520 nm). For berggyllt var forekomst av katarakt lavest ved bruk av blått lys (450 nm) (Figur 18).

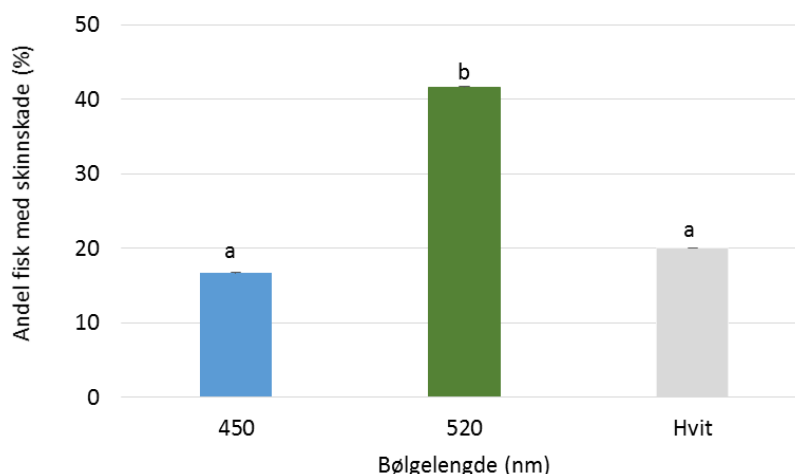


Figur 18 Andel fisk med katarakt ved ulike bølgelengder (nm) og lysmengder ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ($\pm\text{se}$). Ulike bokstaver viser statistisk sikre forskjeller mellom behandlinger.

Skinnskade

Det ble ikke registrert skinnskade hos rognkjeks ved noen av behandlingene.

For berggylt hadde bølgelengde stor betydning for forekomst av skinnskade. Ved bruk av grønt lys (520 nm) var andel fisk med skinnskader mer enn doblet i forhold til ved bruk av blått (450 nm) og bredspektret hvitt lys (Figur 19). Mengde lys påvirket ikke forekomst av fisk med skinnskade.



Figur 19 Andel berggylt med skinnskade (%) ved ulike bølgelengde.

Finneskader/slitasje

Det ble ikke funnet signifikant effekt av bølgelengde eller lysmengde for noen egenskap for verken berggylt eller rognkjeks. Berggylten var produsert ved et kommersielt anlegg, og hadde stor finneslitasje ved oppstart av forsøket, noe som gjorde det vanskelig å påvise eventuelle effekter av lys (Figur 20). Rognkjeks i dette forsøket hadde generelt svært lite finneslitasje.

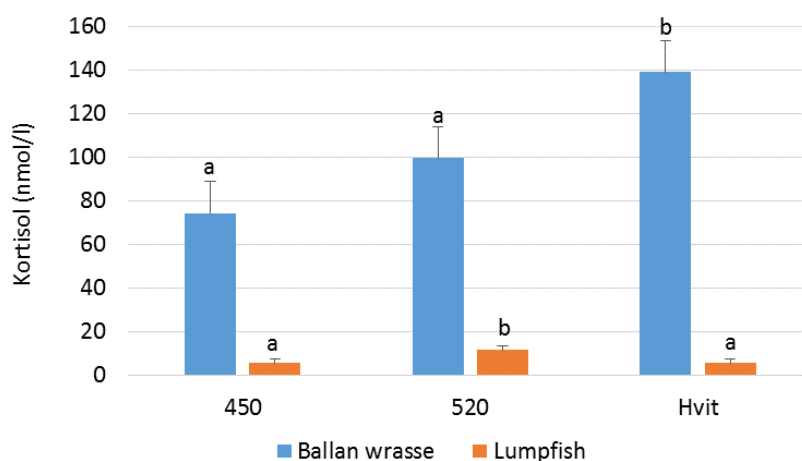


Figur 20 Finnestatus hos berggyt ved oppstart av lysforsøket (til venstre) og hos rognkjeks ved avslutning av lysforsøket (til høyre).

Blodparametere

Kortisol

Det var ulik respons på bølgelengde hos berggyt og rognkjeks. Hos berggyt var kortisolnivået lavest ved blått lys, signifikant høyere ved grønt lys, og høyest ved bruk av bredspektret hvitt lys. For rognkjeks ble det registrert betydelig lavere kortisolverdier, men det var en signifikant økning ved bruk av grønt lys (520 nm) sammenlignet med blått (450 nm) og bredspektret hvitt lys (Figur 21). Selv om kortisolverdiene hos rognkjeks er generelt lave, ble det registrert en dobling i kortisol ved grønt (520 nm) sammenlignet med blått (450 nm) og bredspektret hvitt lys. Mengde lys påvirket ikke kortisolnivået verken hos berggyt eller rognkjeks.

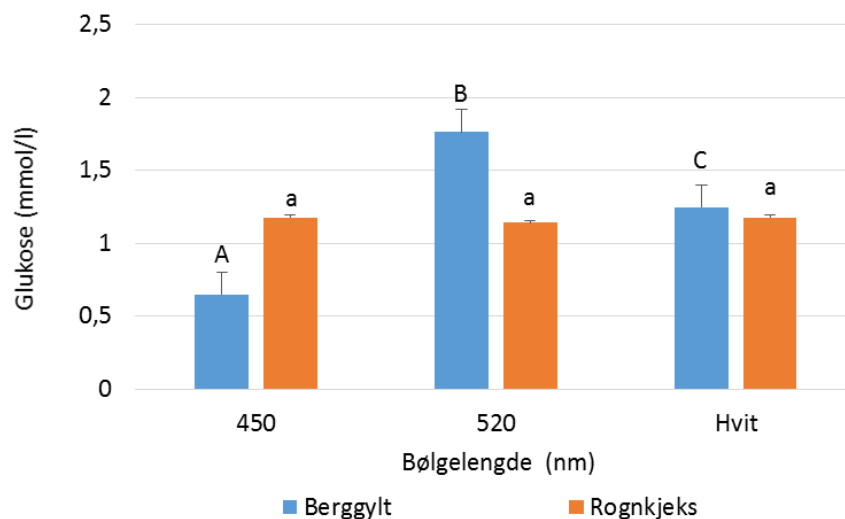


Figur 21 Kortisolnivå hos berggyt og rognkjeks ved bruk av lys av ulik bølgelengde. Ulike bokstaver viser statistisk sikre forskjeller.

Glukose

Det ble ikke påvist noen signifikant effekt av lysmengde på glukosenivået verken for berggylt eller rognkjeks.

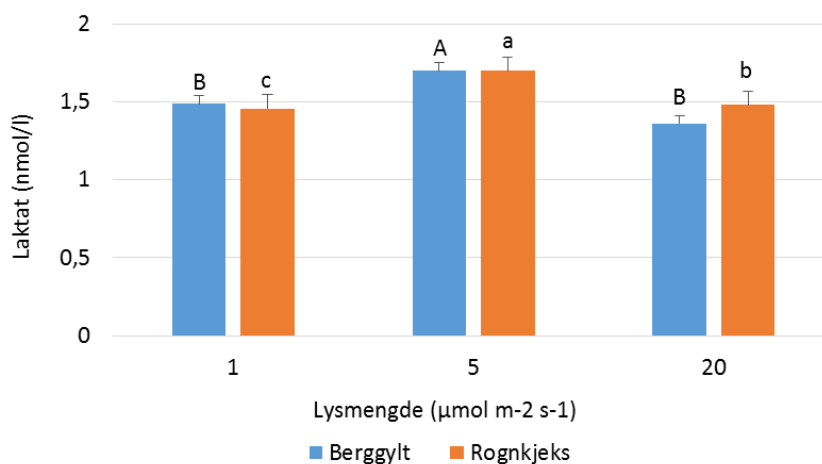
For berggylt var det funnet høyere glukosenivå i blodet ved grønt (520 nm) enn ved blått (450 nm) og bredspektret hvitt lys, mens det ikke ble registrert noen slik signifikant effekt av bølgelengde på glukosenivået hos rognkjeks (Figur 22).



Figur 22 Glukose målt i helblod hos berggylt og rognkjeks som ble gitt lys med forskjellig bølgelengde: 450 nm (blått), 520 nm (grønt) eller bredspektret hvitt lys. Ulike bokstaver viser statistisk sikre forskjeller mellom behandlinger.

Laktat

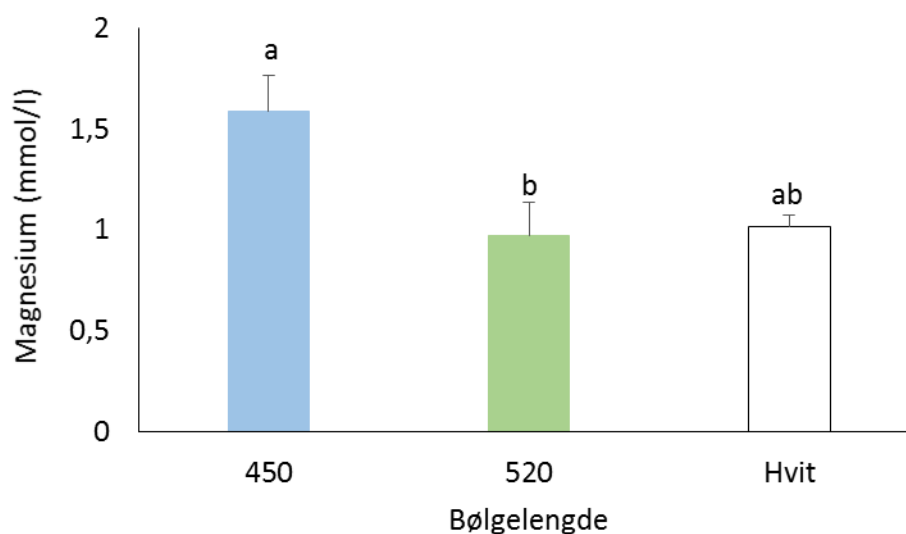
For laktat ble det ikke funnet noen signifikant effekt av bølgelengde verken for berggylt eller rognkjeks. Det ble målt signifikant høyere nivåer av laktat både for berggylt og rognkjeks ved 5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Nivåene er allikevel så lave at de ikke anses ha noen betydning for stressopplevelsen (Figur 23).



Figur 23 Nivå av laktat i helblod hos berggylt og rognkjeks som ble gitt ulik mengde lys (1, 5 eller 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Magnesium

Magnesium (mmol/l) ble målt for rognkjeks. Ved sluttuttaket var Mg høyest for fisken som hadde gått i bølgelengder på 450 nm (blått lys) (Figur 24), men var ikke signifikant høyere enn for hvitt lys



Figur 24 Nivåer av magnesium i rognkjeks ved sluttuttaket.

Atferd

Det ble gjort filmopptak av både berggylt og rognkjeks i forsøkskarene. Det var imidlertid vanskelig å tolke disse opptakene fordi rognkjeksen stort sett oppholdt seg på karvegg og mange av berggyltene søkte seg til skjulene når de ikke ble føret. Det var derfor vanskelig å følge enkeltfisk.

Subjektivt ble det observert at berggylta var mer aktiv, dvs. svømte mer ved grønt lys (520 nm), noe som kan tolkes som en stressatferd.

Diskusjon/konklusjon

Verken bølgelengde (farge) eller lysmengde påvirket overlevelse og tilvekst hos rognkjeks og berggylt.

Generelt ser det ut til at bølgelengde har større effekt på de ulike velferdsmålene enn mengde lys.

For begge arter ga grønt lys (520 nm) høyere andel fisk med katarakt enn blått lys (450 nm). Lysmengde påvirket også forekomst av katarakt, med høyest andel fisk med katarakt ved $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Rognkjeks som ble benyttet i forsøket var av svært god kvalitet, noe som bidro til at det var lav forekomst av finne- og hudskader.

Berggylten som ble benyttet som forsøksfisk var oppdrettet i et kommersielt anlegg, og hadde til dels stor finneslitasje ved ankomst, noe som gjorde det vanskelig å evaluere effekt av lystype og lysmengde på de undersøkte egenskapene.

Kortisol i plasma ser ut til å være en god indikator for stress i begge arter selv om nivåene hos rognkjeks er mye lavere enn hos berggylt. Prosentvis er økningen i cortisol ved stressbelastning like stor som hos berggylt.

Glukose kan være en god stressindikator for berggylt, mens vi så ingen signifikante effekter på glukosenivå hos rognkjeks ved de ulike behandlingene.

Laktat anses ikke som en god velferdsindikator får å evaluere effekt av lys på rognkjeks eller berggylt.

Totalt sett ser det ut til at grønt lys (520 nm) ga mer stress hos begge arter, og at blått lys (450 nm) ga minst stress. Bredspektret hvitt lys er delvis i samme område som blått lys, men for enkelte indikatorer ga det også en viss økning i stress.

Det blå lyset som ble brukt i forsøket vil oppleves som svært ubehagelig for de som skal røyke fisken. En anbefaling kan derfor være å benytte bred- (min-max nm) eller fullspektret (min-max nm) hvitt lys som også inneholder den blå bølgelengden (450 nm).

4.3.2 Vannstrøm berggylt

Berggylt har en naturlig atferd hvor den i lange perioder hviler i hulrom eller blant tang og tare, noe som betyr at den ikke er i kontinuerlig aktivitet. I kommersielt oppdrett holdes gjerne berggylt i kar tilsvarende det som benyttes for torsk og laks. For å oppnå en viss selvrensing i karene benyttes en vannhastighet som kan være for stor for denne arten. Det er observert at fisken svømmer mot strømmen for så å la seg drive med strømmen. Kraftig finnsletasje har vært et vanlig problem i forbindelse med oppdrett av berggylt. Det er mistanke om at for høy vannhastighet i forhold til fiskens svømmekapasitet kan forårsake kronisk stress, noe som kan være negativt for både prestasjon og velferd. Dette kan føre til at blodtilførselen til finnene reduseres, og dermed forårsake sletasje på finnene. Opprinnelig plan for denne arbeidspakken var å definere svømmekapasitet hos berggylt ved korttidseksponering i svømmetunnel og måling av fysiologiske stressparametere i blod, dvs. cortisol, glukose og laktat. Disse resultatene skulle deretter brukes for valg av vannhastighet i langtidsforsøk i svømmekar som skulle klarlegge om kontinuerlig stress påvirker fiskevelferden, spesielt med tanke på finneråte hos berggylt. Dessverre ble det vanskelig å få tilgang til forsøksfisk til dette forsøket, og i samråd med referansegruppen ble det strøket fra listen over forsøk som skulle gjennomføres i prosjektet. Pilotforsøk med berggylt i svømmetunnel er beskrevet nedenfor.

Forsøksoppsett

Beskrivelse svømmetunnel

Et tilfeldig utvalg av 90 fisk ble overført til svømmetunnel og akklimatisert over natt. Hver tunnel består av et 2 m langt transparent PVC-rør (diameter 20 cm) med et vannvolum på 63 liter. Vann fra et 7 m³ reservoar (>85 % O₂) ble pumpet inn i tunnelen hvor vannstrømmen jevnes ut ved hjelp av en «bikube»-forsats (0,5 m) i forkant av selve svømmekammeret. I bakkant av tunnelen føres vannet tilbake til reservoar-tanken. Svømmetesten utføres ved en gradvis økning av vannhastigheten basert på en standard protokoll (Zhang et al. 2016) til fisken ikke klarer å motstå strømmen, og fanges opp i et nett bakerst i tunnelen. Fisken tas ut gjennom en luke i tunnelen, og tid og vannhastighet for hver enkelt fisk registreres. Etter testen ble fisken avlivet med en overdose Finquel før registrering av vekt, lengde, ytre velferdsindikatorer og blodprøver for måling av metabolske indikatorer (glukose og laktat).

Critical swimming speed (U_{crit}) ble estimert i henhold til Brett (1964):

$$U_{crit} = U + (t/t_i \times U_i)$$

Hvor U er den siste hastigheten (m/s), U_i er økning i vannhastighet (0.05 m/s), t er varighet av svømming ved den siste hastigheten (min) and t_i er tidsintervall for hver økning (15 min).

Fisk som ikke ble utsatt for svømmetesten ("hvilere") ble brukt som kontroll for å studere effekt av svømming på metabolske blodparametere.

Resultater

Morfometri

Tabell 5 viser en oversikt over lengde og vekt på forsøksfisken. Fisken hadde en gjennomsnittsvekt på 30 gram, og en gjennomsnittlig lengde på 11 cm. Dette er en vanlig størrelse på berggylt ved utsett i merd sammen med laksesmolt.

Berggylt er en fisk som akselerer ved bruk av brystfinnene, og delvis med bakre del av ryggfinnen. Berggylten som ble benyttet i forsøket var produsert i et kommersielt anlegg, og hadde mye finneslitasje/-erosjon allerede ved ankomst til Nofima. Det ble registrert finneslitasje på nesten all fisk, og da spesielt på brystfinnene. Dette er noe som må tas i betraktning ved vurdering av resultatene fordi slik slitasje/erosjon kan ha påvirket svømmekapasiteten hos forsøksfisken.

«Hvilere»

Hvilende fisk ble ikke overført til svømmetunnel eller U_{crit} testen. Laktatnivå i blodet hos hvilende fisk lå i gjennomsnitt på $1,6 \pm 0,2$ mmol L⁻¹, og glukose på $0,8 \pm 0,1$ mmol L⁻¹ (Tabell 5).

Ikke-svømmere

Under akklimatiseringsperioden, hvor det ble gjort en økning i strømhastighet fra 0,01 to 0,05 m s⁻¹ for å stimulere fisken til å svømme, observerte vi en god del fisk som sto i nettet ved enden av tunnelen. Det er usikkert om disse fiskene var «fanget» i nettet, men de ville ikke begynne å svømme selv etter en forsiktig dytt i riktig retning.

I de to første U_{crit} forsøkene ville henholdsvis 46 % og 51 % av fisken ikke svømme. Det ble tatt blodprøver av 11 og 10 svømmere i det første og andre forsøket. I det første forsøket ble blodprøvene tatt 1 time etter første økningen i strømhastighet, mens tilsvarende prøver ble tatt allerede etter 5 minutter i det andre forsøket. Glukosenivå i blodet økte i begge forsøkene sammenlignet med hvilende fisk som hadde et glukosenivå på $0,8 \pm 0,1$ mmol L⁻¹. Nivået hos fisk fra Forsøk 1 og 2 hadde til sammenligning et glukosenivå på henholdsvis $1,7 \pm 0,2$ mmol L⁻¹ og $1,4 \pm 0,3$ mmol L⁻¹. Det ble registrert noe økning i laktat i Forsøk 2, men denne økningen var ikke statistisk sikker (Tabell 5).

Kritisk svømmehastighet (U_{crit})

Fisken så ut til å forsøke å svømme i ytterkant av svømmetunnelen, og ved vanninntaket. Vannhastigheten er trolig noe redusert i disse områdene på grunn av veggeffekten.

I det første forsøk varierte U_{crit} fra 9 til 46 cm s⁻¹, med et gjennomsnitt på $29,6 \pm 0,02$ cm s⁻¹. Dette tilsvarer $2,5 \pm 0$, kroppslengder (BL s⁻¹). Ved slutten av forsøket oppholdt flere fisk seg nær

vanninntaket. Det var spesielt en fisk som stod ved inntaket, og ikke taklet økning i vannstrøm. Denne ble utelatt i videre analyser angående svømmehastighet.

U_{crit} i det andre forsøket var lavere enn i det første. Resultatene varierte fra 5 til 38 cm s^{-1} , med et gjennomsnitt på $17,4 \pm 2,7 \text{ cm s}^{-1}$. Dette tilsvarer $1,5 \pm 0,3 \text{ BL s}^{-1}$. Som i det første forsøket var det en fisk som stod ved inntaket, og ikke taklet økning i vannstrøm. Denne ble også utelatt i videre analyser angående svømmehastighet.

Glukosenivået i blodet økte hos svømmende fisk fra begge forsøkene sammenlignet med hvilende kontrollfisk, mens det ikke ble registrert store forskjeller i laktatnivå (Tabell 5). Laktatnivåene var for øvrig høyere hos ikke-svømmere sammenlignet med svømmende fisk i det andre forsøket

Tabell 5 Oversikt over vekt, lengde, U_{crit} (cm/sek), U_{crit} (Kroppslengde/sek), laktat og glukose i blod. Standardfeil er vist bak hver verdi. Ulike bokstaver viser signifikante forskjeller.

	Vekt (g)	Lengde (cm)	U_{crit} cm/sek	U_{crit} BL/sek	Laktat mmol/l	Glukose mmol/l
Hvilende fisk	31,7±2,4	11,0±0,3			1,6±0,2 ^a	0,8±0,1 ^a
Ikke-svømmere Forsøk 1	28,7±1,6	10,7±0,2			1,6±0,2 ^a	1,7±0,2 ^b
Ikke-svømmere Forsøk 2	34,2±1,4	11,2±0,2			2,5±0,5 ^b	1,4±0,3 ^b
Svømmere Forsøk 1	33,9±8,2	11,3±0,8	29,6±1,8	2,5±0,9	1,5±0,7 ^a	1,6±0,6 ^b
Svømmere Forsøk 2	32,4±2,1	11,0±0,2	17,4±2,7	1,5±0,3	1,5±0,1 ^a	1,4±0,1 ^b

Konklusjoner

Basert på resultatene fra disse to pilotstudiene ser berggylt med ca. 11 cm kroppslengde ut til å ha en kritisk svømmekapasitet i området 20-30 cm/sek, noe som tilsvarer 1,5-2,5 kroppslengder/sekund. Dette er imidlertid kun basert på de fiskene som svømte. Nesten halvparten av fisken så ikke ut til å ville svømme, og oppholdt seg i bakre del av svømmetunnelen. Fisk som ikke vil svømme er ikke uvanlig under eksperimentelle forhold, og kan være en strategi i forhold til et nytt, og trolig stressende miljø. Videre så berggylta i begge forsøk ut til å prøve å unngå sterk vannstrøm ved å svømme nær veggen og innløpet av tunnelen, dvs. områder hvor vannstrømmen trolig er redusert i forhold til resten av tunnelen. Dette bør tas med i betraktningen når en strømsetter oppdrettskar.

4.3.3 Grenseverdi for oksygen hos berggylt

I intensivt oppdrett kan fisk oppleve hyperoksi eller hypoksi, dvs. situasjoner med svært høyt eller lavt oksygen, som begge kan ha negative effekter på fiskevelferd og prestasjon. Hypoksi er definert som konsentrasjon av løst oksygen under grensen for hvor fysiologiske funksjoner hemmes. Målet med forsøket var å undersøke hvordan ulike nivåer av løst oksygen påvirker overlevelse, vekst og fiskevelferd hos berggylt for å kunne gi råd om oksygenbehov og grenseverdier hos berggylt i en oppdrettssituasjon. I tillegg til vekst, kondisjonsfaktor og overlevelse ble en rekke responsvariable registrert (se nedenfor). Dette forsøket ble i hovedsak gjennomført av Katie Gaffney som en del av hennes Master ved University of Highlands and Islands i Skottland.

Forsøksoppsett

Forsøket ble gjennomført med 20-30 grams berggylt fra en kommersiell aktør. Fisken ble transportert i tank med oksygentilsetning til Sunndalsøra. For å redusere stress under transport ble fisken sedert med Aqui-S. Etter en måned ble fisken fordelt i 16 forsøkskar med flat bunn, vertikale innløp, volum 90 liter. Karene fikk dempet lys fra (25-44 lux ved overflaten), og var utstyrt med rist over karene for å hindre hopping. Vannhastigheten ble stilt lavt, $<0,01$ m/s. Hvert kar var utstyrt med en mini «kinatare» for å gi fisken mulighet for skjul og hvile. Vannet ble filtrert til $20\text{ }\mu\text{m}$ i trommelfilter før UV-behandling, og deretter filtrert gjennom 5 og $1\text{ }\mu\text{m}$ patronfilter. Hvert kar var utstyrt med belteautomat, og fisken ble føret kontinuerlig med Otohime C2. Ved oppstart var gjennomsnittsvekten $34 \pm 2,6$, og fisketettheten $\sim 18\text{ kg/m}^3$. Fire nivå av oksygen ble testet: 75, 85, 100 og 125 %.

Alle nivåene som ble testet ligger innenfor området som benyttes i kommersielle klekkerier. Hvert oksygennivå ble testet i fire parallelle kar med unntak av 85 % hvor det oppsto høy dødelighet i ett kar i akklimatiseringsperioden, og derfor ble avsluttet. For å redusere nivået til 73 % ble oksygen fjernet ved hjelp av vakumlufter. For å oppnå 125 % ble oksygen tilsatt i holdetank før vannet ble pumpet til forsøkskarene. Oksygen ble logget kontinuerlig, og også målt manuelt to ganger daglig.

Svømmeatferd ble filmet etter 3 og 6 uker. Ved avslutning av forsøket etter 6 uker ble det tatt prøver av 20 fisk per kar for vekt, lengde, glukose, laktat og pH i blod, og kortisol og magnesium i blodplasma. Ved samme tidspunkt ble fisk fra alle behandlinger kjørt i svømmetunnel for å undersøke om oksygennivåene påvirket kritisk svømmehastighet (U_{crit}).

Resultater

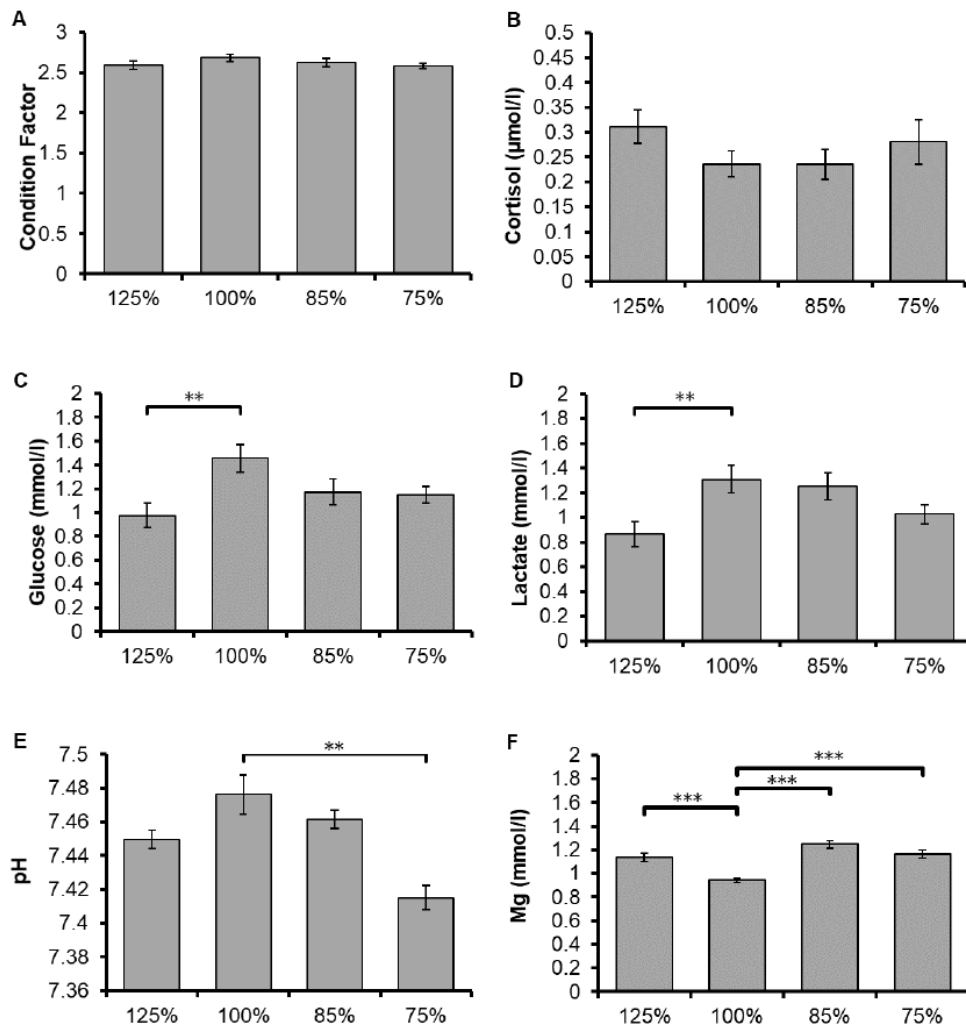
Overlevelse og prestasjon

Det ble ikke funnet statistisk signifikante forskjeller i overlevelse eller kondisjonsfaktor. Gjennomsnittlig overlevelse var ca. 75 % etter 6 ukers eksponering til de fire oksygennivåene. Det var heller ingen statistisk signifikante forskjeller i vekst i samme periode.

Effekt av oksygennivå på stressparametere

Oksygennivå hadde ingen statistisk signifikant effekt på kortisollnivået i blodplasma (Figur 25 B). Det høyeste oksygennivået (125 %) resulterte i redusert glukose ($0,98 \pm 0,1$ mmol/l, $p = 0,02$) og laktatnivåer ($0,87 \pm 0,1$ mmol/l, $p = 0,01$) sammenlignet med 100 % oksygen (glukose = $1,46 \pm 0,12$ mmol/l, laktat = $1,31 \pm 0,11$ mmol/l) (Figur 25 C,D).

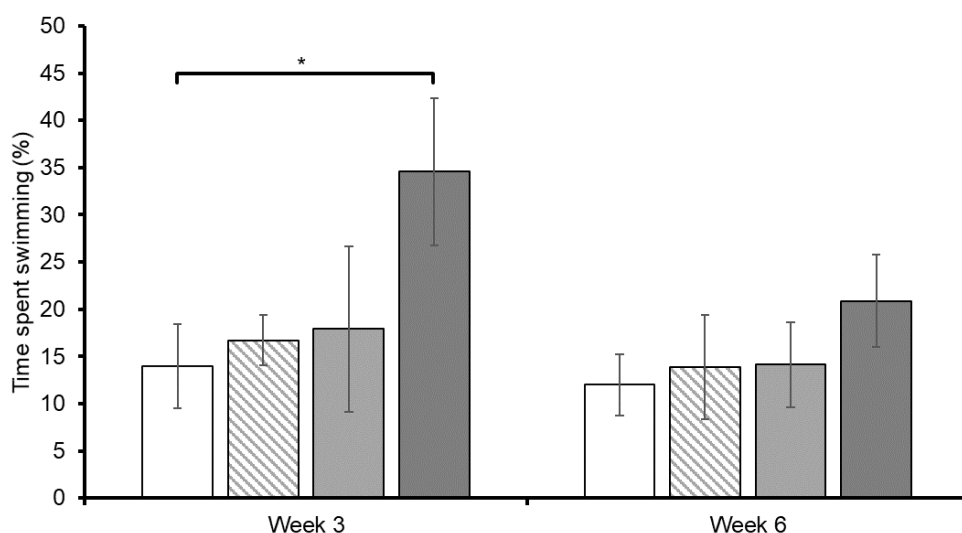
pH i blodet var høyere ved 100 % oksygen ($\text{pH } 7,48 \pm 0,01$, $p = 0,005$) enn ved 75 % ($\text{pH } 7,42 \pm 0,01$, Figur 25 E). Magnesium var signifikant lavere ved 100 % oksygen enn ved alle de andre nivåene ($p < 0,001$, Figur 25 F).



Figur 25 Kondisjonsfaktor (A) cortisol i plasma (B), glukose (C), laktat (D), pH blod (E) og magnesium i plasma (F) hos berggylt etter 6 ukers eksponering for 125 %, 100 %, 85 % eller 75 % løst oksygen. Standardfeil er vist på søylene, stjernene visere statistisk signifikante forskjeller mellom behandlinger.

Atferdsmålinger

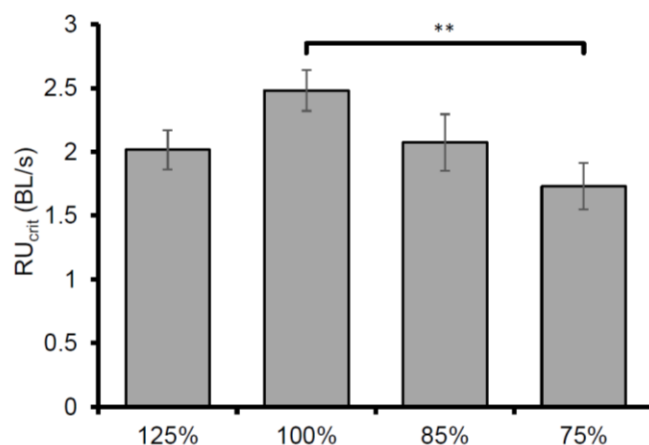
Etter 3 og 6 uker (avslutning) ble fiskens svømmeaktivitet filmet i et av fire kar for hver behandling for å undersøke om oksygen påvirker svømmeaktiviteten. I løpet av en 10 minutters periode ble 10 tilfeldig valgte fisk fulgt for å måle hvor mye av tiden fisken brukte til svømming. Tiden brukt på svømming endret seg ikke mellom uke 3 og 6. Ved målingene i uke 3 ble det registrert en statistisk signifikant forskjell i svømmeaktivitet mellom 75 % oksygen og 125 % oksygen, hvor fisk på 125 % svømte mindre ($13,95 \pm 4,4$ %) enn fisk på 75 % oksygen ($34,55 \pm 3,2$ %, Figur 26). Denne forskjellen ble ikke registrert ved målingene etter 6 uker.



Figur 26 Prosent av tiden som berggylt svømte i løpet av en 10-minutters periode etter 3 og 6 ukers eksponering til 125 % (hvit), 100 % (skravert), 85 % (lys grå) eller 75 % (mørk grå) løst oksygen. Standardfeil er vist på søylene, stjernene visere statistisk sikre forskjeller mellom behandlinger.

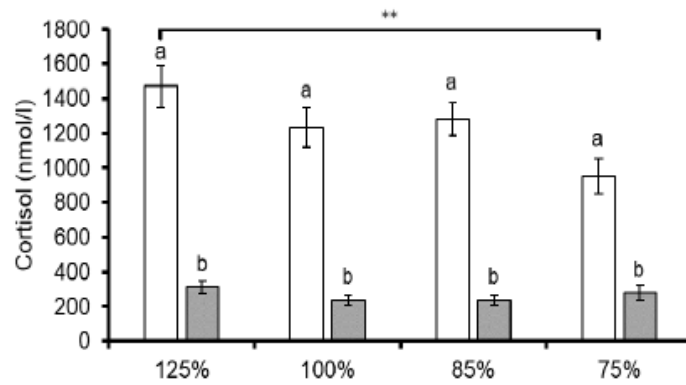
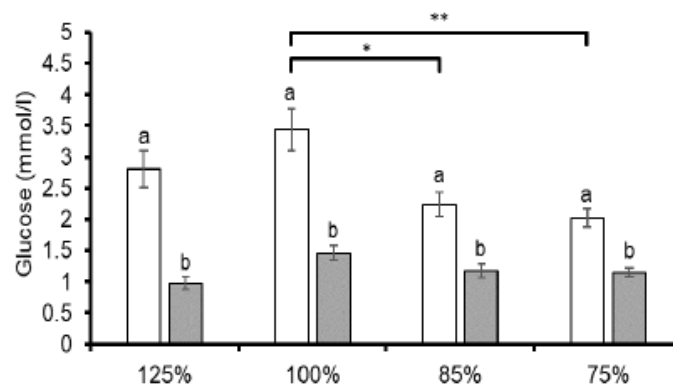
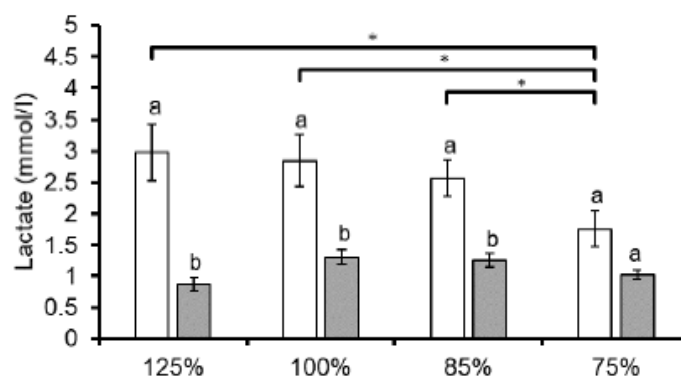
Kritisk svømmehastighet og effekt av oksygennivå

Ved avslutning av forsøket etter 6 uker ble U_{crit} målt for å vurdere betydningen av oksygennivå på svømmeaktivitet. Relativ U_{crit} ($RU_{crit} = U_{crit}/BL$) ble brukt for å standardisere for kroppslengde. En andel av fisken i hvert forsøk ville ikke svømme (125 % = 12,5 % av fisken, 100 % = 14,8 %, 85 % = 13,0 %, 75 % = 18,5 %), og ble derfor ekskludert fra de videre analysene. Det ble funnet en statistisk signifikante effekter av oksygennivå på RU_{crit} mellom 75 % og 100 % oksygen (75 % = $1,7 \pm 0,18$ BL/s; 100 % = $2,5 \pm 0,16$ BL/s, (Figur 27).



Figur 27 Relativ kritisk svømmehastighet RU_{crit} etter 6 ukers eksponering til 125 %, 100 %, 85 % eller 75 % løst oksygen. Standardfeil er vist på søylene, stjernene visere statistisk sikre forskjeller mellom behandlinger.

Fisken som svømte til utmattelse hadde høyere plasmakortisol og glukosenivå i blodet enn baseline- fisken (Figur 28 A/B). Nivået av laktat var også høyere i alle grupper sammenlignet med baseline-fisken, bortsett fra 75 % oksygen (Figur 28 C).

A**B****C**

Figur 28 Konsentrasjon av kortisol i plasma (A), glukose (B) og laktat (C) etter 6 ukers eksponering til 125 %, 100 %, 85 % eller 75 % oksygen hos fisk som svømte til utmattelse (hvit) og baseline-fisk (grå). Standardfeil er vist på søylene. Ulike bokstaver viser statistisk sikre forskjeller innen hvert oksygennivå før og etter svømming. Stjerner indikerer forskjeller mellom oksygennivåer for fisk som svømte til utmattelse.

De to laveste oksygennivåene resulterte i signifikant lavere glukosenivå ($75\% = 2,02 \pm 0,15$ mmol/l, $85\% = 2,24 \pm 0,19$ mmol/l) enn ved 100% oksygen ($3,44 \pm 0,34$ mmol/l). Fisk holdt ved 75% oksygen hadde signifikant forskjellig laktatnivå ($1,76 \pm 0,29$ mmol/l) sammenlignet med alle de andre behandlingene ($125\% 2,98 \pm 0,45$ mmol/l; $100\% 2,85 \pm 0,41$ mmol/l; $85\% 2,57 \pm 0,29$ mmol/l). Det var ingen forskjell i laktatnivå mellom de andre tre behandlingene (Figur 28).

Konklusjoner

Oksygenområdet som ble testet i dette forsøket (75% - 125% løst oksygen) påvirket ikke overlevelsen.

Stressparameteren plasmakortisol ble ikke påvirket av mengde løst oksygen. Glukose og laktat var imidlertid redusert ved 125% oksygen, noe som indikerer en endring i metabolismen til hyperoksi.

Det er interessant at magnesium var signifikant lavere ved 100% oksygen sammenlignet med de andre behandlingene. Magnesium kan brukes som en sekundær stressindikator, og stress kan føre til nedsatt evne til osmoregulering. Dette kan i sin tur lede til en økning i divalente kationer. Magnesium kan være en sensitiv indikator for sub-optimale oksygenforhold, og våre resultater indikerer at alle behandlingene under og over 100% allerede påvirker fiskevelferden.

Fisk fra behandlingen 75% løst oksygen hadde klart lavere U_{crit} enn fisk holdt på 100% oksygen, noe som indikerer at 75% oksygen har en fysiologisk negativ effekt hos berggylt. Dette understøttes av lavere laktatnivå etter svømming til utmattelse.

4.3.4 Tettet av fisk – rognkjeks

Tetthet av fisk kan påvirke både velferd og ytelse hos fisken. Det benyttes per i dag ulike tettheter av rognkjeks i kommersiell produksjon. Dette forsøket ble gjennomført for å undersøke hvordan ulike tettheter for ulike fiskestørrelser påvirker prestasjon, overlevelse og fiskevelferd hos rognkjeks.

Forsøksopplegg

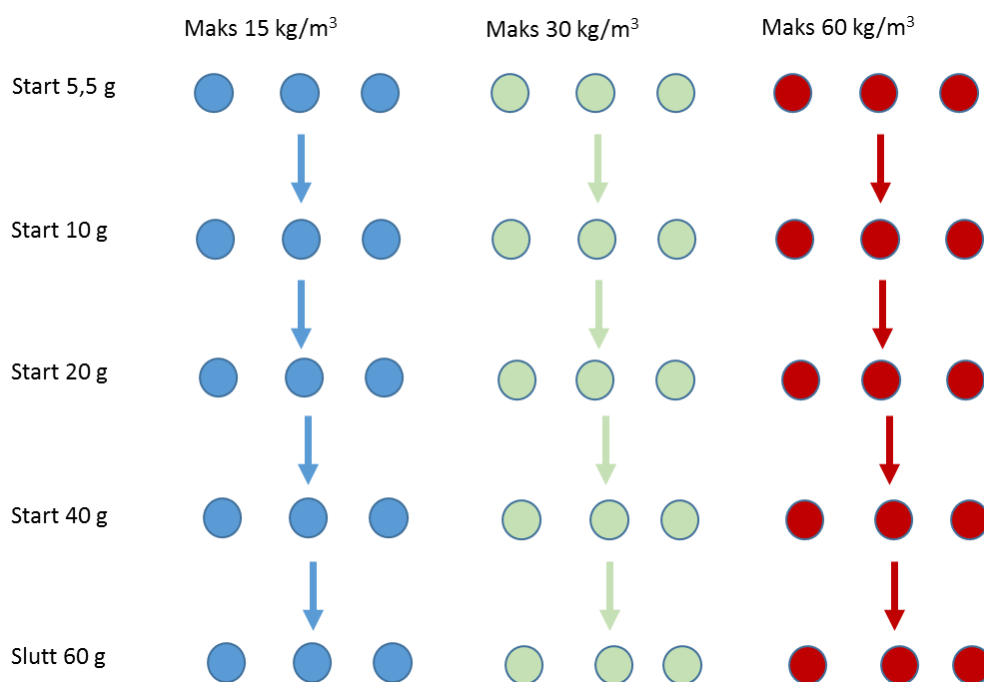
Forsøket ble gjennomført ved Nofima på Sunndalsøra i perioden 17.10.2016-27.01.2017. Forsøket ble kjørt i 150 liters grå kar med konisk bunn, tre kar per fisketetthet (Figur 29 og 30). Karene var utstyrt med transparent lokk, belteautomat med føring hvert 10. minutt, og separate lys over hvert kar som eneste belysning. Fisken ble føret etter appetitt, dvs. justert etter førspill. Karene hadde vertikalt fiksert innløp med flere hull for å få maksimal sirkulasjon i karet, og med 4 liter råvann/min per kar. Vanntemperaturen ble logget kontinuerlig (Figur 31). Saliniteten varierte fra 32.1 til 33 ppt. Oksygen ble tilsatt i separat holdetank for hver fisketetthet, og en hadde som mål å holde oksygennivået mellom 90 og 100% , og oksygennivået ble justert daglig om nødvendig. I tillegg ble CO_2 -nivået i utløp i hvert kar målt to ganger i løpet av forsøksperioden (01.11.2016 og 18.11.2016) for å undersøke om fisketettheten hadde stor påvirkning på vannkvaliteten. CO_2 -konsentrasjonen ble målt ved bruk av en Franatech CO_2 -sensor.

Forsøket ble gjennomført med rognkjeks som var klekket fra villfisk, og startføret på tørrfôr ved Nofima på Sunndalsøra. Før forsøksstart ble fisken sortert med rist for å oppnå mest mulig jevn størrelse. Fisken ble deretter fordelt i 9 kar; tre parallell kar med biomasse $7,5 \text{ kg/m}^3$ per kar, tre kar med 15 kg/m^3 og tre kar med 30 kg/m^3 (Figur 30). Fisken gikk usortert til den hadde doblet vekten til maksimal biomasse på 15, 30 eller 60 kg/kar . Da ble det gjennomført prøveuttak hvor vekt, lengde og OVI'er ble registrert på et tilfeldig uttak av 20 fisk per kar som ble målt (vekt og lengde), dvs. totalt 60 fisk per

tetthet. Fra disse fiskene ble det også tatt blodprøve for måling av glukose og laktat i helblod, og analyse av kortisol i plasma. Deretter ble det tatt bulkvekt av resterende fisk i karet, og biomassen per kar ble redusert til 7,5, 15 eller 30 kg per kar. Deretter gikk fisken fram til den igjen hadde doblet vekten, og samme prosedyre for prøvetaking og biomassereduksjon ble gjentatt til fisken nådde en sluttvekt på ca. 60 gram. Dobling av vekten ble nådd etter 16 (5-10 g), 35 (10-20 g), 60 (20-40 g) dager. Forsøket ble av praktiske årsaker avsluttet etter 77 dager når fisken hadde nådd 60 gram, dvs. at gjennomsnittsvekten ikke doblet seg, men økte fra 40-60 g i siste periode.

Statistiske analyser

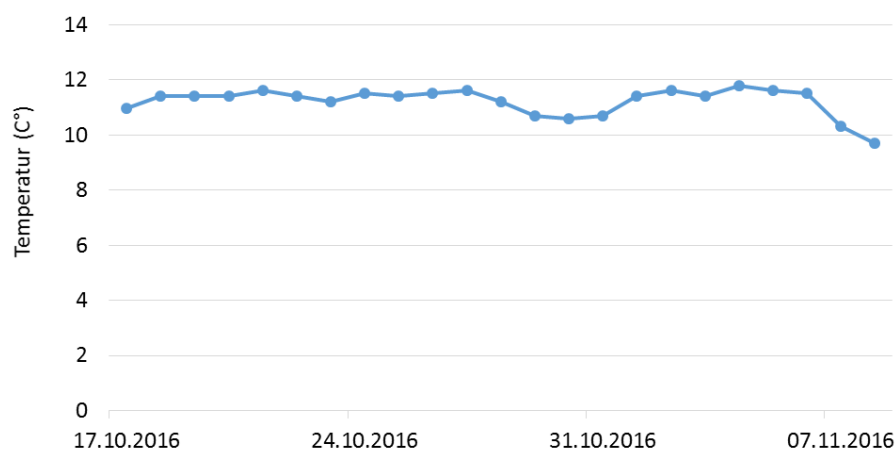
Effekten av fisketetthet, biomasse og samspill mellom fisketetthet og biomasse, på hver av de undersøkte (vekt, katarakt, finneslitasje, deformitet, halebiting, laktat og glukose i helblod, kortisol i plasma) ble undersøkt ved hjelp av en lineær blandet statistisk modell (SAS 9.4-programvare, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) med de nevnte effektene som faste effekter, og kar nestet innen fisketetthet og biomasse som tilfeldig effekt. Effekten av samspillet mellom fisketetthet og biomasse var ikke signifikant ($P > 0.05$) og ble derfor utelatt fra den endelige statistiske modellen. Effekten av de faste effektene biomasse eller fisketetthet ble vurdert som signifikant for $P < 0.05$, og forskjeller mellom to nivå av hver av disse effektene ble vurdert som signifikant for $P < 0.05$.



Figur 29 Forsøket ble gjennomført med tre kar per behandling, dvs. fisketetthet. Etter ca. dobling av gj.snitt vekten i karet ble biomassen redusert til halvparten av maksimal tillatt biomasse, dvs. 7,5, 15 og 30 kg/m³.



Figur 30 Tetthet ved oppstart av forsøket når fisken var 5,5 g. Start-biomasse 7,5 kg/m³ til venstre, 15 kg/m³ i midten, og 30 kg/m³ til høyre.



Figur 31 Temperaturene i forsøksperioden (råvann). Saliniteten varierte fra 32,1 til 33 ppt.

Resultater

Overlevelse

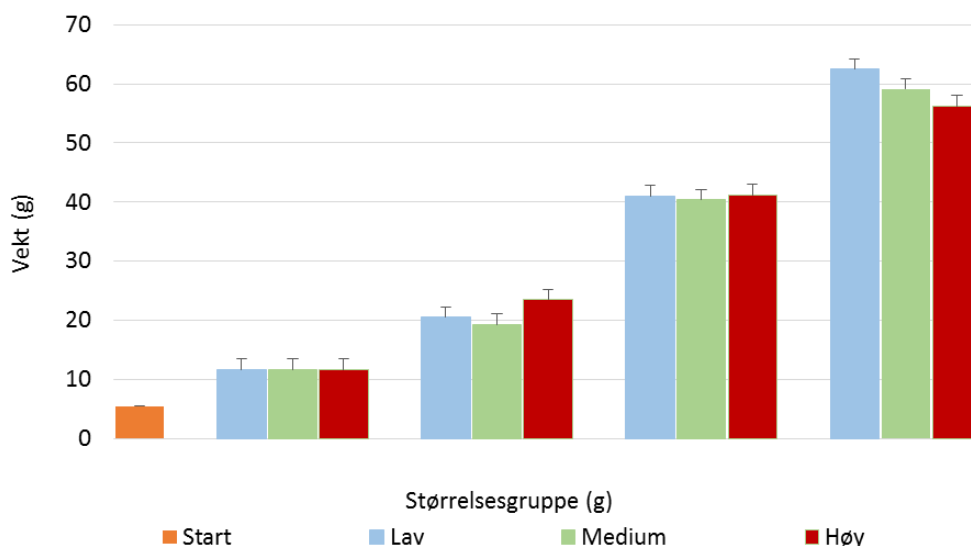
Overlevelsen var høy gjennom hele forsøksperioden (Tabell 6). Det ble ikke funnet statistisk signifikante forskjeller i overlevelse mellom de ulike fisketetthetene for noen av størrelsesgruppene.

Tabell 6 Overlevelse (% ± se) fra start til avslutning etter 14,5 uker for hver av de fire størrelsesgruppene (prøveuttak? S1, S2, S3 og S4) ved de tre tetthetene av fisk.

		Overlevelse, %			
Biomasse/m ³		5,5-10 g (S1)	10-20 g (S2)	20-40 g (S3)	40-60 g (S4)
Lav	7,5-15 kg/m ³	97,0 ±1,1	99,6 ±0,6	99,4 ±1,0	100 ±0,0
Medium	15-30 kg/m ³	96,8 ±1,1	98,7 ±1,0	99,7 ±0,5	99,7 ±0,6
Høy	30-60 kg/m ³	96,1 ±1,0	99,1 ±0,4	99,6 ±0,0	99,7 ±0,5

Tilvekst

Gjennomsnittsvekter ved de fire prøvetidspunktene er vist i Figur 32. Det var liten forskjell i tilvekst for de ulike tetthetene av fisk, og det ble ikke funnet statistisk signifikante forskjeller mellom de ulike behandlingene for noen av størrelsesgruppene. Det var likevel en tendens til lavere vekst ved den høyeste tettheten for siste periode (40-60 g).

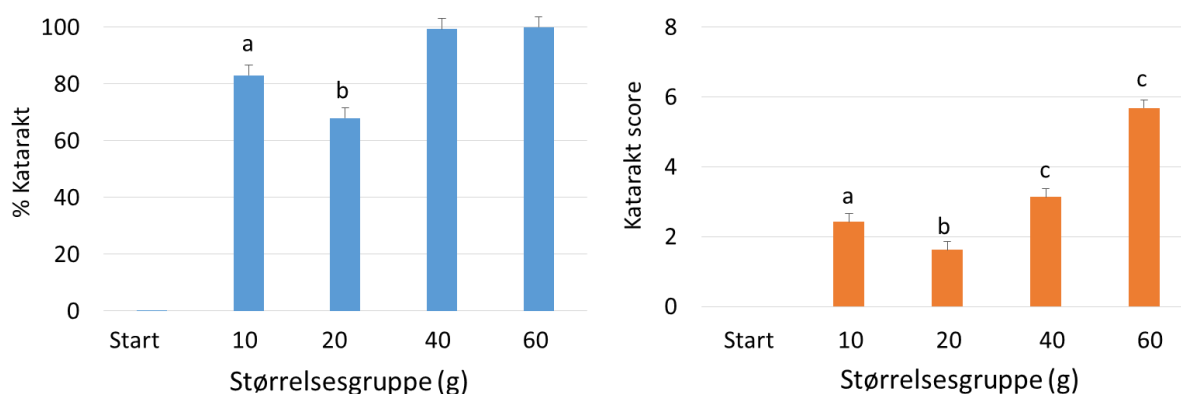


Figur 32 Figuren viser startvekt og snittvekt ($\pm$ se) for hver tettet ved avslutning av hver periode (S1-S4).

Velferdsindikatorer (OVI + LABVI)

Katarakt

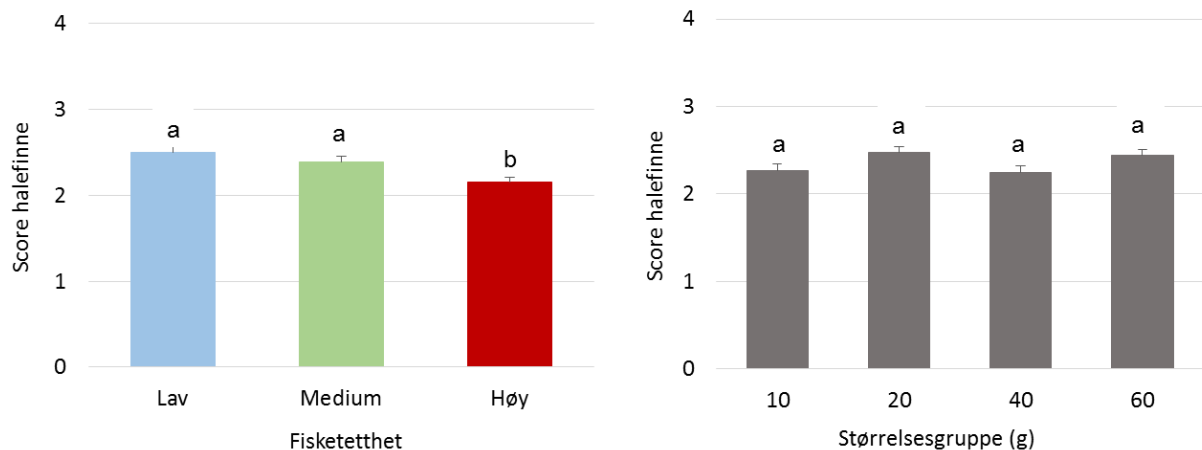
Andel fisk med katarakt var høy ved alle prøvetidspunkt (69-99 %). I løpet av forsøksperioden (5,5-60 g) var det en statistisk signifikant økning både i andel fisk med katarakt, og alvorlighetsgraden av katarakt (Figur 33). Andel fisk med katarakt var ikke påvirket av fisketetthet.



Figur 33 Figuren til venstre viser andel fisk ($\% \pm$ se) med katarakt ved de forskjellige prøveuttakene (S1-S4). Figuren til høyre viser alvorlighetsgrad av katarakt (gj.snitt skår $\pm$ se) ved de ulike tidspunktene. Ulike bokstaver viser statistisk signifikante forskjeller.

Halefinneslitasje

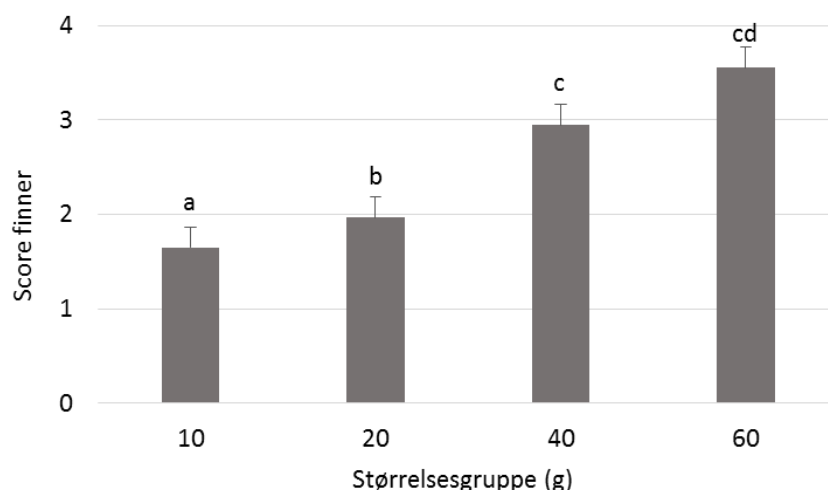
Slitasje på halefinnen er svært vanlig hos rognkjeks. 96-100 % av fisken i dette forsøket ble vurdert til å ha slitasje på halefinnen. Når det gjelder alvorlighetsgraden (skår) lå denne mellom 2 og 2,5 på en skala fra 0 til 4. Skår for halefinneslitasje var signifikant lavere hos fisk på den høyeste tettheten sammenlignet med fisk på både lav og middels fisketetthet, selv om disse forskjellene ikke var veldig store (Figur 34). Det ble ikke funnet statistisk sikre forskjeller mellom tidspunkt hvor fisken ble vurdert (S1-S4), dvs. alvorlighetsgraden utviklet seg ikke over tid (Figur 34).



Figur 34 Alvorlighetsgrad av halefinneslitasje ved ulik fisketetthet (gj.snitt score ± se), og ved de ulike prøvetakingstidspunktene (S1-S4) (gj.snitt score ± se).

Bryst-, gatt- og ryggfinneslitasje

Resultatene for slitasje på bryst, rygg og gattfinner er slått sammen. I dette forsøket hadde 75-99 % av fisken slitasje på en eller flere av disse finnene. Det ble imidlertid ikke funnet noen statistisk signifikant effekt av fisketetthet verken på forekomst av finneslitasje eller alvorlighetsgrad av finneslitasje. Derimot ble det funnet at alvorlighetsgraden økte kraftig utover i forsøksperioden (10-60 g) (Figur 35).



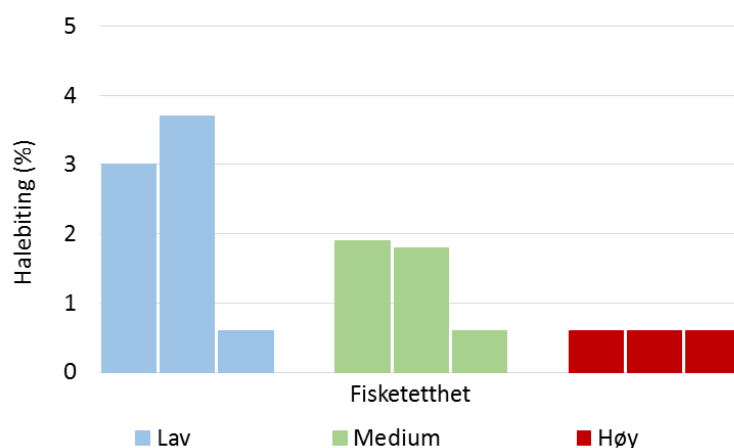
Figur 35 Alvorlighetsgraden av finneslitasje (gj.snitt skår ± se) ved de ulike uttakene. Ulike bokstaver viser statistisk sikre forskjeller.

Deformiteter

Vi fant ikke forekomst av ryggdeformiteter, kjevedeformiteter, gjellokkdeformiteter eller deformerte sugekopper på noen av fiskene i noen av behandlingene.

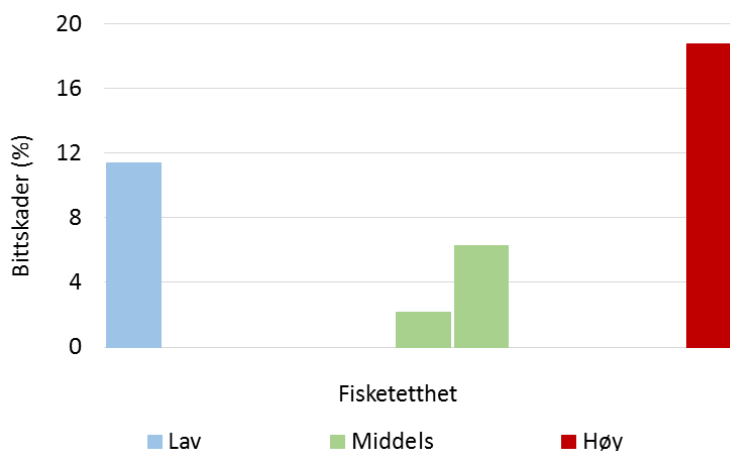
Aggresjon/halebiting

Ved reduksjon av biomassen etter prøvetak ved 20 gram, ble fisken som ble tatt ut ved biomassereduksjon sjekket for halebiting. Det var generelt lite halebiting, men det ble funnet mest halebiting i to av tre kar ved den laveste tettheten. Lavest forekomst av halebiting ble registrert ved den høyeste fisketettheten (60 kg/m³) (Figur 36).



Figur 36 Andel rognkjeks med halebitt per kar og behandling (%) når fisken var 20 gram i snitt. Hver søyle representerer et kar.

Etter avslutning av forsøket ble alle restfiskene undersøkt for bittskader. Ved denne fiskestørrelsen ble det registrert flere bittskader på andre steder enn hale, dvs. rygg og side. Det var stor variasjon mellom kar når det gjelder aggressivitet fordi forekomsten var null prosent i fem av ni kar, og opp til 18 % i et av karene på den høyeste tettheten. Ved den laveste tettheten ble det registrert 11 % fisk med bittskader på dette stadiet (Figur 37).

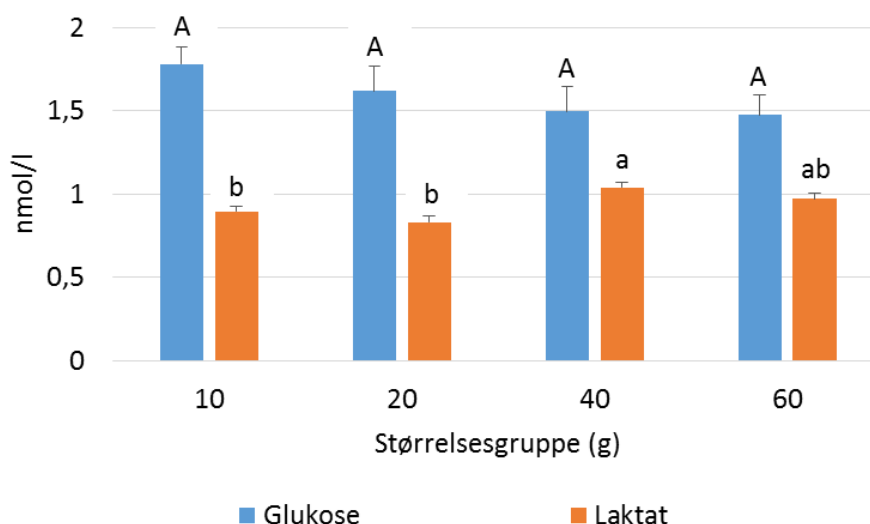


Figur 37 Andel rognkjeks med bittskader (%) ved avslutning av forsøket når fisken var i gjennomsnitt 60 gram. Hver søyle representerer et kar.

Blodparametere

Laktat og glukose i helblod

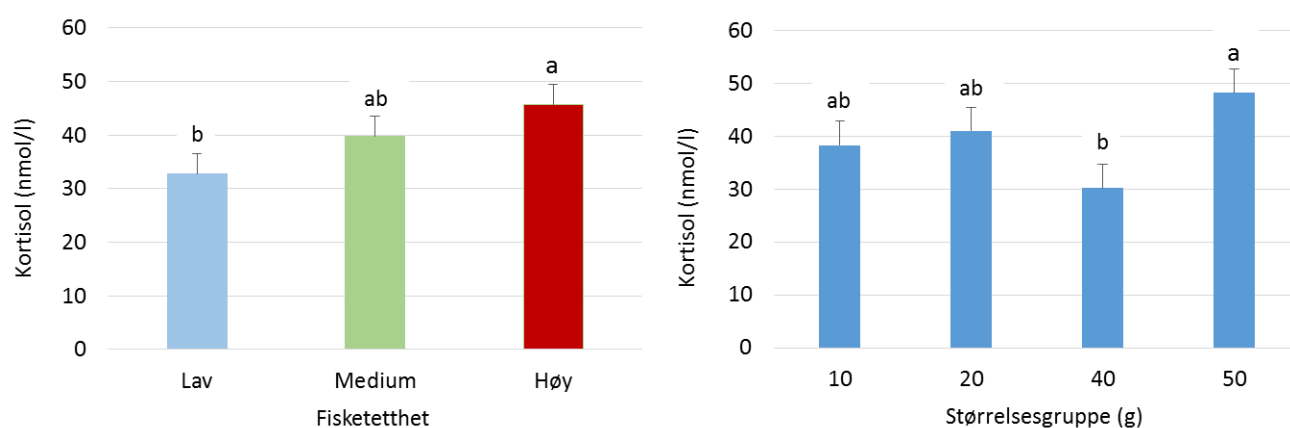
Nivået av både glukose og laktat i helblod var generelt lavt. Nivået av glukose var høyest i første del av forsøket mens nivået av laktat var noe høyere ved de to siste prøveuttakene (Figur 38).



Figur 38 Glukose og laktat i helblod (gj.snitt $\pm$ se) ved hvert prøveuttak. Ulike bokstaver indikerer statistisk sikre forskjeller.

Kortisol i plasma

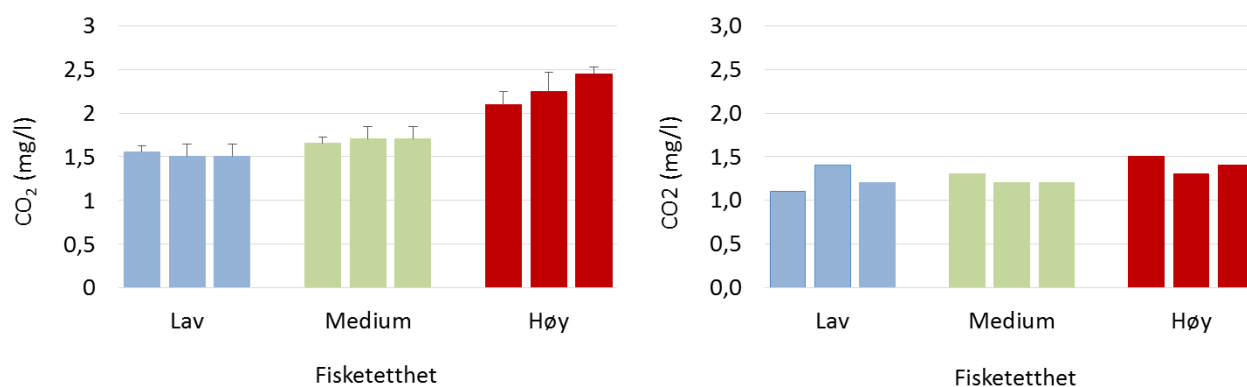
Kortisol i plasma lå mellom 30 og 48 nmol/L. Nivået ble signifikant påvirket av fisketetthet, med laveste nivå ved lav tetthet, og høyest nivå ved den høyeste tettheten (Figur 39). Høyeste kortisolnivå ble målt ved avslutning av forsøket, dvs. når fisken hadde en snittvekt på ca. 60 gram.



Figur 39 Kortisolnivå (nmol/l) i plasma ved de tre fisketetthetene (gj.snitt $\pm$ se) og for de fire størrelsesgruppene. Ulike bokstaver viser statistisk sikre forskjeller.

CO₂-nivå ved ulike tettheter

Konsentrasjonen av CO₂ i avløp var lav ved begge målinger sammenlignet med hva som måles for laks i kommersielle anlegg. Ved første måling 15 dager etter forsøksstart, dvs. ved fiskestørrelse ca. 20 gram, lå CO₂-konsentrasjonen på 1,5-2,3 mg/l. Konsentrasjonen av CO₂ var høyest for tetthet 60 kg/m³. Målingen ble foretatt to dager før biomassereduksjon. Ved måling 18. november, dvs. når fisken nærmet seg 40 gram lå konsentrasjonen av CO₂ under 1,5 mg/l for alle behandlinger, og det ble ikke registrert økt nivå for den høyeste tettheten (Figur 40).



Figur 40 CO₂-konsentrasjon (gj.snitt ± se) i avløpsvannet fra hvert av tre kar ved hver fisketetthet når fisken var 20 (figur til venstre) og 40 (figur til høyre) gram. Begge målinger ble gjort to dager før biomassereduksjon.

Sitteareal ved ulike fisketettheter

Rognkjeks har en særegen atferd hvor den ofte hviler på karvegg og andre overflater. Derfor har vi, i tillegg til kg fisk/m³, også beregnet gram fisk per tilgjengelig karareal (cm²), og hvor mye karareal hver fisk har tilgjengelig (cm²/fisk) ved hver fisketetthet ved oppstart av forsøket når fisken hadde en gjennomsnittsvekt på 5,5 gram, og ved snittvekt 50 gram (Tabell 7).

Tabell 7 Gram fisk/cm² karareal og cm² areal/fisk ved gj.snitt 5,5 og 50 gram størrelse for hver fisketetthet.

Planlagt fisketetthet		Gram/cm ²		Cm ² /fisk	
		5,5 gram	50 gram	5,5 gram	50 gram
Lav	7,5-15 kg/m ³	0,10	0,10	67	870
Medium	15-30 kg/m ³	0,20	0,30	33	169
Høy	30-60 kg/m ³	0,30	0,70	16	70

Diskusjon

Fisketetthetene som ble testet i forsøket (15, 30 og 60 kg/m³) påvirket ikke overlevelsen som var høy i alle periodene i forsøket.

Det var heller ingen statistisk sikre forskjeller i tilvekst i noen av de fire forsøks periodene, dette til tross for at fisken gikk usortert gjennom hele forsøket. Fisken var kun sortert før oppstart av forsøket.

Forekomsten av katarakt var høye for alle forsøksgrupper, men var ikke påvirket av fisketetthet. Alvorlighetsgraden ble imidlertid forverret utover i forsøksperioden. Vi har erfart at det er stor variasjon i forekomst av katarakt på små rognkjeks, og vi har i dag ingen forklaring på denne variasjonen. I FHF-prosjektet CleanFeed (FHF prosjekt #901331) vil vi undersøke ernæringsmessige årsaker til katarakt hos rognkjeks.

Fiskevelferden var generelt god i forsøket. Når det gjelder ytre velferdsindikatorer fant vi ikke ryggdeformiteter, kjevedeformiteter eller gjellokkdeformiteter. Vi fant heller ikke deformerte sugekopper som kan være et problem i enkelte grupper i kommersiell sammenheng.

Av velferdsindikatorene er finneslitasje og alvorlighetsgrad av finneslitasje et relativt enkelt mål som kan brukes i kommersiell produksjon av rensefisk. I forsøket er dette bedømt relativt strengt, og opp mot 100 % av fisken hadde en grad av finneslitasje på en eller flere finner. Det ble imidlertid ikke funnet effekt av fisketetthet på andel fisk med finneslitasje. Fisken ved den høyeste tettheten hadde signifikant lavere score (alvorlighetsgrad) for halefinneslitasje enn lav og medium tetthet, noe som viser at tettheten ikke påvirket finneslitasjen. Vi fant heller ikke at alvorlighetsgraden økte i forsøksperioden på samme måte som for katarakt.

Slitasje på bryst-, gatt og ryggfinner var ikke påvirket av fisketetthet, men alvorlighetsgraden for slitasjen på disse finnene økte utover i forsøksperioden.

Enkelte oppdrettere hevder at fisken må sorters for å unngå aggressivitet hos rognkjeks. I dette forsøket ble fisken som nevnt tidligere ikke sortert i forsøksperioden. Det var generelt lite halebiting, men ved 20 gram størrelse fant vi at det var størst forekomst av halebiting ved den laveste tettheten, og minst ved den høyeste tettheten, noe som igjen viser at det ikke var negativ effekt av høy tetthet.

Etter siste uttak ble restfisken gjennomgått med tanke på bittskader, og da fant en at det var flere bitt på andre steder av kroppen enn halen. Vi fant også at det var svært stor variasjon mellom kar ettersom to av tre kar på den laveste tettheten, et kar på den midlere, og to kar på den høyeste tettheten ikke hadde noen bittskader, mens enkeltkar hadde opptil 18 % fisk med bittskader. Dette kan kanskje forklares med at det er enkeltfisk som blir dominante, spesielt ved den laveste tettheten hvor det var svært få fisk per kar. Dette har vi imidlertid ikke bevis for.

Når det gjelder fysiologiske velferdsindikatorer fant vi lave verdier av både glukose og laktat, og disse var heller ikke påvirket av fisketetthet. Glukoseverdiene ble lavere utover i forsøksperioden, og var signifikant lavere ved siste uttak sammenlignet med de tre første uttakene. Laktat verdiene økte derimot svakt utover i forsøksperioden.

Kortisolverdiene var også relativt lave ved alle tettheter og i hele forsøksperioden. Kortisolnivået i plasma økte med økende fisketetthet. Det var også en tendens til økende kortisolnivå utover i forsøksperioden. Konsentrasjonen av kortisol som vi finner hos rognkjeks er relativt lav i forhold til f.eks. berggylt og laks. Likevel finner vi endringer i kortisolnivå hos rognkjeks ved ulike behandlinger, noe som indikerer at kortisol kan brukes for å beskrive stress hos rognkjeks.

CO₂-konsentrasjonen i avløpsvannet ble målt på to tidspunkt i forsøksperioden. Verdiene var lave for alle fiskestettheter ved begge målingene, men ved 20 gram størrelse var verdiene noe høyere for den

høyeste tettheten sammenlignet med de to laveste. Ved 40 gram størrelse så vi imidlertid ingen forskjell mellom de tre fisketetthetene.

Når det gjelder biomasse/areal ser det ut til at 0,3 g fisk/cm² karareal og 0,7 g fisk /cm² karareal for henholdsvis 5 og 50 grams fisk bør være tilstrekkelig fordi vi fant liten eller ingen effekt av fisketetthet på prestasjon og velferdsindikatorer.

Med unntak av en viss økning i kortisolnivå i blodplasma fant vi ikke negative effekter av å holde rognkjeks med gjennomsnittsvekt fra 5,5 - 60 gram ved tettheter opp til 60 kg/m³. Det er imidlertid viktig å ta i betraktning at dette forsøket er gjennomført i små kar med svært god miljøkontroll, og god tilgang til fôr. Det kan derfor være utfordrende å overføre resultatene direkte til kommersiell produksjon. Momenter som er viktige å ta hensyn til i kommersiell sammenheng er vannkvalitet/behandling, vanngjennomstrømning, vannhastighet og oksygeninnivå. I tillegg er tilgang til fôr en viktig faktor. I de små karene har all fisk lett tilgang til fôr mens det i større kar kan bli for lang avstand for enkeltfisk. I forhold til aggresjon er det også viktig å sørge for at det tilbys partikkelstørrelser som passer de ulike størrelsene fisk i karet.

Konklusjon

- Tettheter opp til 60 kg/m³ påvirket ikke overlevelsen negativt.
- Tettheter opp til 60 kg/m³ påvirket ikke tilveksten negativt.
- Alvorlighetsgrad av katarakt økte over tid.
- Fordi en stor andel fisk hadde katarakt ved oppstart (5,5 g) var det vanskelig å påvise evt. effekt av fisketetthet på denne indikatoren.
- Generelt god fiskevelferd: ingen registrerte rygg-, kjeve eller gjellokkdeformiteter eller skinnskader
- Ingen funn av deformert sugekopp.
- Ingen effekt av tetthet eller tid på forekomst og alvorlighetsgrad av halefinneslitasje.
- Alvorlighetsgraden av slitasje på andre finner økte over tid.
- Glukose- og laktatnivå i blodet var lite påvirket av fisketetthet og tid.
- Kortisolnivå i plasma økte med økende tetthet, ikke påvirket av tid.
- CO₂-nivå i utløpsvann noe høyere ved høy tetthet hos liten fisk (5 g), men ingen effekt av tetthet ved 40 g.
- Mest bittskader ved lavest tetthet ved 20 g.
- Stor variasjon mellom kar i forekomst av bittskader hos 60 g fisk, trolig andre faktorer enn tetthet som påvirker aggresjon på dette stadiet.

Vår hovedkonklusjon er derfor at det er mulig å holde rognkjeks usortert ved tettheter opp til 60 kg/m³ uten at det går utover prestasjon og fiskevelferd forutsatt at det er godkontroll med vannmiljø og fôring.

4.4 Velferd, ernæring og skjul i merd

Bruk av rensefisk i biologisk bekjempelse av lus medfører at det flere arter med forskjellige krav til fôr og miljø i laksemerden. Utfordringen er å få alle artene til å trives, og samtidig stimulere til lusebeiting ved å legge til rette for interaksjon mellom rensefisk og laksefisk. I dag brukes en blanding av villfanget leppefisk samt oppdrettet rognkjeks og berggyll til lusebekjempelse i merdene i Midt-Norge.

Det registreres dødelighet i løpet av perioden, men det er også en uregistrert dødelighet (svinn) i sjøfasen. Årsaken til dette kan være mange. Får rensefisker riktig fôr, og tildeles det på riktig måte/sted i merden? Rensefisken trenger et fôr som dekker behovet for essensielle næringsstoffer. Energi og stoffbalanse er avgjørende for god velferd. Kan årsakene til dødeligheten være feilernæring eller underernæring? Dette ble undersøkt gjennom bruk av OVI og kjemisk sammensetning av villfisk, fisk ved utsett i merd og etter en periode i merd. Andre årsaker til dødeligheten kan være sykdom, predasjon, stress og manglende skjul. Det er viktig å skaffe seg kunnskap om hvor fiskene befinner seg i merden for å få riktig utfôringssted og plassering av skjul, samtidig som en må sørge for at rensefisken og laksefisk møtes for å gjøre lusebeiting mulig. I kommersiell skala, må forsøkene basere seg på ulike typer skjul. Velferd må ivaretas gjennom å kartlegge og optimalisere kontakt mellom rensefisken og laksefisk mens rensefiskens naturlige behov for skjul ivaretas.

4.4.1 Ernæring

Riktig ernæring er en viktig faktor for å sikre rensefiskens velferd og overlevelse. Vi ønsket å finne normalområdet for energi og makronæringsstoffer i rognkjeks og berggylt, og om dette eventuelt kunne knyttes til andre OVler. Innledningsvis ble det i 2016 samlet inn prøver av både villfanget og oppdrettet fisk av ulik størrelse. Det ble registrert vekt og lengde, og i tillegg bredde og største omkrets for rognkjeks. Fiskeprøver ble homogenisert og analysert for tørrstoff, fett, protein, aske og bruttoenergi.

De første analysene ble gjort på oppdrettet rognkjeks fra Nofima Sunndalsøra, oppdrettet berggylt fra Havlandet (Florø), og villfanget berggylt fisket ved Runde. Det ble utført individanalyser for 10 fisk fra hver gruppe, for å se på individuell variasjon i kjemisk sammensetning. Villfanget rognkjeks fikk vi ikke tak i før seinere i prosjektperioden, og da veldig liten fisk (ca. 0,4 – 1,4 gram). Disse var for små til å gjøre individanalyser på, så vi analyserte bare samleprøver.

Feltforsøk ble gjort for å følge utvikling av næringsstatus i rensefisk fra utsett og gjennom en periode i merd i sjø. På forhånd testet vi merkemetode med å merke buken hos fisk med ulike farger av en polymer (Visible Implant Elastomer, VIE-tags), for å kunne finne igjen fisk fra samme utsett i merden, siden det er vanlig praksis å supplere med rensefisk i merder etter behov. Bruk av merkemetode i prosjektet ble godkjent etter søknad til Mattilsynet (Søknad ID 8553).

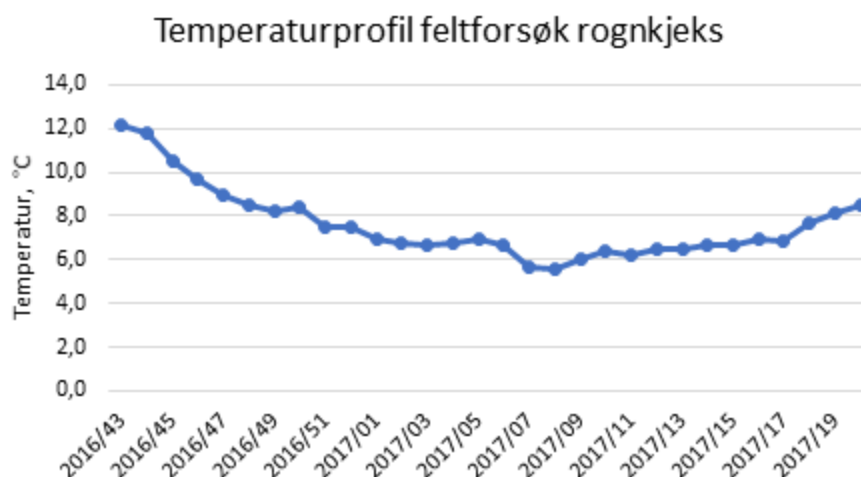
Feltforsøk med rognkjeks – Romsdalsfjorden

Under utsett av rognkjeks 21.10.2016 ble 500 fisk merket med VIE tags for å følge opp gjennom en periode i 160m polarsirkel merd. Merkingen ble gjort i det fiskene ble overført fra bil til kar i båt for utsett i merd. Det ble tatt ut tilfeldig 20 fisk til prøvetaking, og velferdsskår ble registrert. Gjennomsnittsvekt for prøvefisk (n=20) var 38 gram.

Neste prøveuttak ble tatt 12.05.2017, altså etter nesten 8 måneder i merd. De merkede rognkjeksene var av variabel størrelse. Vi fanget 20 fisk med håv som hadde ei gjennomsnittsvekt på 358 g. Temperaturprofil for perioden er vist i Figur 41. I merden ble det brukt Kinatare, og det var fôring med en automat og strømper med pellets hovedsakelig beregnet for leppefisken. Laksen ble føret sentrert i merden i ett måltid om vinter og to måltider om våren.

Det ble gjort kjemiske analyser av 3 samleprøver fra startuttak og 3 samleprøver fra sluttuttak. Prøvene ble analysert for tørrstoff, fett, råprotein, aske og bruttoenergi.

Etter 8 måneder i merd, var rognkjeksene vi tok prøver av betydelig større enn ved utsett, men det var stor spredning. Vi fant ikke noen ytre tegn på redusert velferd basert på velferdsskår på de 20 som vi undersøkte.



Figur 41 Temperatur (°C), gjennomsnitt pr uke, i perioden med feltforsøk.

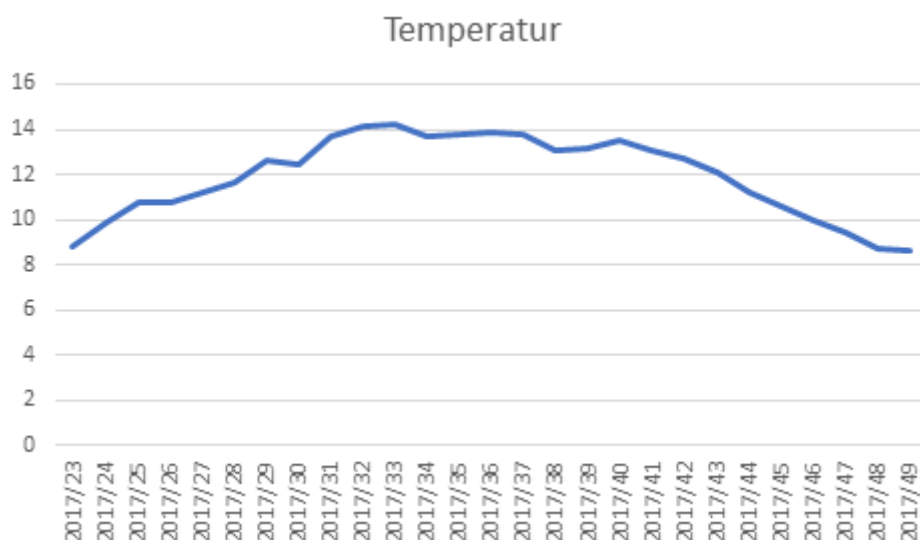
Feltforsøk med berggyllt – Frøya

Ved utsett av berggyllt i merd 09.06.2017 ble 500 fisk merket med VIE-tags og satt ut i en 160 meters polarsirkel. Startprøver av fisk ble tatt samtidig, og velferdsskår ble registrert. Gjennomsnittsvekt for prøvefisk (n=20) var 29 gram. Det ble gjort kjemiske analyser av tre samleprøver. Ved utsett var fisken 37,9 g og 12,3 cm med K-faktor 2,06.

Kunstige tareskjul var satt ut i merdene og fungerte som skjul for rensefisken, disse ble byttet og desinfisert med Virocid med jevne mellomrom slik at de holdt seg fri for groe. Merdene ble også vasket dagen før utslipp. Videre ble leppefisken føret med Symbio Maintenance 12mm pellets (BioMar) som ble hengt i hvitmaskede strømpes i skjulene.

Noe dødelighet ble registrert etter utsett, men det ble ikke observert merket fisk blant dødfisken. Det kan være flere grunner til dette. Med en snittvekt på under 30 g, vil leppefisk som dør i merden fort forsvinne. Dette skyldes at de ikke er tunge nok til at de nødvendigvis faller ned i bunnhåven, men blir liggende i sidene på laksemerden. Selv fisk som faller ned vil fort degraderes og/eller spises av fisk i og utenfor merden. Derfor var det vanskelig å si noe om overlevelse for de 500 merka berggylltene som ble satt ut.

Feltforsøket ble avsluttet med uttak av prøvefisk den 30.11.2017, ca. 6 måneder etter utsett. Utfordring var at vi ikke fant noe merket fisk, men det viste seg at det ikke var satt ut fisk de siste to månedene før utfisking. Vi gikk videre til analyse av 10 fisk etter utfisking, selv om disse ikke nødvendigvis var fra utsatt parti. De hadde uansett hatt et opphold på minimum 2 måneder i merden. Gjennomsnittsvekt for prøvefisk ved avslutning var 120 gram.



Figur 42 Temperatur °C for berggylt i merd.

Kjemiske analyser ble gjort på tre samleprøver fra startuttak og tre samleprøver ved slutt. Prøvene ble analysert for tørrstoff, fett, råprotein, aske og bruttoenergi.

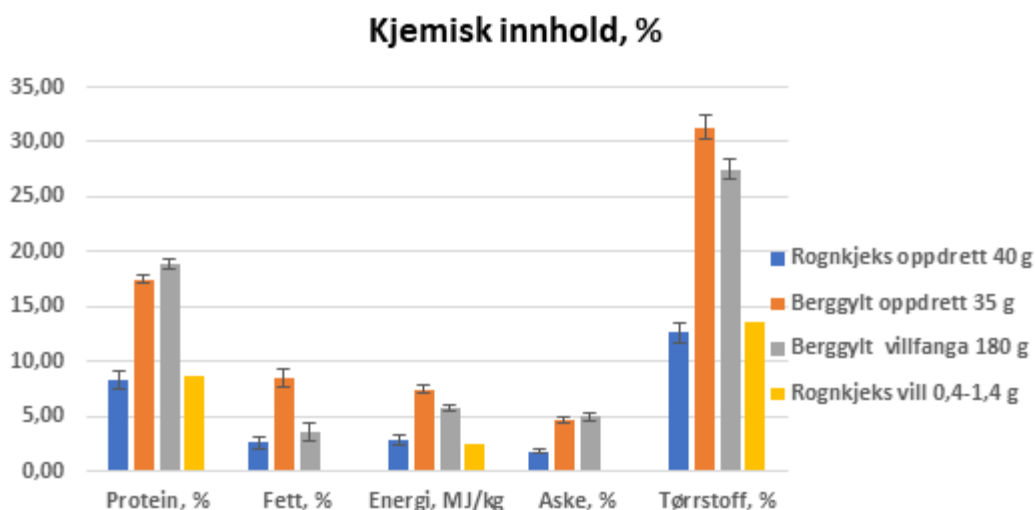
Resultat og diskusjon

Resultater fra de første individanalysene er vist i Tabell 8. Oppdretta rognkjeks og berggylt hadde omtrent samme vekt, men variasjonen var minst i berggylt. Det var også minst individvariasjon i kjemisk innhold, noe som kan komme av at fiskegruppen var sortert til jevn størrelse på forhånd. Gruppen med villfanga berggylt er egentlig ikke sammenlignbar med oppdretta grupper, siden den hadde mye høyere vekt.

Tabell 8 Ytre mål og kjemisk innhold av oppdretta rognkjeks og berggylt, samt vill berggylt, basert på individmålinger (n=10 fisk fra hver gruppe).

	Rognkjeks – oppdrett Nofima			Berggylt – oppdrett Havlandet			Berggylt – villfanga Runde		
	Gj.snitt	STD	CV	Gj.snitt	STD	CV	Gj.snitt	STD	CV
Vekt (g)	39,6	10,4	26,2	35,1	3,2	9,0	182,6	59,4	32,5
Lengde (cm)	8,0	0,6	7,5	11,9	0,7	6,1	23,1	2,6	11,0
Bredde (cm)	3,6	0,4	11,6						
Omkrets (cm)	11,8	1,3	10,8						
Volum (cm ³)	36,0	8,9	24,6						
K-faktor	7,7	0,6	8,3	2,1	0,3	15,2	1,4	0,1	6,9
Fett (%)	2,6	0,6	21,6	8,5	0,9	10,3	3,6	0,8	21,2
Nitrogen (%)	1,3	0,1	9,0	2,8	0,1	1,9	3,0	0,1	2,6
Råprotein (%)	8,4	0,8	9,2	17,5	0,3	1,8	18,9	0,5	2,6
Aske (%)	1,8	0,1	7,0	4,7	0,3	6,5	5,0	0,4	7,9
Tørrstoff (%)	12,6	1,0	7,8	31,3	1,1	3,4	27,5	0,9	3,2
Energi (MJ/kg)	2,9	0,4	14,0	7,5	0,4	5,2	5,8	0,3	5,5

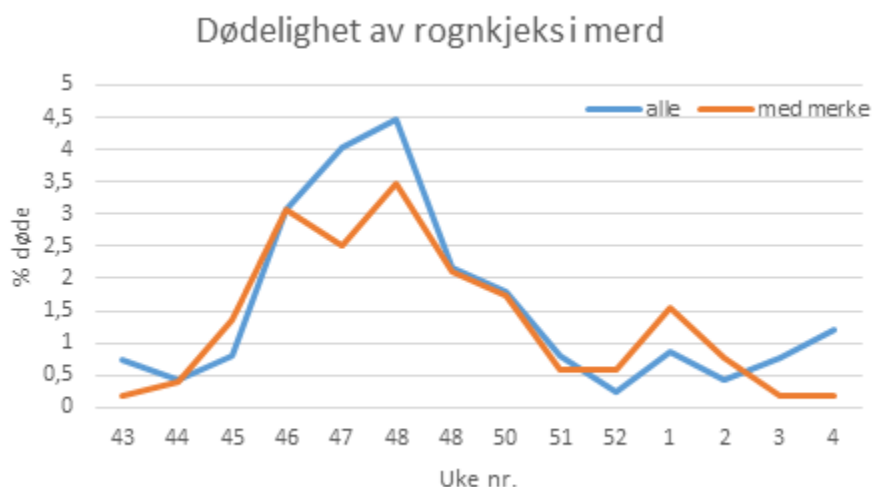
I Figur 43 er også liten, villfanga rognkjeks tatt med. Det er ikke gjort individanalyser av de minste fiskene, så vi har ikke noe mål for variasjon. Ut fra figuren ser vi likevel at kjemisk innhold i liten rognkjeks er ganske lik det vi fant for den noe større oppdretta rognkjeks. Derimot ser vi stor forskjell mellom arter. Berggyllt har dobbelt så høyt innhold av tørrstoff og protein som rognkjeks. Innhold av aske ser også ut til å være mer enn dobbelt så høyt i berggyllt. Vi kan også legge merke til at relativt liten, oppdretta berggyllt har høyere innhold av fett enn større villfanga fisk. I oppdrett har fisken stabil tilgang på næringsrikt fôr, og har bedre mulighet til å bygge opp energilager, men villfisk må tære på ressursene, i alle fall i deler av året. Disse analysene av oppdrettet rensefisk er brukt som referanse for analyser i feltforsøk.



Figur 43 Kjemisk innhold i rognkjeks og berggyllt av forskjellig størrelse, med standardavvik.

Feltforsøk rognkjeks

Daglig registrering av dødfisk ble summert på uker og sammenstilt i figur 44. De som var merket ble telt for seg, men inngikk også i total dødelighet.



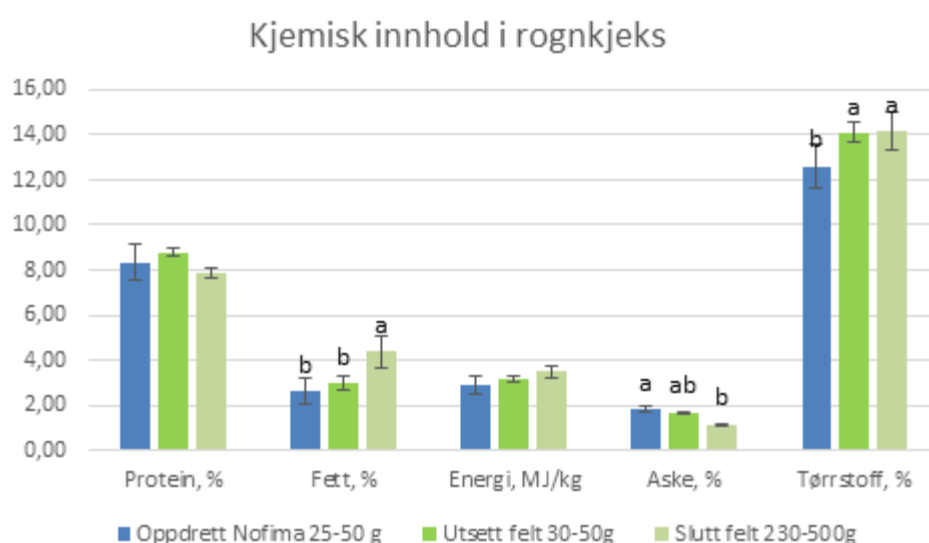
Figur 44 Dødelighet rognkjeks ved feltforsøk i Romsdalsfjorden.

Velferdsskår

Vi benyttet OVI-skjema fra AP1 for velferdsskår ved utsett, og etter 8 måneder i merd. OVI ved start viste at 1 av 20 rognkjeks hadde katarakt ved utsett. Vi gjorde evalueringen uten splittlampe, slik at bare tydelige funn av katarakt ble registrert. Likeså ble det funnet at 1 av 20 hadde skade på ryggfinnen. 5 av 20 fisk hadde skade på halefinne, også av litt mer alvorlig grad. 3 av 20 hadde forandringer på brystfinnene, og 1 av 20 på gattfinnen.

Vi fant ingen reduksjon i OVI og de 20 fisk vi undersøkte ved forsøksslutt hadde ingen ytre tegn på skade. Vi valgte å undersøke mageinnhold og lever før fiskene ble kjemisk analysert. Gjennomsnittsvekta var 39,6 g ved utsett, og ved prøvetaking etter 8 måneder var fiskene gjennomsnittlig 340 g. Det er ikke mulig å fastslå om prøveuttaket er representativt for fiskene i merden.

Kjemiske analyser av rognkjeks ved utsett og etter ca 6-7 måneder i merd (Figur 45) viser at kjemisk innhold, og altså næringsstatus, varierer. Blå kolonne er oppdrettet rognkjeks som var analysert helt i starten av prosjektet (se Tabell 8 og Figur 43). Vi ser at oppdrettet rognkjeks er relativt lik, både den som var analysert først, og den som ble satt ut i feltforsøk i merd. Begge grupper hadde sammenlignbar størrelse. Det som skjedde i løpet av perioden i merd, var at innhold av fett økte, og vi antar at rognkjeksen hadde spist godt, ikke nødvendigvis rensefiskfôr, og bygget opp fettreserver.



Figur 45 Kjemisk innhold av rognkjeks, data fra referanse og feltforsøk.

Tabell 9 Aminosyreinnhold (% av tørr prøve) i de samme 3 sampleprøver av rognkjeks fra utsett av rognkjeks til feltforsøk, samme prøver som er analysert for hovednæringsstoffer.

Aminosyrer	A	B	C	Gj.snitt
Cysteine	0,5	0,5	0,6	0,55
Taurin,	0,9	0,9	0,9	0,91
Aspartic acid	4,8	4,9	5,0	4,92
Methionine	1,5	1,5	1,6	1,53
Threonine	2,2	2,2	2,3	2,26
Serine	2,8	2,8	2,9	2,82
Glutamic Acid	6,8	7,0	7,2	6,99
Glycine	5,7	5,9	5,9	5,82
Alanine	3,6	3,6	3,8	3,63
Valine	2,6	2,6	2,6	2,63
Isoleucine	1,9	1,9	1,9	1,90
Leucine	3,4	3,4	3,5	3,46
Tyrosine	1,2	1,2	1,2	1,17
Phenylalanine	2,3	2,2	2,3	2,26
Histidine	1,0	1,0	1,0	1,01
Lysine	3,7	3,7	3,9	3,74
Arginine	3,6	3,6	3,7	3,65
Proline	2,9	2,9	3,0	2,92
Tryptophan	0,6	0,6	0,6	0,60
Ammonium	2,5	2,5	2,6	2,54

Mageinnhold- Hva spiser rognkjeks?

Rognkjeksmager som ble åpnet i mai 2017 fra rognkjeks utsatt 8 måneder tidligere i merd, viste noe plankton, noe rensefiskfôr, og enkelte fisk hadde mager fulle av laksepellets (Figur 46). Forskere på Færøyene har undersøkt mager fra rognkjeks for å se på beiteeffektivitet, og de ser klart svingninger gjennom året, med mindre lus i magene når det er zooplankton tilgjengelig (Esbern J. Patursson, Lusekonferansen 2019). Det ble funnet lus i magen i rognkjeks som veide fra 15g til 546g, men mest hos de relativt små (Eliassen, Danielsen et al. 2018). Under Lusekonferansen 2019 ble det presentert resultater fra 7800 rognkjeksmager, der det ble funnet lus i ca. 15 % av magene. Vi fant ikke lus i de magene vi undersøkte, men derimot stor variasjon i naturlig føde, der enkelte fisker hadde store mengder laksepellets i magen, andre rognkjeksfôr, og andre ei blanding. Dermed fikk vi demonstrert den opportunistiske atferden til rognkjeks. Tilveksten var også svært ulik, noe som viste seg med store vektforskjeller.



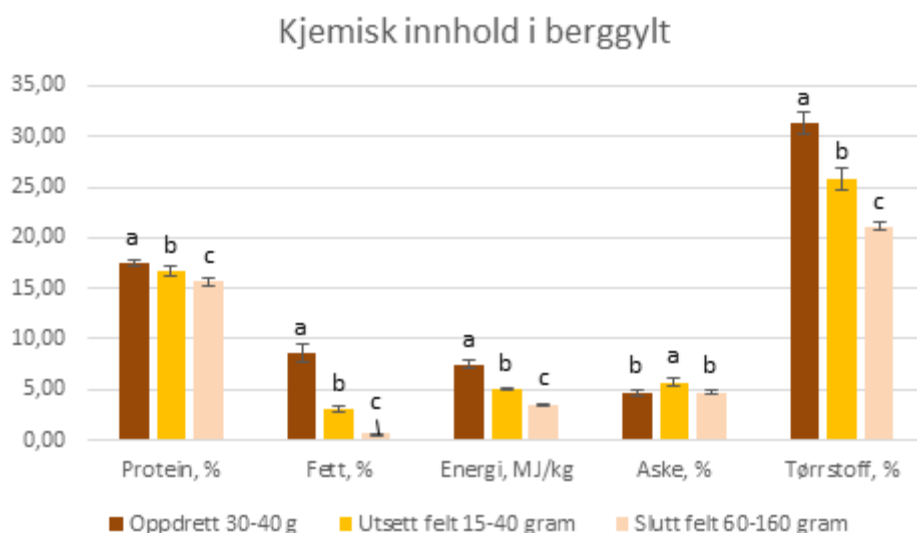
Figur 46 Til venstre – mage full av laksepellet, til høyre størrelsesforskjell etter 8 måneder i sjø.

Feltforsøk berggylt

Velferdsskår

Ved utsett ble 20 fisk vurdert. Det ble observert 2 av 20 fisk med katarakt, 10 av 20 med skinnskader, 2 av 20 hadde skader på ryggfinnen, 10 av 20 hadde skadet halefinne, alle hadde skadet brystfinne, 4 av 20 hadde skadet gattfinne, 16 av 20 hadde skadet bukfinne. Etter utsett ble død berggylt registrert, men det ble ikke registrert merket fisk gjennom røktinga. Dette kan skyldes at det er vanskelig å se merket, og evt. at svinnet av merket fisk er en del av uregistrert dødelighet i merden.

Ved oppfisking ble det undersøkt 10 fisk, med gjennomsnittslengde 21.1 cm og 120 g, som gir K-faktor på 1.28. Det ble ikke registrert katarakt eller skade på munn, skinn eller brystfinne, men 6 av 10 hadde skadet gjellelokk, 2 av 10 hadde skadet halefinne, 9 av 10 hadde skadet ryggfinne eller dorsal finne. 5 av 20 redusert halefinne med skår 1-4, 3 av 20 redusert brystfinne, 1 av 20 med redusert skår på gattfinne. Kjemiske analyser av berggylt ved utsett og etter ca. 5-6 måneder i merd (Figur 47) viser at kjemisk innhold, og altså næringsstatus kan variere mye. Mørk brun kolonne viser oppdrettet berggylt som var analysert helt i starten av prosjektet (se Tabell 8 og Figur 43) Vi ser at oppdrettet berggylt satt ut i feltforsøk hadde mye lavere innhold av fett, og dermed tørrstoff og energi, enn den oppdretta gruppa vi hadde analysert tidligere, til tross for at gruppene var relativt sammenlignbare i størrelse. Det som var bekymringsverdig, var at berggylten i feltforsøket så å si hadde brukt opp alle sine energireserver i form av fett, etter knapt 6 måneder. Ut fra dette kan vi slutte at forholdene i merd ikke var optimale for berggylten, og kanskje at fisk som ble satt ut, var av for dårlig kvalitet. Kanskje hadde den fisken vi analyserte sultet i en lang periode.



Figur 47 Kjemisk innhold av berggylt, data fra referanse og feltforsøk.

4.4.2 Skjul og velferd i merd, berggylt og rognkjeks.

For å ivareta rensefiskenes velferd i merd, er det viktig å optimalisere merdmiljøet. Merden må være et habitat som ivaretar de ulike fiskeartenes behov for skjul og fôring. Det er også viktig å benytte fôr som er tilpasset hver art, og fôringsstasjoner plassert på en måte som gir mulighet for interaksjon mellom laksefisk og rensefisk. Gjennom løsninger i merd må en ivareta fiskens velferd og øke rensefiskens beite og overvintringssuksess. Utfisking har i prosjektperioden utviklet seg til å bli utført av spesialiserte team, eller innleid personell. Vi har derfor fokusert på interaksjon mellom ulike fiskearter i merden. Hvordan fordeler de seg, og hvordan benytter de skjulet? Vi har undersøkt ulike årsaker til uregistrert dødelighet, svinn, som potensiell predasjon og degradering.

Optimalisering av skjul for beiteeffektivitet og overvintring i merd.

I dette arbeidet har vi gjennomført to intervjuundersøkelser (2016 og 2018), videofilming i merd på 4 ulike lokaliteter i 2016, 2017 og 2018 samt utviklet en test for å måle aggressiv atferd for bruk i merd (2018).

Innledningsvis (i 2016) gjennomførte vi intervju for å sammenstille bruk av rensefisk, skjul og utfisking. Arbeidet ble koordinert med lignende intervju av HI (Skiftesvik og Bjelland) og presentert på Rensefiskkonferansen 2016. I 2018 ble det gjennomført en ny intervjuundersøkelse tilknyttet en bacheloroppgave. En viktig ikke-inngripende metode som er benyttet er videofilming i merd. Ved bruk av ulike oppsett har Go-pro kamera blitt benyttet, slik at vi har et godt materiale for å se på samspill mellom arter, fôringsatferd og interaksjoner mellom arter. En stor del av opptakene er gjort i vinterhalvåret, i tilknytning til skjul. Gjennom intervju, har det fremkommet at det er mange spekulasjoner om hva som er årsakene til en høy uregistrert dødelighet av rensefisk i merd. Først ved utslakting, har en sett hvor stort det reelle avviket mellom utsatt rensefisk og registrert død rensefisk er. Vi har i denne arbeidspakken undersøkt noen av disse årsakene, med blant annet å utvikle en test av aggressiv atferd i merd. Vi har brukt en gummifisk, eller ulike døde rensefisker som har blitt trukket gjennom merden mens vi har filmet atferden til relativt stor laks og ørret (ulike arter og størrelser).

Degradering av død rensefisk

Vi har gjennomført forsøk i mars 2018 (bacheloroppgave) og i september 2018.

Vi samlet inn nylig død rensefisk. Vi benyttet bergnebb, oppdrettet berggylt, villfanga berggylt, grønnngylte og rognkjeks. Tre fisker av hver sort ble merket individuelt, veid og fotografert før vi plasserte dem i ei kasse med finmasket netting, som igjen ble plassert i ei teine for å hindre predasjon fra utsida (Figur 48). Det ble foretatt daglig veiing, og fotografering av fiskene.



Figur 48 Viser kasse med merket rensefisk og kasse med teine rundt før utsett.

Laksens atferd overfor rensefisk i merd

Det ble utviklet en ikke-inngripende test av aggressiv atferd fra laksefisk mot agnfisk som beveget seg over merd eller som var i ro langs kanten. Ulike agnfisker var enten en gummifisk, eller døde rensefisker av ulike arter og størrelser (Figur 49). De ble festet i et snøre og dradd gjennom merden på omtrent 2 m dyp med ulike hastigheter og med et Go-pro-kamera festet til som fotograferte laksens atferd. Videofilmene ble analysert i forhold til om laksefisken beit eller var interessert i agnfisken under ulike betingelser, under fôring, i måltidspause og under sultet. Forsøkene ble gjennomført både med stor laks og stor ørret i 160 meters polarsirkler.



Figur 49 Agnfisk (rognkjeks, stor berggylt, liten berggylt og gummifisk (9,5 cm)).

Vi gjennomførte 11 forsøk i 9 merder sommeren 2018. Sjøtemperaturen var ca.14 °C. Biomassen i merdene som ble benyttet var fra 2,8 kg til 6 kg og tettheten varierte.

Utfisking fra not/Effektiv gjenfangstmetode

I intervju i 2016 kom det frem at det var store utfordringer med svinn av fisk gjennom merdfasen. Vi gjorde innledningsvis intervju om utfisking og test av attraktanter. Utfisking utviklet seg i prosjektperioden til å bli gjennomført av spesialisert personell innleid for formålet. Vi har derfor ikke fulgt opp med utfiskingsforsøk de siste årene. De siste årene har arbeid i merd dreid seg om å undersøke ulike forklaringer på uregistrert dødelighet (svinn), som aggressiv atferd fra laksefisk mot rensefisk, og potensiell degradering.

Forsøk: Innledende test av attraktanter til oppfisking

I mai 2016 testet vi tre ulike agn i merd som en liten pilot med tanke på utfisking. De tre agnene var knust taskekrabbe, knuste blåskjell samt reker, som alle ble sammenlignet med rensefiskfôr. Agntypene ble valgt fordi mange rapporterte bruken av disse, og vi ønsket å finne det agnet som var best for den enkelte arten. Det ble laget et oppsett for å sammenligne to og to agn mens det ble gjennomført filmopptak (Figur 50).



Figur 50 Oppsett med pellets og reker i to ulike poser, med GoPro kameraer til opptak.

Resultater

Optimalisering av skjul

Gjennom intervju i 2016 ble det spurt om bruk av rensefisk, innblanding, skjul og utfisking.

Resultatene fra 11 respondenter som var driftsledere, viste at det ble benyttet berggylt (3 brukte oppdrettet og 7 brukte villfanga), bergnebb (5 av 11), grønnngylt (9 av 11), grasgylt (1 av 11) og rognkjeks (7 av 11). Innblandingsprosenten varierte fra 2-12 % og oftest en blanding av arter.

Alle brukte Kinatare med ulike riggsystemer. 3 av 11 rapporterte at de senket skjulene når temperaturen var under 6-7 grader. Det ble benyttet ulike fôr: Biomar (8/11), Ewos (2/11), Skretting (5/11), krabbe (2/11), Labrus (1/11), reke (1/11), makrell (1/11).

Hovedinntrykk er at det i 2016 ble benyttet mange arter av ulik opprinnelse i merdene. Tilgangen på oppdrettet berggylt var liten, og rognkjeks var heller ikke tilgjengelig for alle. I intervju i 2018 var fokuset på innblanding, uregistrert dødelighet og predasjon.

Resultater fra intervju med 15 driftsledere og 5 rensefisk-koordinatorer i Midt-Norge er presentert i ei bacheloroppgave: *Svinn av rensefisk i lakseoppdrett* (2018). Alle respondentene rapporterte at de brukte rensefisk, og av de 15 som ble spurt svarte 13 at de brukte rognkjeks, 7 brukte berggylt, 14 brukte bergnebb, 12 brukte grønngylt. Alle anlegg brukte tareskjul (kinatare) mens 7 også brukte hardplast tare til rognkjeks. Fôring foregikk med fôrstrømper (14) og automater (11) mens 4 rapporterte håndfôring. Predasjon av laks ble rapportert fra 7 respondenter, 9 rapporterte fugl som predator, mens 2 rapporterte fisk utenfor merda som predator. Det var størst svinn av villfanget fisk, og grønngylt var minst robust. 14 respondenter viste til at det var store avvik mellom utsatt rensefisk og resultat ved tømning av not.

Innblandingsprosent ble rapportert å variere fra 5-15 %. Innblandingsprosenten så ut til å øke fra 2016 til 2018. Det var fremdeles vanlig å blande mange arter i samme merd. Vi så dreining over mot bruk av de spesielle hardplast rognkjeksskjulene og økt innblanding av rensefisk i forhold til 2 år tilbake.

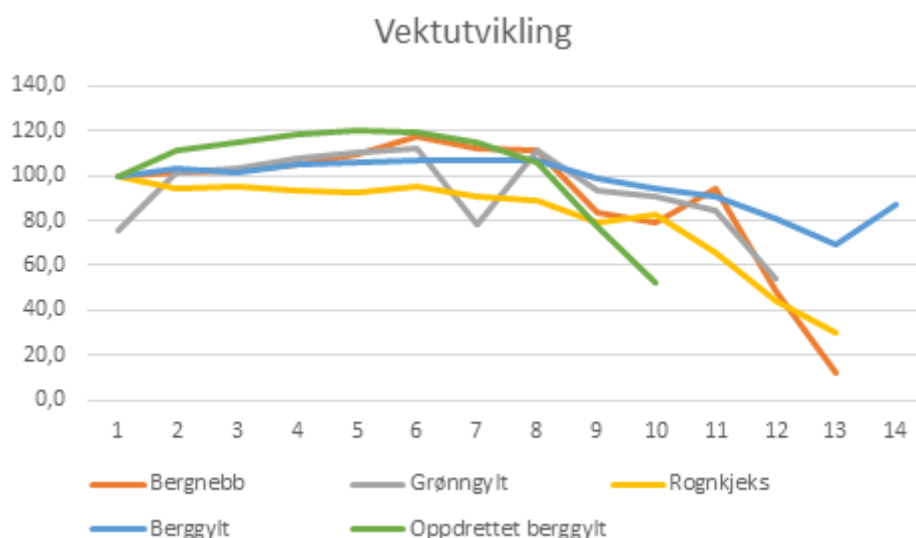
Gjennom intervju i 2016 (presentert på Rensefiskkonferansen 2016) og våren 2018 (inkludert i bacheloroppgave) kommer det frem mange påstander i forhold til uregistrert svinn/dødelighet.

I begge disse undersøkelsene, har det blitt fokusert på uregistrert svinn, siden dette i dag er den største trusselen for rensefiskens velferd i merd. Det var svært ulike oppfatninger av svinn, og ulike observasjoner ble rapportert i intervjuene. Basert på disse intervjuene er det gjennomført flere konkrete forsøk i løpet av 2018, både med degradering av død rensefisk og aggressiv atferd for laksefisk i 2018. For å følge opp noen av teoriene og dokumentere, ble det gjennomført ulike forsøk i 2018.

Observasjoner av predasjon ble gjort allerede 1995, da laks ble observert jagende etter nyutsatt leppefisk, og den bet bergnebb. Bergnebb gjemte seg på bunnen blant død laks, men grønngylt var i de øverste 5 m ved temp på 13-11 grader (Deady, Varian et al. 1995). Prosedyrer nå er at skjul og rensefisk settes ut før smolten, for å unngå slike episoder. Minstemål er også viktig for å unngå svinn, som tidligere ble et resultat av rømming. Vi har egne videoopptak fra merd som viser laks som jager liten rognkjeks. Gjennom adferdsstudie og videofilming har vi sett artsforskjeller i forhold til bruk av ulike skjul om vinteren. Vi ser tydelig at leppefisken foretrekker Kinatare, mens rognkjeks benytter hardplastskjul.

Forsøk: Degradering av død rensefisk i sjø

For å undersøke om død rensefisk degraderes så raskt at de ikke blir registrert i den daglige røktinga ble det gjennomført forsøk med degradering i sjø.



Figur 51 Gjennomsnittsvekt i % av dødvekt ved lagring i kasse i sjø ved 5 grader. Dødvekt ved forsøksstart = 100 %. n=3. X-aksen er dager, y-aksen er %.

Resultatene fra disse forsøkene viste at ved skjermet kasse i sjø, tar det ca. 10-14 dager før død bergnebb, rognkjeks og berggylt går i oppløsning ved 5°C, og ca. 3 dager ved 15°C. Figur 51 viser vektutvikling av død fisk ved 5 °C.

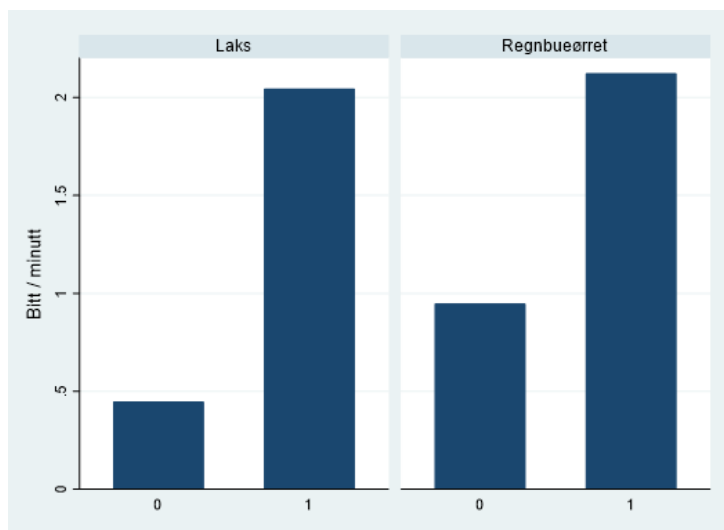
Ved muligheter for at fisk spiser på hverandre, større friksjon mot nota ved bevegelse og potensiell predasjon fra utsida av nota, kan noe av dødeligheten om sommeren ved høye temperaturer være naturlig degradering. På vinterstid ved lave temperaturer tar dette så lang tid at det ikke kan forklare hvorfor død rensefisk ikke blir funnet blant dødfisken, siden det er daglig røkting av dødfiskkontroll.

Lakseatferd overfor rensefisk i merd

Vi har observert laks som jager rognkjeks, og flere røktere har antydnet at predasjon av laks kan være en årsak til uregistrert dødelighet.

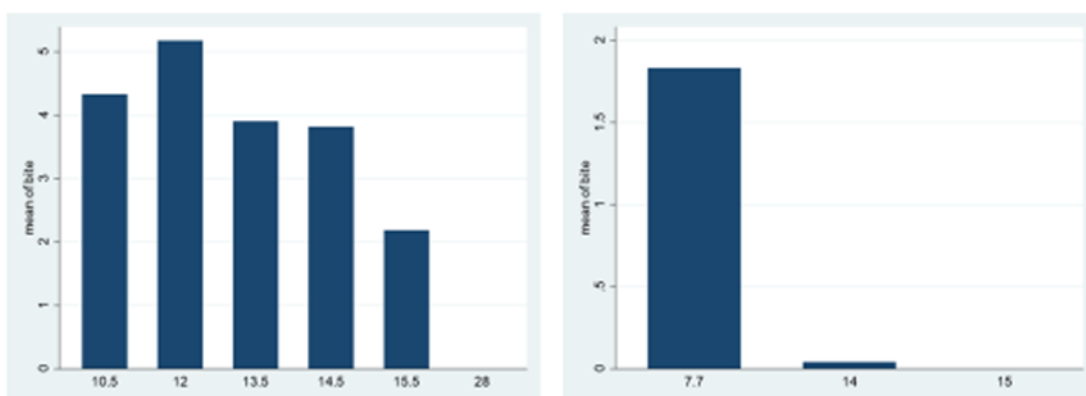
For å undersøke dette, benyttet vi ulike agnfisker som ble dratt under vann med et Go-pro-kamera etter seg. Figur 49 over viser et utvalg av fiskene som er benyttet. Det ble hele tida benyttet en gummifisk som er omtrent på minstemål for leppefisk som sammenligningsgrunnlag. Vi dro fiskene over merda, og hadde pauser mellom hvert drag. Til sammen 438 drag er analysert og sammenstilt i et manuskript for publisering (Aas og Tuene manuskript).

I figur 52 er det sammenlignet agnfisk ved notveggen (0) mot agnfisk som er i bevegelse gjennom merden (1).



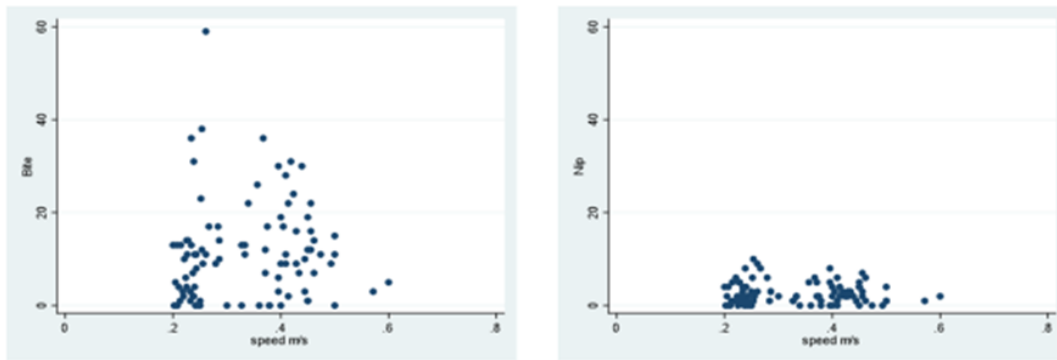
Figur 52 Antall bitt pr minutt på stillestående leppefisk ved notvegg (0) versus leppefisk i fart gjennom merden (1). Presentert som gjennomsnitt i laksemerder (venstre) og ørretmerder (høyre). Bitt / minutt var signifikant ulike mellom stillestående ved not versus svømmende, både i laksemerdene og ørretmerdene.

Det er forbundet med større risiko for de ulike rensefiskene å være i den åpne, pelagiske delen av merda. De forholder seg i stor del til skjul og langs notvegg. Plassering av skjul i forhold til førtildeling og oppholdssted for laks er avgjørende for om rensefisken får matro men også mulighet til lusebeiting.



Figur 53 Figuren viser at antall bitt mot rensefisk avtar brått over en viss terskel-størrelse, vist for leppefisk (venstre) og rognkjeks (høyre). Lengden (i cm) på X-aksen og gjennomsnittlig antall bitt (på en tur gjennom merden) på Y-aksen. Dette ble gjort i merder med stor, snart slakteklar matfisk. Leppefisk på 15,5 cm lengde ble fremdeles angrepet, men fisk på 28 cm ble det ikke. Rognkjeks over 14 cm ble så å si aldri angrepet.

Vi ser tydelig at effekten av større leppefisk reduserer sjansen for å bli bitt, mens rognkjeks på 14 cm er trygg, sammenlignet med 7,7 cm nyutsatt rognkjeks (Figur 53).



Figur 54 Figuren viser hastighet til gummifisken (X-aksen) mot antall bitt eller napp den mottok i løpet av en tur gjennom merden (Y-aksen). Antall bitt (venstre) og napp (høyre) så ikke ut til å være klart relatert til hastigheten til gummifisken.

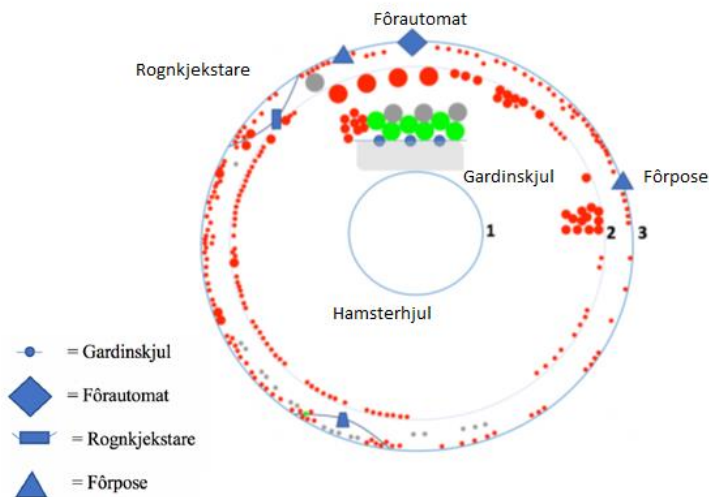
Vi sammenlignet effekten av hastigheten på agnfisken i forhold til det som er bitt, der rensefisken vil bli skadet, til napp, der laksefisken bare viser interesse for den (Figur 54). Gjennom dette forsøket fant vi aggressiv laksefisk overfor rensefisk i alle merder. Liten rensefisk var mest utsatt, men også liten rognkjeks var aggressiv. Vi fant ingen forskjeller mellom laks og ørret. Det var mange individer som gjorde aggressive utfall mot rensefisken (Aas & Tuene). "Svømmehastigheten", altså hastigheten agnfisken ble dradd, påvirket ikke grad av aggressiv atferd.

Bruk av skjul og atferd i merd

Det er gjennom prosjektet filmet i merd, ved skjul og ved føringsted.

I stor grad oppholder rensefisken seg i de øverste 6-7 meterne, og gjerne ved notveggen. Det har vært mulig å kartlegge ca. 10-15 % av antatt rensefisk ved å filme rundt merden med skjørt.

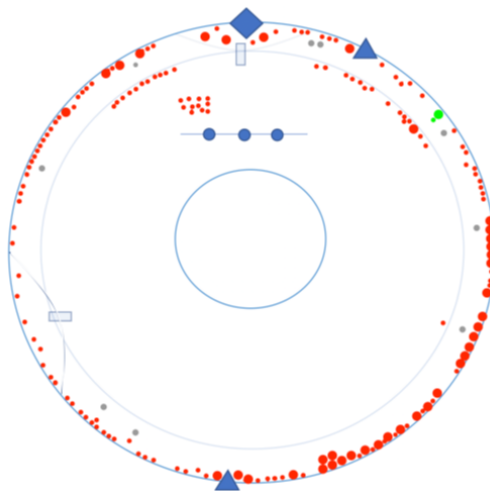
Figur 55 viser hvor leppefisk og rognkjeks oppholder seg i merden – et øyeblikksbilde en februar dag som tydelig viser bruk av skjul og at fisken posisjonerer seg ved utføringsstedet.



Figur 55 Fordeling av leppefisk og rognkjeks i merden (en dag i februar). De små prikkene er enkeltfisk, større er fem fisk og de store er 25 fisk. Grå prikker er leppefisk, røde er rognkjeks.

Rognkjeksen er fordelt over hele merden, men spesielt ved skjul og ved fôrpose.

Figur 56 viser samme merd en dag i mars hvor rognkjeksskjulet er fjernet. Det blir en annen fordeling ut over i merden.



Figur 56 Fordeling av rensefisk når rognkjekstaren er fjernet.

I en situasjon hvor skjulene var fjernet før en operasjon, var rognkjeksen pelagisk over hele merden (Figur 56). Likedan var det ved nyutsatt rognkjeks før skjulene kom på plass. Etter at de nye skjulene av hardplast beregnet for rognkjeks ble satt ut i merden, var det alltid mange rognkjeks som benyttet disse. Vi har ikke mange observasjoner av rognkjeks i kinataren. Rognkjeks foretrekker hardplast tareskjul beregnet for rognkjeks.

Vinteren 2019 har oppdrettere klargjort for å lage et ledeskjul som fører rensefisken dypere ned mot dødfiskhåven ved lave temperaturer. Det er allikevel bekymringer for å føre rensefisken mot bunnen

av nota, fordi det da ikke vil bli noe lusebeiting og muligheter for interaksjon mellom rensefisk og laks (Chriss Beitveit pers med).

Utfisking fra not

I intervjuene fant vi at oppfisking hovedsakelig ble gjort ved teiner (9/11). Krabbe, reker, fôr og blåskjell ble benyttet som agn. Skjulene ble i noen tilfeller fjernet og lokket dermed leppefisk i teinene. Vi har benyttet metoder anbefalt på de ulike anleggene. Rognkjeks kan fiskes ut ved lokking med fôr, og bruk av orkastnot. Også bruk av håv langs merdkanten kan benyttes til små mengder fisk. Leppefisk fanges lettest ved bruk av ruse og teiner, og det brukes ulike typer agn. Under ukentlig lusetelling får en ofte noen rensefisk med i kastet med orkastnot. Her blir det ofte lokket med laksefôr.

I forsøket med attraktanter analyserte vi videoene fra skjulet. De viste at blåskjell var det agnet som førte til flest napp, og det var rognkjeks som ble registrert. Leppefisk responderte på reker og pellets. Pellets og orkastnot fungerer delvis til å fiske ut rognkjeks, mens ruser og teiner med agn brukes til å fiske ut leppefisk.

I prosjektperioden har utfisking blitt en spesialisert funksjon med dedikerte team for oppfisking. Ofte har egne team reist mellom lokaliteter for å fiske ut, eller leppefiskere er innleid.

Diskusjon

I prosjektperioden har mange bedrifter utviklet nye skjul-løsninger, og spesielt skjul av hardplast har vist seg å være funksjonelle for rognkjeks. En kan endre på fordelingen av leppefisk og av liten rognkjeks ved å flytte/fjerne skjul og flytte/fjerne fôrings-stasjon. Uregistrert dødelighet må tas på alvor på hvert anlegg, det er en dyrevelferdsmessig side og minst to økonomiske sider ved dette. Påfyll av rensefisk koster penger, og manglende lusebeiting kan gi behov for kostbar avlusing. I prosjektperioden viste spørreundersøkelser og samtaler at mange oppdrettere omgikk problemet med uregistrert dødelighet ved å multiplisere opp dødfisk-tallene med en faktor lik gjennomsnittlig svinn. Denne korrigeringen kunne også variere mellom personell på samme anlegg. Dette gjorde det umulig for oss å presentere gode tall på uregistrert dødelighet. En må alltid registrere kun antallet dødfisk funnet, uten noen korrigering. Det er nå krav fra Mattilsynet (14 jan 2019) og til enhver tid kunne redegjøre for all rensefisk. Uregistrert dødelighet kan skjules gjennom degradering eller predasjon mellom eller innen arter. Det anbefales ikke å sette ut små rensefisk i en merd med stor matfisk. Det er for tidlig å gi konkrete minstemål for rensefisk vs. laksens størrelse, men et utgangspunkt kan være å passe på ved utsett av rensefisk med diameter mindre enn 0,07 av laksefiskens lengde. Dette tilsvarer den byttestørrelsen laksen potensielt kan svelge. For en laks med lengde på 50 cm vil denne grensen tilsvare leppefisk på ca. 14 cm og rognkjeks på ca. 7,5 cm.

I arbeid med parr fant Wankowski (1978) at byttedyr med diameter over 0,07-0,10 (=PFR) av laksens lengde ikke ble spist, dette tilsvarte omtrent munnbredden til laksen. Jacobson et al. 2018 fant at Baltisk laks i sjøen maksimalt kunne ta sild/brisling med lengde opp til 1/3 av laksens egen lengde. Sild/brisling er slankere enn de fleste rensefisk, men om en antar at sild/brisling på 20 cm har en omkrets på ca. 13 cm vil en 60 cm laks maksimalt kunne spise denne størrelsen, med en PFR på 0.07.

Anbefalinger

- Sett helst ikke ut små rensefisk i en merd med stor matfisk. Det er for tidlig å gi konkrete minstemål for rensefisk vs. laksens størrelse, men et utgangspunkt kan være å passe på ved

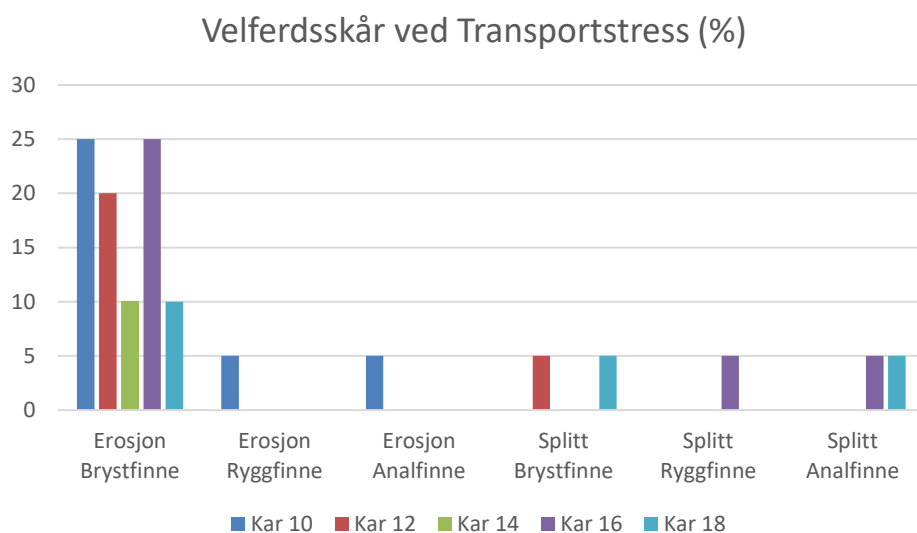
utsett av rensefisk med diameter mindre enn 0,07 av laksefiskens lengde. For en laks med lengde på 50 cm vil denne grensen gå ved leppefisk på ca. 14 cm og rognkjeks på ca. 7,5 cm.

- Reduser antall arter i samme merd, siden det kan være unødig konkurranse om fôr mellom artene, og også predasjon mellom artene.
- Fôr rensefisk på flere stasjoner i merden.

4.5 Helse og velferd

4.5.1 Samarbeid med transportstress (FHF prosjekt #901158 ledet av Akvaplan-Niva)

RENSVEL målte velferdsskår på rognkjeks som var utsatt for transportstress ved ulike tettheter. Uttaket skjedde på Kraknes i Tromsø. Forsinkelser i forsøket resulterte i at vi ikke fikk tak i prøver fra ulike tettheter eller null-prøve. Målingene ble tatt etter at all fisk var slått sammen. Det ble tatt ut 20 fisk fra i alt 5 kar. Figur 57 viser at det var moderat tilstedeværelse av lyter på fisken. Det var allikevel registrert tilfeller av erosjon på brystfinner. For detaljer rundt transportstress forsøket viser vi til sluttrapport for FHF prosjekt #901158.



Figur 57 Velferdsskår ved transportstress rognkjeks.

4.5.2 Vaksinasjon

Bedre kunnskap om utviklingen av immunsystemet er viktig i forhold til vaksinasjon av rensefisk, i tillegg til kunnskap om faktorer som kan være med på å påvirke oppnådd beskyttelse. Det er behov for å vite når i utviklingen en kan indusere beskyttelse ved vaksinasjon. Problemstillinger har vært:

- Hva er optimal størrelse for vaksinerings i forhold til utvikling av immunsystemet?
- Hva er optimalt antall døgngader før utsett etter vaksinerings, med fokus på temperatur?

Uttrykk av immunoglobuliner i rognkjekslarver og i vev fra større fisk

Harald S. Lunde, Gyri T.Haugland, Anita Rønneseth, Håvard Ø. Eggestøl og Heidrun I. Wergeland, Institutt for biovitenskap, Universitetet i Bergen og Cecilie Walde, Veterinærinstituttet, Bergen.



Figur 58 Rognkjeksyngel.

Innledning

Teleoster har tre subtyper av immunoglobuliner; IgM, IgD og IgT (kalt IgZ i zebrafish). IgM er hovedtypen i serum og involvert i systemisk immunitet. IgT er involvert i mucosa immunologi og ansees som en funksjonell ekvivalent til IgA i pattedyr og fugler. Rollen til IgD er enda ikke klarlagt. I fisk finnes to hovedtyper av B celler. Den ene hovedtypen er IgM+, mens den andre er IgT+. IgD kan uttrykkes på IgM+ celler, men ikke på IgT+ celler. I tillegg til å være antigenproduserende celler, er B celler i rognkjeks (Haugland et al, 2012; Rønneseth et al., 2015) og andre teleoster (Li et al., 2006; Øverland et al., 2010) profesjonelt fagocytiske celler og dermed også viktige del av det innate immunsystemet. Tidligere har vi vist at rognkjeks har evne til å produsere spesifikke antistoffer etter immunisering (Rønneseth et al., 2015), men lite er kjent om utviklingen av B celler under ontogenesen i rognkjeks og tilstedeværelse i vev. Det er et ønske om å bad/dypp vaksinere i larvestadiet og tilstedeværelse av sentrale immunmolekyler gir indikasjoner på at immunkompetanse er under utvikling. Genuuttrykkene av sentrale immunkomponenter forteller noe om at der er grunnlag for at immunmolekyler kan produseres. For at fisken skal være «immunkompetent» det vil si svare på en vaksine med å fremskaffe beskyttende immunitet ved senere infeksjon, så er der mange forhold som vil virke inn, slik som at ulike celle typer må være tilstede i nok antall og at cellene må ha fått de funksjonene som trengs.

Produksjon av rognkjeks har økt betraktelig de siste årene både i Europa og Canada fordi dens bruk som rensefisk for å fjerne lus fra oppdrettslaks. En av hovedutfordringene er høy dødelighet som skyldes bakterielle infeksjoner under produksjon og etter utsett i sjø. De små larvene og frem til den kan stikkvaksineres ved ca 8g er utsatte for særlig vibrio infeksjoner, senere når de er stikkvaksinert er de godt beskyttet mot vibriose. Dette viser at der er godt grunnlag for å oppnå beskyttende immunitet. Utfordringen er å finne når og hvordan fisk mindre enn 8 g kan vaksineres. Studier av utviklingen av immunsystemet bidrar med kunnskap som sammen med vaksine testing kan danne grunnlaget for å bestemme hvor tidlig man kan dyppvaksinere rognkjeks.

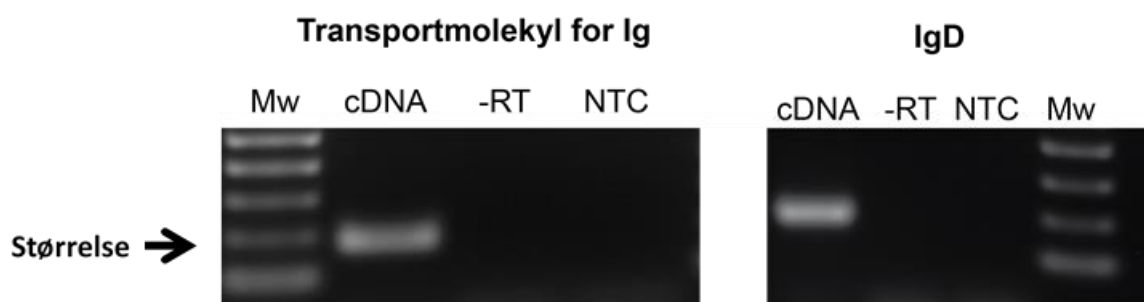
Materiale og metoder

Egg, larver og fisk. Rognkjeksegg og larver var innsamlet av Fjord forsk Sogn AS, en rognkjeksoppdretter i Sogn og Fjordane ved ulike tidspunkt; egg før og etter befruktning og 18 tidspunkter av larver opp til 796 døgngader. Rognkjeks (10g) var transportert til Industrielaboratoriet (ILAB) ved Høyteknologisenteret i Bergen og holdt i 500 L tanker frem til fiskene var ca 150g.

Prøvetaking. Hodenyre leukocytter (HKL), perifere blod leukocytter (PBL), og prøver fra 16 vev: muskel, lever, gonade, hjerne, hjerte, hud, tarm, pylorus blindsekker, øye, tunge, inner- og ytterdel av gjellebuene, SALT (skin-associate lymphoid tissue), tymus, hodenyre og milt ble tatt. Hodenyre leukocytter (HKL) og fra perifert blod (PBL) ble isolert ved bruk av Percoll gradienter (Øverland et al., 2010).

RNA ekstraksjon, cDNA syntese og sanntids-PCR. Ekstraksjon av total RNA, DNase behandling og cDNA syntese ble utført i henhold til protokoller gitt av leverandør (hhv Sigma, og Quanta biosciences). Sekvensene til sIgM, mIgM og IgD ble identifisert i de novo assemblertranskriptom fra rognkjeks (Eggestøl et al., 2018). For sanntids-PCR ble det benyttet SYBRgreen og HPLC rensede primere (Sigma) og Biorad CFX96 sanntids-PCR maskin. Det var nødvendig og arbeidskrevende å verifisere og dokumentere genuttrykk av de aktuelle målgenene og fastslå effektiviteten i analysene for å få høy sikkerhet på de målte verdiene (Tabell 10 og Figur 59).

Monoklonalt anti rognkjeks IgM antistoff og immunohistokjemi. Anti-IgM antistoffet var en gave fra Douglas J. Milne, Universitetet i Aberdeen, Skottland. Immunohistokjemifarging ble utført ved å bruke standardprotokoller for immunhistokjemi og bundet immunoglobulin ble detektert ved hjelp av kromogenet Fast Red TR salt som her farger positive celler røde.



Figur 59 Analyser av genprodukt i 2 % agarosegel som viser at disse har riktig størrelse. Negative kontroller: -RT er prøve uten revers transcriptase i cDNA reaksjonen og NTC er uten templat og resultatet viser at disse er negative og prøven inneholder bånd av riktig størrelse for transportmolekyl og IgD som er vist her.

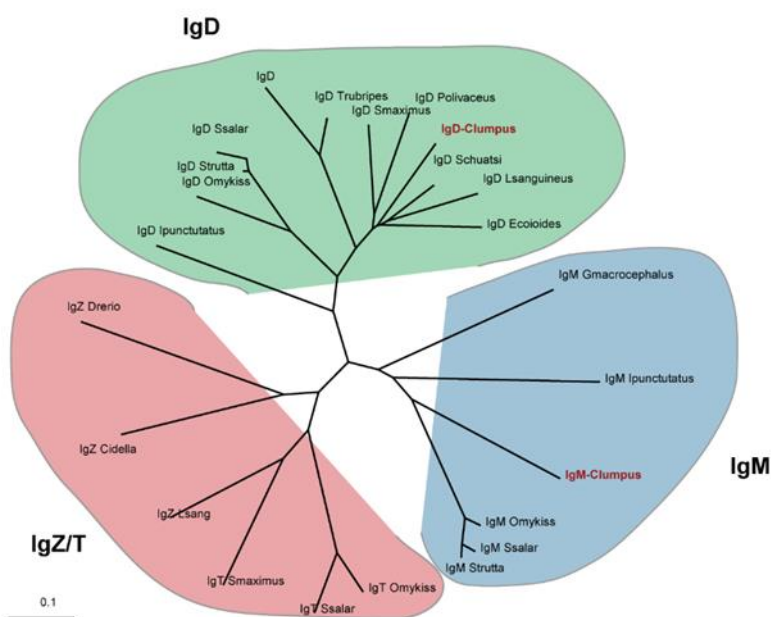
Tabell 10 Viser stigningstall, R2 og effektivitet (E) som benyttes i utregningene. RPS20 er referansegene som benyttes for normalisering av verdiene.

	Gen	Stigningstall	R2	E
IgM	Immunoglobulin M	-3,32	0,999	2,00
IgD	Immunoglobulin D	-3,33	0,998	2,00
Transp. Ig	Transporter for Ig	-3,36	0,999	1,98
RPS20	Ribosomalt protein S20	-3,67	0,976	1,87

Resultater

For rognkjeks forelå det ingen genetisk informasjon om immungener da dette arbeidet startet. Derfor måtte alt metodisk arbeid utprøves før analyser av larver kunne starte. Alt arbeidet med å identifisere og bruke informasjon til å etablere analysene i arbeidet er derfor basert på transkriptomanalyser av rognkjeks materiale utført ved laboratoriet.

Genuttrykk av Immunoglobuliner. Sekretorisk IgM (slgM), membranbundet IgM (mlgM) og immunoglobulin D (IgD) ble identifisert i et rognkjekstranskriptom laget ved laboratoriet (Eggstøl et al., 2018). Fylogenetisk analyser ble utført (Figur 60) og disse viste at de identifiserte genene grupperte seg i sine respektive grupper. Vi har ikke identifisert IgT/IgZ i rognkjeks.

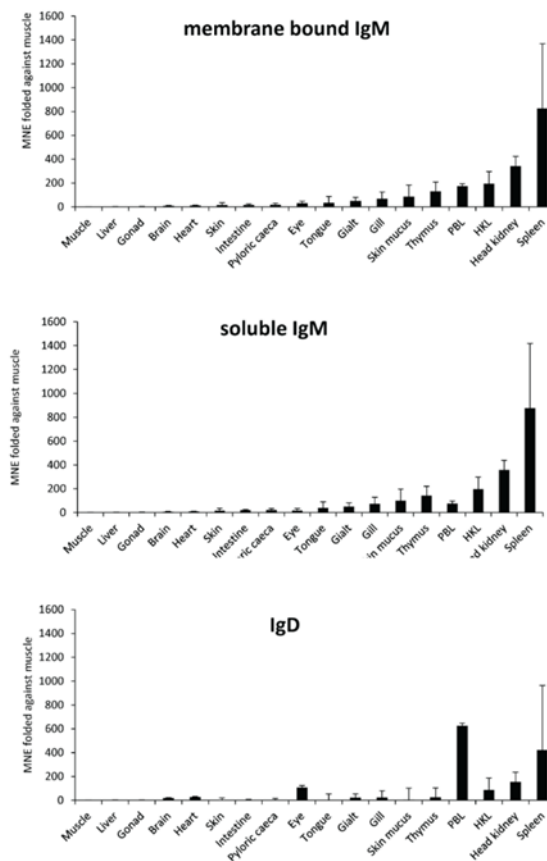


Figur 60 Den fylogenetisk plasseringen for IgM og IgD hos rognkjeks er basert på genanalyser i studiet og viser at disse plasseres i sine respektive grupper.

Uttrykk av mlgM, slgM og IgD i HKL, PBL og vev. Transkript-nivåene av slgM, mlgM og IgD i PBL, HKL og i ulike vev hos ung rognkjeks ble målt med sanntids-PCR (Figur 61). Nivåene av IgM, både slgM og mlgM) var høyest i milt og hodenyre, mens nivået av IgD var høyest i PBL og milt. IgD ble også funnet i øyet (Figur 61). Disse analysene gav god oversikt over vevsdistribusjon og var også viktige for å vise at analyseverktøyene fungerte godt i alle typer vev. Dette sikret og at en hadde etablert gode tester for å undersøke ny klekkede larver og for materiale som kunne inneholde lite genuttrykk og hvor der kunne være små variasjoner.

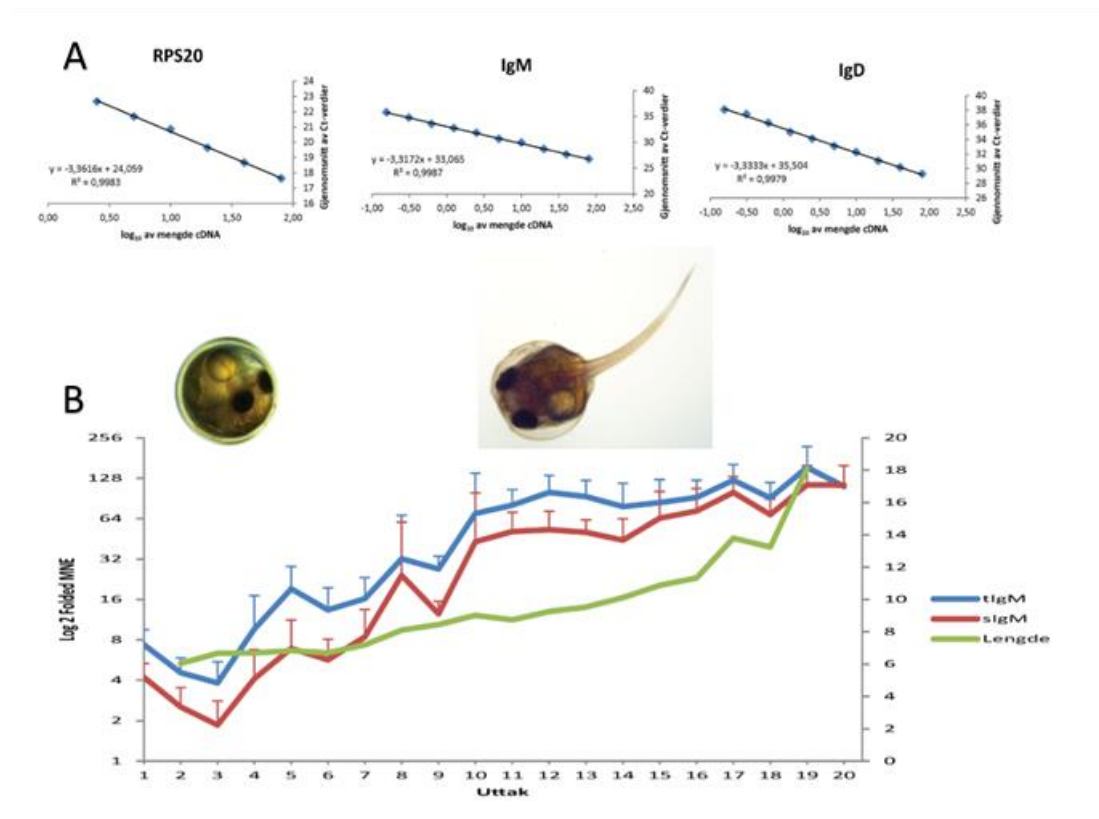
Uttrykk av mlgM, slgM og IgD i løpet av larveutviklingen. Fra klekking ble det analysert 18 prøver i en periode over 123 dager For å måle nivåene av immunoglobuliner under ontogenese og i ulike vev ble SYBRgreen PCR assays laget. RPS20 ble benyttet som referanseggen. Kontrollene NTC (uten templat) og -RT (cDNA syntese uten revers transkriptase) var bekreftet negative og effektiviteten av assayene ble bestemt (Figur 62 A). Nivåene av mlgM, slgM og IgD ble målt i egg og larver opp til 123 dager som tilsvarer 796 døgngader etter klekking (Figur 62 B). Det var en økning i genuttrykket med økende døgngader som forventet. mlgM og slgM uttrykking økte jevnt utover til omkring 700 døgngader da den flatet mer ut. Vi vet ikke om den fortsatt vil øke utover. Rent analysemessig er der en utviklingsfase

hvor det er vanskelig å standardisere prøvematerialet og det er frem til larven/fisken er så stor at en får identifisert og kan ta ut stort nok spesifikt organmateriale. IgD var så vidt detekterbart i hele perioden vi undersøkte og er ikke vist i figuren. Kvaliteten på analysene er vist ved Tabell 10, Figur 59 og Figur 62 A. Larvene vokste jevnt fremover og veksten økte betydelig ved det siste uttaket sammenlignet med det forrige (Figur 62 B).



Figur 61 Uttrykking av gen for mIgM, sIgM og IgD ble undersøkt for ung rognkjeks i 18 ulike vev/celler målt ved RT-PCR. Forekomsten er høyest i immunaktive vev og celler (HKL og PBL) fra disse.

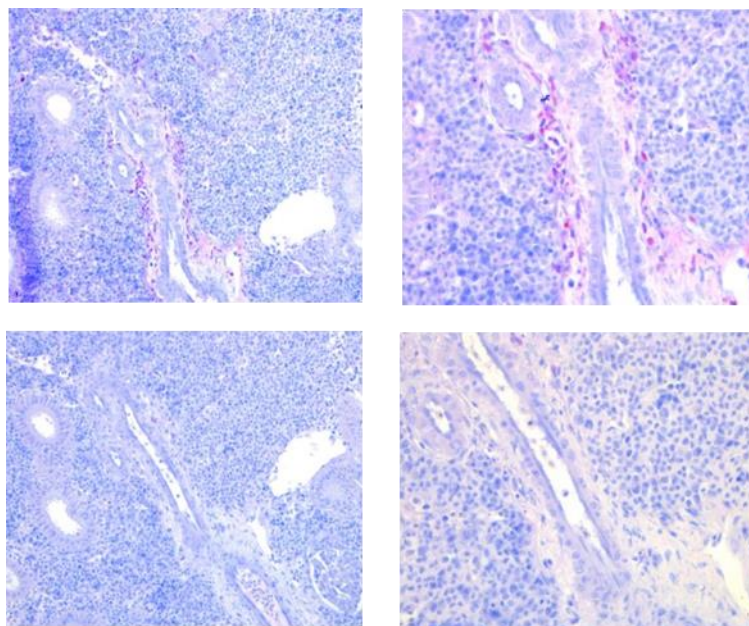
Immunhistokjemifarging Tilstedeværelse av IgM positive celler i nyre var visualisert med immunohistokjemisk farging ved hjelp av monoklonalt antistoff mot IgM (Figur 63). De IgM positive cellene fremstår som røde og også fritt IgM farges og i Figur 62 C og D vises en negativ kontroll med ikke spesifikt antistoff.



Figur 62 Figur B viser forekomsten av mIgM og sIgM fra klekking og utover i larveutviklingen i løpet av de første 796 døgngader. Størrelsen på larven vises lengde angitt i mm på høyre akse. Figur A viser kvaliteten av RTqPCR analysene og stigningstall og punkter på linjen viser at kvaliteten er svært god.

Oppsummering

Vi har identifisert IgM og IgD i rognkjeks og gjort genuttryksanalyse av løselig IgM (sIgM), membranbundet IgM (mIgM) og IgD ved bruk av sanntids-PCR under ontogenesen. Prøvene inkluderer egg før og etter befruktning og deretter 18 tidspunkter frem til 796 døgngader. I tillegg har vi målt genuttrykk av sIgM, mIgM og IgD i 18 vev/celler fra ung rognkjeks (ca 100 g). Vi har også brukt et monoklonalt anti rognkjeks-IgM antistoff i immunohistokjemisk farging av hodenyrevev. For larver var det en økning i uttrykk av immunoglobuliner frem mot 796 døgngader, men den økte mest frem til omkring 400 døgngader. For ung fisk hadde milt høyest nivå av transkript for mIgM og sIgM fulgt av hodenyre, mens for IgD var nivået høyest i perifert blod og deretter i milt. B-celler ble detektert i nyre ved hjelp av immunohistokjemisk farging. Vi har utarbeidet metodikk for å måle uttrykk av immunoglobuliner i larver og en rekke ulike vev hos rognkjeks og verifisert at metode og reagenser har høy kvalitet og er dermed velegnet for bruk i videre studier.



Figur 63 Immunfarging av IgM positive celler (B-celler) i midtnyre fra rognkjeks på 340g. A og B viser snitt med positive celler og merkingen er konsentrert rundt utførselskanal. Fritt IgM vil også bli farget. C og D er umerkede kontroller som har gjennomgått alle trinn i prosedyren og hvor et antistoff med annen spesifisitet er tilsatt.

Immunogenomikk hos berggylt

Aleksei Krasnov, Gerrit Timmerhaus, Hanne Johnsen, Audny Johansen, Åsa Espmark, Ingrid Lein og Lill-Heidi Johansen, Nofima og Henriette Glosvik, Marine Harvest (nå MOWI).

Immungener i berggylt-genomet

Vi startet med organisering av data fra NIFES, som gjorde tilgjengelig den første informasjonen om berggylt genomet. Disse ble bearbeidet og utformet som en kunnskapsbase med mulighet til å søke etter gensekvenser ut ifra ulike problemstillinger. Berggyltgenomet ble behandlet med Nofimas Gene Hub-pipeline. Genene ble tilordnet ortologigruppene og annotert med offentlig tilgjengelige (GO, KEGG) og egne (STARS) ressurser. I henhold til gensammensetningen har berggylt et godt utviklet immunsystem: av 87,4k identifiserte gener, ble 4.7k gener annotert som immungener som er involvert i antibakterielt og antiviralt forsvar, cellekommunikasjon via kjemokiner, cytokiner og eikosanoider, signalering gjennom ulike veier, flere humorale og cellulære komponenter av medfødt og adaptiv immunitet (Tabell 11)

Tabell 11 Antall gener hos berggylt sortert etter funksjonelle immunitetsgrupper.

Gruppe	# Gener	Ressurs
Generell		
Innate immune response	3284	GO
Adaptive immune response	386	GO
Antiviral response	5090	STARS
Responses to bacteria	1068	GO
Deteksjon, signallering, transduksjon		
Pathogen receptors	1780	STARS
Arachidonic acid metabolism	114	GO
Chemokines	275	STARS
Cytokines	710	STARS
Cytokine receptors	275	STARS
IFN γ -mediated signaling	516	GO
Jak-STAT signaling pathway	348	KEGG
NIK/NF-kappaB cascade	148	GO
TNF-mediated signaling	296	GO
Cytokine-mediated signaling	390	GO
Chemokine signaling	609	KEGG
Fc-gamma receptor signaling pathway involved in phagocytosis	907	GO
Antigen presentasjon, humoral and cellulær immunitet		
Antigen binding	1183	GO
Antigen processing and presentation	267	GO
MHC class II protein complex binding	38	GO
MHC class I protein complex	172	GO
Effectors	712	STARS
Scavenger receptor activity	319	GO
Acute-phase response	225	GO
Complement activation	1047	GO
Lectins	134	STARS
Proteases	157	STARS
Myeloid cell differentiation	216	GO
Leukocyte migration	588	GO
B cell differentiation	212	GO
B cell receptor signaling	996	GO
B cell receptor signaling	440	KEGG
Ig	1895	STARS
T cells	4320	STARS
T cell activation	1037	GO
T cell differentiation	131	GO

Noe å merke seg er en imponerende amplifisering av flere gener eller multigen familier. Den største er MGF, betegnet som NACHT-LRR og PYD domeneholdig protein med 6624 gener. Disse proteinene har ikke blitt karakterisert på funksjonelt nivå, men de inneholder domener spesialisert på gjenkjennelse og binding av patogener. Antallet gener for Ig og tre typer TRIM-proteiner er henholdsvis 906, 718, 698

og 679, og det er mange andre utvidede familier. Uttrykk av 1632 immungener ble påvist. Alle deler av immunsystemet er funksjonelle og er representert blant transkriptene. Tabell 12 viser eksempler på mest aktivt transkriberte immungenene fra forskjellige funksjonelle grupper.

Tabell 12 Høyt uttrykte immungener fra ulike funksjonelle grupper. Data representerer registrert antall.

Gen	Mean	Max
Amyloid beta A4	227	384
Bactericidal permeability-increasing	185	894
Barrier-to-autointegration factor	144	344
BCR-associated protein 31	77	150
C3a anaphylatoxin chemotactic receptor	59	285
C-C motif chemokine 24	82	311
CD3	33	113
CD4-3	31	86
CD53	249	1186
CD82	71	105
CD83	16	53
Chemokine CCL-C11a	572	1800
Chymotrypsin-like elastase 2A	1310	22330
Complement C4-B	86	251
C-reactive protein	155	1375
C-type lectin domain 19a	575	3300
High choriolytic enzyme 1	707	8797
HLA class II histocompatibility antigen	530	1274
Ig lambda-like	190	1513
Ig mu heavy chain	846	2644
IL-16	87	252
IL-8	36	89
MHC classes I/II-like antigen recognition	363	1531
Myeloperoxidase	1148	3263
NACHT_ LRR and PYD domains	278	831
Neutrophil collagenase	165	534
Plastin-3	210	1289
Pre-B lymphocyte protein 3	192	563
Sacsin	109	517
Stat 6	334	579

Basert på resultatene fra gen-annoteringen ble følgende primere designet og testet:

- IL-10, receptor β kjede precursor
- jun-B, transcription factor
- NCF1 (neutrofil cytosolic factor 1)
- SOCS1 (suppressor of cytokine signaling 1)
- RTP3 (receptor transporting protein 3)
- IL1 β (Interleucin 1 β)
- C5 (Complement C5)
- ARG2 (Arginase-2, mitochondrie precursor)
- BANF (Barrier-to-autointegration factor)
- MELTF (Transferrin)

Primerne er funksjonelle, men har foreløpig ikke blitt brukt i noen forsøk med berggylt.

Differensielt uttrykk av immungener hos berggylt

I denne delen av prosjektet ønsket vi å studere:

1. Immungenenes ontogenese i berggylt.
2. Berggyltens immunrespons mot komponenter som etterligner virus - (poly I:C) og bakterie - (CpG oligonukleotider) infeksjoner.

1. *Immungenenes ontogenese i berggylt*

Prøver ble samlet inn på 13 tidspunkter (TP) i berggyltens utvikling på Marine Harvests (nå MOWI) produksjonsanlegg. Uttak 1-8 ble gjort på anlegget i Øygarden, mens uttak 9-13 ble utført på anlegget på Stord:

1. Egg 1 dag før klekking
2. Larver 0-1 dag etter klekking (dph)
3. Larver 3 dph, før første starfØring med rotatorier (ca 40 dgph)
4. Larver 16 dph, før introduksjon av Artemia (ca 200 dgph)
5. Larver 42 dph, før introduksjon av tørrfØr (500 dgph)
6. Yngel 84 dph, når de er ferdig weanet (ca 1150 dgph)
7. Yngel ca 1 gram 118 dph (ca 1600 dgph)
8. Yngel 2 gram 160 dph (2200 dgph)
9. Yngel 5 gram (5 ulike organer)
10. 10 gram
11. 20 gram
12. 30 gram
13. 40 gram+

Ved TP2-TP9 ble det samlet inn hel yngel. Fra TP9 ble det samlet inn organprøver - nyre, milt, gjelle, tarm og hjerte. Målet var å forsøke å beskrive når det ville være gunstig å gjennomføre immunstimulering og vaksinerings. Prøvene ble samlet inn på RNA later (Invitrogen). Prøvene ble homogenisert ved bruk av Precyllis vevshomogenisator (Bertin Instruments) og RNA ble isolert ved bruk av en MagMax ekstraksjonsenhet (ThermoFisher) etter produsentens protokoll. RNA-sekvenseringen ble utført ved bruk av Illumina Hi-Seq ved norsk sekvenseringssenter ved Universitetet i Oslo. TP1 ble ikke inkludert i analysene på grunn av lavt utbytte av RNA. I gen-ekspressionsanalysene var det forventet å finne tidspunkter for aktivering av forskjellige immunfunksjoner, med særlig vekt

på B-celler og immunoglobuliner (Ig). Alle sentrale deler av immunsystemet ble funnet å være tilstede i gentranskriptene fra alle testede stadier, og det ble ikke funnet tydelige forskjeller i uttrykk mellom ulike uttak. Dermed kunne vi ikke basert på disse studiene finne et tidspunkt i utviklingen der vaksinasjon eller immunstimulering anbefales utført. For å bestemme initieringen av adaptive immunresponser mot antigener vil det være nødvendig å bruke en mer målrettet tilnærming, som for eksempel analyser av gener som kontrollerer den somatiske rekombinasjon av Ig og T-celle receptorer (TCR).

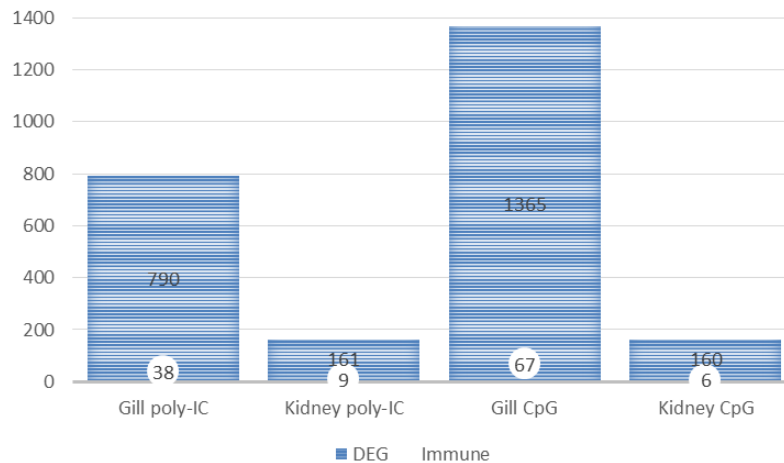
2. *Berggyltens immunrespons mot komponenter som etterligner virus - (poly I:C) og bakterie - (CpG oligonukleotider) infeksjoner*

I del 2) ble det gjennomført et forsøk med uvaksinert berggylt på Nofimas forskningsstasjon på Sunndalsøra. Berggylten var produsert og transportert fra Marine Harvests anlegg på Rissa. Forsøket gikk ved 14°C og fisken ble akklimatisert i forsøkskarene i 14 dager før forsøket startet. 36 berggylt med snittvekt ca 50 gram ble bedøvd med Finquel, 100 mg/liter, og injisert med 100 µl per fisk av:

1. CpG (ODN 2006, InvivoGen; simulerer bakterieinfeksjon)
2. Poly I:C (Sigma; simulerer virusinfeksjon)
3. Salin kontroll

Gruppene ble holdt i separate kar. Prøvetaking av organprøver ble utført 48 timer etter injeksjon. Prøvene ble opparbeidet, RNA isolert og RNA sekvensering gjennomført som for prøvene i del 1). De organene som ble RNA sekvensert var gjelle og hodenyre.

In vivo forsøket med immunstimulantene Poly I:C og CpG gav nyttig informasjon om immun- og stress responser i berggylt. Differensielt uttrykte (induserte) gener (DEG) ble valgt etter følgende kriterier: 2 folds endring sammenlignet med salin kontroll og $p < 0,05$ (T-test). Totalt antall oppregulerte DEG var 2172 og 249 av disse var immungener. Det var påfallende at responsene var svært svake i hodenyreprøvene, tallene var 5 (poly I:C) og 8,5 (CpG) ganger lavere enn i gjelleprøver fra samme fisk (Figur 64). Dette står i skarp kontrast til andre fiskearter, inkludert laks og torsk, da de har sterke immunresponser i nyrevev. Både poly I:C og CpG induserer flere gener tilhørende medfødt immunitet som ikke er spesifikke for vev og celletyper, og som viser lignende responser i forskjellige organer. Nesten fullstendig mangel på overlapping mellom gjelle og hodenyre var også unik for denne studien. Resultatene reiser spørsmålet om hodenyre er et immun (lymfatisk) organ i berggylt? Det synes å være noen andre spesifikke trekk ved responsene for å bekjempe infeksjoner hos berggylt. Flere funksjonelle grupper ble aktivert, inkludert medfødte antivirale responser, komplement og effektorer med forskjellige virkemåter (Tabell 13).



Figur 64 Antall differensielt uttrykte gener (DEG) per behandling (Poly I:C og CpG) og vev (gjelle og hodenyre). Verdiene for immungener er vist i hvite sirkler.

Injeksjon av immunstimulantene hadde liten effekt på antigenpresentasjon og kommunikasjon via kjemokiner, cytokiner og lipidmediatorer. Listen over DEG inkluderte bare ett MHC I antigen (ingen MHC II), to kjemokiner og et cytokin (IL22); enzymer som inngår i eicosanoid metabolismen og som vanligvis er svært responsive i fisk, ble ikke aktivert i berggylt. Medfødte antivirale responser var moderate (50 DEG) og inkluderte flere gener identifisert som virusresponsive gener (VRG) i laks og andre fiskearter (Tabell 14). Imidlertid var de VRGene som er kjent for å ha sterkest induksjon i forskjellige fiskearter, som RTP3, MX, ISG15 eller BANf, ikke på listen. Et interessant funn var den aktive rolle til B-celler indikert med et stort antall gener som koder for Ig (79 gener, hovedsakelig for Ig-lettkjede) og CD22-lignende (9 gener), den viktigste markøren til B-celler. Dette antyder en massiv rekruttering av B-celler til gjellene, der de enten deltar i medfødte immunreponser eller initierer oppbygging av adaptiv immunitet.

Tilstedeværelse av flere paraloger blant DEG var et interessant resultat av denne studien. I tillegg til tidligere nevnte Ig og CD22, inkluderte listen 23 gener for NIGHT, LRR og PYD domene-holdig protein, 10 CD22-lignende, 9 IFN-induserte proteiner med tetratri-copeptid-repeats 2 (IFIT2) -gener, 9 STAT1a-gener, 6 gener for heat repeat containing og 6 gener som koder for SAM og HD-domeneholdig protein.

Tabell 13 Funksjonelle grupper av gener indusert etter poly I:C og CpG stimulering. Antall differensielt uttrykte gener (DEG) er indikert. Data er gjennomsnitt økning sammenlignet med salin kontroll.

Gruppe	Gjelle PolyIC	HK PolyIC	Gjelle CpG	HK CpG
Virus response - 50	3.4	0.7	2.3	0.5
Complement - 7	3.3	2.6	2.9	14.9
Effectors - 24	1.9	1.5	2.1	1.0
B cells - 16	2.9	0.8	2.4	0.7
Ig - 86	5.0	0.7	5.0	1.3
Stress - 10	1.8	1.1	1.9	1.0
Metabolism Iron heme - 8	17.5	2.1	2.4	3.9
Lysosome - 13	3.5	1.0	2.2	1.9
Metabolism Xenobiotic - 7	2.0	1.0	2.4	1.5
Metabolism Ion - 18	2.5	0.8	2.6	1.2
Metabolism Lipid - 38	2.0	1.4	2.3	2.1
Metabolism Mitochondria - 70	2.5	1.0	2.9	1.0
Metabolism Sugar - 20	1.9	1.4	2.3	2.5
Metabolism Nucleotide - 13	2.2	1.0	2.3	1.3

Tabell 14 viser utvalgte gener som kan betraktes som kandidatmarkører for immun- og stressresponser i berggylt. Deres uttrykksforskjeller og funksjoner ble tatt i betraktning i utvelgelsen. Selv om rollen til Arginase ikke er godt forstått, fortjener det oppmerksomhet siden dette genet konsekvent er involvert i inflammatoriske- og stressresponser i atlantisk laks. Myeloperoksidase er en kraftig immuneffektor som produserer frie radikaler. Blant VRG viste GIG 2 de største uttrykksendringene. Dette genet er medlem av en multigen familie som er spesialisert på antivirale responser, og som kun finnes i fisk. Den største uttrykksendringen ble vist av et gen som koder for det heme-bindende proteinet Hemopexin, som også viser høy aktivitet i atlantisk laks. Heme frigitt fra skadede erytrocytter er skadelig på grunn av at det fungerer som en katalysator for produksjon av frie radikaler, og dens nøytralisering er av stor betydning. Hemopexin kan karakteriseres som både en akutt fase - og et stressprotein. Heme-degraderende Heme-oxygenase har en lignende rolle.

Tabell 14 Eksempler på differensielt uttrykte gener i gjelle og hodenyre fra berggylt etter stimulering med Poly I:C og CpG. Genene vist kan fungere som kandidat markørgener for immun- og stressresponser. Data viser endring sammenlignet med salin kontroll.

Navn	Gjelle PolyIC	HK PolyIC	Gjelle CpG	HK CpG
Immunresponser				
B-cell receptor CD22	5.4	0.5	2.3	0.7
Complement C2-like	8.6	11.3	3.7	96.6
Complement C1q-like protein 4	3.0	2.2	3.7	2.9
Arginase 2 protein	6.0	0.8	6.2	1.4
Myeloperoxidase	2.5	1.3	4.0	0.3
Bactericidal permeability-increasing	3.1	0.6	1.8	0.5
Gig2	12.8	0.3	4.1	0.0
Galectin-3-binding protein	6.3	0.6	2.5	0.1
STAT1a	4.4	0.3	5.7	0.3
Ifit2	3.9	0.6	1.1	1.1
Interferon α 3-like	3.3	1.8	1.9	1.3
IRF6	2.8	1.2	3.2	1.1
Ig light chain	34.5	1.0	8.0	1.2
Ig light chain	26.1		17.8	
Ig light chain	19.1		8.3	
Hemopexin	119.0	7.8	5.1	18.1
Heme oxygenase	10.1	0.7	2.7	1.9
Stress, andre				
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	20.5	0.9	32.2	1.7
Immediate early response 2-2	1.8	1.1	2.4	1.0
Jun B-1	0.9	1.5	2.0	1.6
CCAAT/enhancer-binding protein zeta	2.5	0.8	4.1	0.7
Peroxisomal biogenesis factor 7	4.5	1.2	5.7	1.2
Runt-related transcription factor 2a	6.3	1.3	9.0	0.8
Cathepsin Sb	7.1	0.6	5.4	1.3
Cathepsin L1	5.6	0.1	4.0	0.1
Cathepsin D	3.8	1.1	2.1	1.1

Et lite antall chaperoner blant DEG tyder på at responsene på proteinstress ikke var av stor betydning, selv om mitokondriell HSP60 viste sterk oppregulering. Stimulering med Poly I:C og CpG induserte flere gener som er homologe eller gener som vi kjenner som universelle stressmarkører hos atlantisk laks: immediate early reponse 2-2 og transkripsjonsfaktor junb1. Caat/enhancer-binding protein zeta (cebtz) er nært relatert til cebtb, som også spiller en nøkkelrolle i stressresponsene hos laks. Verdt å merke seg var en koordinert oppregulering av flere lysosomale proteolytiske enzymer – kathepsinene l, s, d, o og z. Den komplette listen av DEG er vedlagt som supplement og andre gener kan vurderes.

Oppsummering

Den funksjonelle annoteringen av berggyltens genom og transkriptom antyder at de har et svært komplekst og diversifisert immunsystem, og alle komponenter ble detektert i en aktiv form. I et forsøk der målet var å følge utviklingen av immunsystemet til berggylt fra klekking og opp til 40 gram, var immunkomponenter tilstede på alle tidspunkter som ble undersøkt og vi fant ingen ekspresjonsprofiler

med veldefinerte aktiveringsendringer. For å bestemme initieringen av adaptive immunresponser mot antigener vil det være nødvendig å bruke en mer målrettet tilnærming, som for eksempel analyser av gener som kontrollerer den somatiske rekombinasjon av Ig og T-celle receptorer (TCR). I et immunstimuleringsforsøk med bruk av Poly I:C (syntetisk dobbeltrådig RNA, etterligner virusinfeksjon og CpG (oligonukleotid, etterligner bakterieinfeksjon)), viste hodenyren en veldig svak immunrespons sammenlignet med hva som er kjent fra andre fiskearter. Responsen i gjellene var moderat basert både på antall uttrykte gener og omfanget av uttrykksendringene. Sammenlignet med atlantisk laks, der vi har et stort volum av transkriptomdata å bygge på, tyder dette på funksjonelle begrensninger i immunsystemet hos berggylt, slik som lav aktivitet av cytokin og kjemokin-signaler og antigenpresentasjon. Et trekk ved responsen til berggylt som er verdt å merke seg var høy aktivitet hos B-celler. Det er mulig at den eksperimentelle modellen som ble brukt ikke er godt egnet for berggylt, og immunreaksjonen kan derfor være undervurdert. Imidlertid kan immunaktiviteten faktisk være redusert i denne arten, som sannsynligvis ikke opplever stort patogentrykk i sitt naturlige miljø. Dermed kan tilpasning til akvakulturmiljø være en utfordring for berggylt. Immunstimuleringsforsøket viste flere gener som kan betraktes som immun- og stressmarkører hos berggylt.

Anbefalinger

For rognkjeks larver var det en økning i uttrykket av immunoglobuliner frem mot 796 døgngader, men det økte mest opp til ca. 400 døgngader. Denne informasjonen om utviklingen av immunsystemet bidrar med kunnskap som sammen med vaksinetesting kan danne grunnlaget for å bestemme hvor tidlig man kan dyppvaksinere rognkjeks.

Genanalyser viser at berggylt har et godt utviklet immunsystem og identifiserte immungener er involvert i antibakterielt og antiviralt forsvar, cellekommunikasjon og signalering. I ontogenesestudien ble alle sentrale deler av immunsystemet, inkludert en rekke gener som koder for immunoglobuliner, funnet å være tilstede i gentranskriptene fra alle testede stadier fra og med ca 40 døgngader etter klekking. Det ble ikke funnet tydelige forskjeller i uttrykk mellom ulike uttak. Dermed kan vi ikke basert på denne studien alene si noe om tidligste tidspunkt der vaksinasjon eller immunstimulering kan utføres. Som med rognkjeks, vil man få et grunnlag for å bestemme vaksinasjonstidspunkt om man gjennomfører vaksinetester på noen utvalgte stadier.

4.5.3 Effekt av håndtering, berggylt og rognkjeks

Innledning

Stress spiller en nøkkelrolle i hvirveldyr sin evne til å overleve og utfører nødvendige livsfunksjoner under ugunstige livssituasjoner (Schreck *et al.*, 1993). De fysiologiske responsene til økte plasmakatekolaminer (CA) og kortisol blir ofte påvist i sekundære og tertiære stressresponser. Sekundære stressresponser blir ofte kategorisert som et resultat av den primære stressresponsen på ulike målbare fysiologiske parameter på celle- og organnivå. Mens tertiære stressresponser ofte refererer til de primære og sekundære effekter på individet, populasjonen eller hele økosystemer. Denne klassifiseringen er forenklet, da stress avhenger av omfanget og varigheten av responsen, som kan påvirke fisk på alle nivåer fra molekylært- og biokjemisk- til populasjonsnivå (Wedemeyer, 1996). Da CAer responsen er hurtig og på grunn av det faktum at det har en kort biologisk halveringstid, er det ikke mulig å bruke CA som en indikator på primære stressresponser. Til sammenlikning er frigjøring av kortisol hos dyr relativt forsinket i forhold til CA. Kortisolsyntese og dets frigjøring fra interrenalcellene har en forsinkelsestid på flere minutter, og gjør det derfor mulig å måle hvilenivåer

av dette hormonet i fisk (Wedemeyer, 1996, Wendelaar Bonga, 2011). Det sirkulerende nivået av kortisol er derfor ofte brukt som en indikator på graden av opplevd stress hos fisk (Wendelaar Bonga, 1997, Wendelaar Bonga, 2011).

Kunnskapen om kumulativ stress er viktig for oppdrettere, for selv ved lave nivåer av stress som ikke synes å være skadelige, kan summen av ulike gjentatte stressorer medføre at fisken dør (Barton and Iwama, 1991, Iversen *et al.*, 2005, Iversen and Eliassen, 2014). De fleste fysiologiske OVler forbundet med kumulativ stress (distress - maladaptivt stress), har blitt godt dokumentert i laksefisk (Wendelaar Bonga, 1997, Wendelaar Bonga, 2011). Imidlertid, i forhold til berggylt (*Labrus bergylta*) og rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*) finnes det lite eller ingen data som beskriver de fysiologiske OVler og LABVler i sammenheng med stress. I denne seksjonen vil en presenterer eksperimentelle data av fysiologiske LABVler og OVler fra berggylt, rognkjeks og atlantisk laks (som referanse) fra en rekke eksperimenter utført ved Nord Universitet, Fakultet for akvakultur og Bioscience, i Bodø, Norge. I tillegg gjennomførte en kontrollerte dose-respons forsøk for å finne stressverdier og toleransegrenser ved akutt og kronisk håndtering ved ulike størrelser av rensefisk (berggylt og rognkjeks).

Material og metode

Komparativt studium av stressresponsen hos rensefisk og laks (ikke del av RENSVEL)

Fisken i forsøket var henholdsvis $43,8 \pm 8,4\text{g}$ (berggylt), $55,6 \pm 9,5\text{g}$ (rognkjeks) og $66,4 \pm 10,8\text{g}$ (laks) ved forsøksstart. All fisk ble akklimatisert i 3 uker, for deretter bli utsatt for en akutt sammentrenging (ved å senke vannstanden) med en tetthet på 264 kg/m^3 med en varighet på 30 minutter. Etter stressoren ble fisken fordelt i 10 isolerte kar ($0,5\text{ m}^3$ kar). Blod ble tatt før stressor (Pre-stress) og deretter 1, 2, 3, 4, 6, 12, 24, 48, and 72 timer etter stressor etter en metode beskrevet av Iversen *et al.*, 2014. Blodplasma ble analysert for plasmakortisol (Iversen *et al.*, 1998) (primære stressrespons), glukose, laktat, osmolalitet, klorid og magnesium (Nilsson, Stien, Iversen *et al.*, 2018).

Dette forsøket var ikke en del av RENSVEL, men tas med i denne rapporten ettersom det bidrar til viktig informasjon hva angår grenseverdier som vi bruker for å forklare funnene i RENSVEL.

Akutt og kronisk håndtering av rensefisk. Effekt av størrelse.

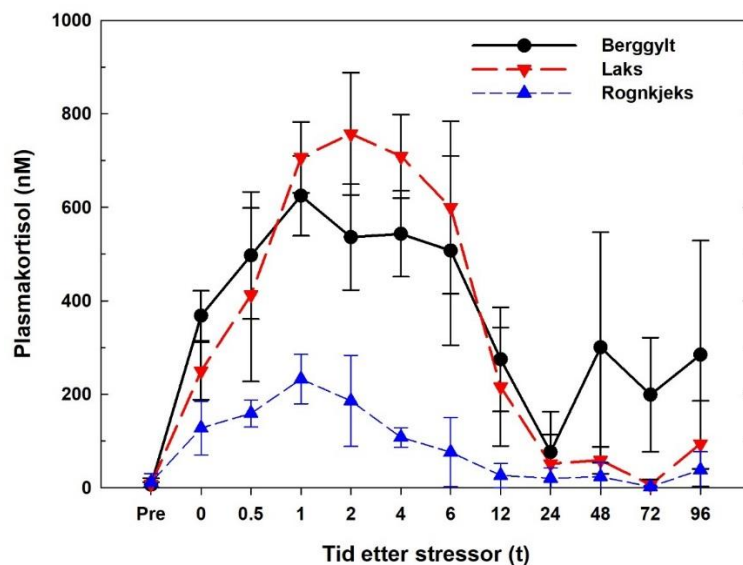
Fisken i forsøket som ble det benyttet var «liten» ($23,62 \pm 8,60\text{g}$) og «stor» berggylt ($43,79 \pm 8,36\text{g}$) og «liten» og «stor» rognkjeks på henholdsvis $20,7 \pm 4,1\text{ g}$ og $100,6 \pm 14,6$. Den akutte stressresponsen ble gjennomført som beskrevet i metode ovenfor, mens det kroniske stressforsøket varte i en måned, og fisken ble utsatt for henholdsvis 1. Kontroll (intet stress), 2. Daglig stress (sammentrenging 264 kg/m^3 i 30 min) eller 3. Stress 3 ganger i uka (sammentrenging 264 kg/m^3 i 30 min). Blodprøver ble tatt før, 1, 2, 3, og 4 uker med daglig stress eller 3 ganger i uka. Blodprøvene ble gjennomført mandags morgen klokka 08:00 etter en metode beskrevet av Iversen *et al.*, 2014. Blodplasma ble analysert for plasmakortisol (Iversen *et al.*, 1998) (primære stressrespons), glukose, laktat, osmolalitet, klorid og magnesium (Nilsson, Stien, Iversen *et al.*, 2018). For å dokumentere endring i HPI-aksen ble det gjennomført en sensitivitets-(ACTH) og negativ tilbakekoblingstest (dexametason) ved samme tidspunkt. Testene ble utført før, 1, 2, 3, og 4 uker etter stressor. 24 fisk per gruppe (totalt 96 fisk + 24 fisk til pre-stress) ble brukt til denne testen. Etter 24 timer ble 12 fisk håvet over i en 10 L bøtte med bedøvelse (metomidate, 5 mg/L). Fisken ble veiet og deretter injisert med deksametason i buken ($0,1\text{ ml/100g}$ fisk), og lagt tilbake i en ny 10 L bøtte med rent vann for oppvåkning. Deretter ble fisken plassert tilbake i karet. 24 timer etterpå ble fisken igjen håvet ut i 10 L bøtte med metomidate (5 mg/L), 6 av fiskene ble veiet og injisert med PBS (dosering: $0,1\text{ ml/100g}$ fisk) (negativ tilbakekoblingstest), og

6 ble veiet og injisert med ACTH (0,1ml/100g fisk). Fiskene ble så adskilt i to forskjellige kar. To timer senere ble de tatt ut igjen for prøvetak. Det ble notert ned vekt og lengde, og det ble tatt blodprøver etter metode beskrevet ovenfor. Prøvene ble analysert for plasmakortisol (Iversen et al., 1998).

Resultater og diskusjon

Komparativt studium av stressresponsen hos rensefisk og laks

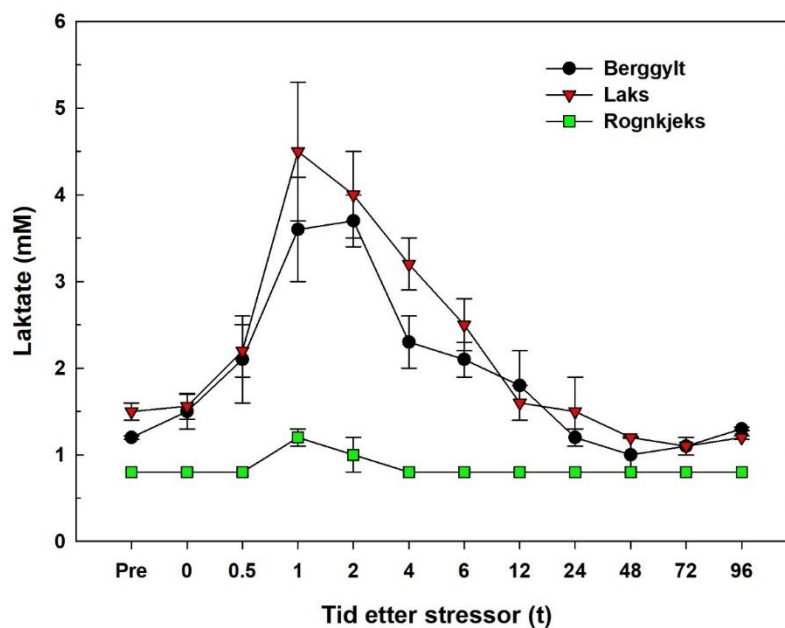
Figur 65 og 66 viser endringene i de fysiologiske LABVlene (laboratoriebaserte velferdsindikatorer) plasmakortisol og laktat. De viser at berggyll og laks har tilnærmet lik primær (kortisol) og sekundær stressrespons (laktat). Rognkjeks viser imidlertid moderat primær og en svak sekundær stressrespons, og denne stressprofilen er mer eller mindre identisk til Atlantisk kveite (*Hippoglossus hippoglossus*) sin stressrespons (Treasurer et al., 2018). Betyr dette at rognkjeks er mindre utsatt for stressrelaterte sykdommer og dødelighet? Å svare på dette er ikke enkelt. Tidligere rapporter fra produksjon av rensefisk i Norge antyder at rognkjeks synes å være mer "robust" sammenlignet med fiskearter. Rognkjeks synes også å være mer robust og mer motstandsdyktig mot stress, og dette kan forklare de lavere basale nivåene av kortisol før og etter stressfulle hendelser. Men imidlertid er det dokumentert at rognkjeks også har en øvre tålegrense for stress hvor kompromittert velferd medfører sykdommer, finneerosjon, fysisk skade og økt dødelighet (Hanssen et al., 2016).



Figur 65 Gjennomsnittlige plasmakortisol responsen etter 30 minutters sammentrengingsstressor (264 kg/m³) hos laks, berggyll og rognkjeks.

En annen mulig forklaring på denne forskjellen i stressrespons mellom berggyll og rognkjeks kan ligge i deres forskjellige biologi, økologi, adferd og morfologi. De fleste beinfisker har en fluktreffleks eller C-startrefleks, som utløses av et par store neuroner som ligger i bakhjernen hos fisk, også kalt flukt Mauthner-celler (Bierman et al., 2009). Fluktresponsen hos fisk er delt i to faser: i). Fisken orienterer hodet vekk fra trusselen, og ii) initierer en kontraksjon med halen som medfører en framdrift vekk fra trusselen (Eaton et al., 1988). Det kan se ut som om rognkjeks mangler disse nevronene (Hale, 2000). Den primære responsen til en trussel kan være å feste seg til underlaget med sugeskålen og gjemme seg istedenfor å flykte. Rognkjeks stoler derfor på sin beinbygning og sugeplate som sitt første forsvar mot farer (Davenport, 1985, Davenport and Thorsteinsson, 1990).

Denne evolusjonære forskjellen i reaksjon på en gitt trussel mellom berggyllt og rognkjeks vil også mest sannsynlig uttrykke seg i noen forskjeller i de fysiologiske LABVIene. Økningen av laktat observert i laks og berggyllt umiddelbart etter stress, er sannsynligvis på grunn av muskelglykolyse (Moon and Foster, 1995), og er blitt utløst av høy muskelaktivitet under selve fluktnesresponsen. Siden rognkjeks ikke flykter fra fare, men i stedet gjemmer seg og suger seg fast vil de ikke fremkall høye nivåer av glukose eller laktat i blodet under stress. Dette kan også ha en potensiell effekt på den primære stressresponsen, for eksempel plasmakortisol. Denne tilpasningen til farer som rognkjeks viser er en evolusjonær tilpasning til trussel, og denne typen fysiologisk stressresponser er også observert i kveite og gråsteinbit (*Anarhichas lupus*). Men selv om plasmakortisol er tre til fire ganger høyere i berggyllt sammenlignet med rognkjeks ved eksponering for en stressor, bør man være forsiktig til å tolke dette som om berggyllt er en mer mottakelig for stressrelaterte side effekter. Dette det kan være et uttrykk for ulike evolusjonære tilpasninger til ulike livsstiler. Hanssen et al. (2016) viste at rognkjeks utsatt for daglige stressorer vise tegn på kronisk stress med redusert funksjon av hypothalamus-hypofysen-interrenal aksen. Man mente da at dette var årsaken for den redusert veksten og økt finne-erosjon i etterkant. Mer arbeid må gjøres for å forstå subtile forskjellen i stressresponsen mellom de forskjellige artene av rensefisk for å identifisere de mest hensiktsmessige og funksjonelle OVIene og LABVIene for hver art, i tillegg til den optimale rekkevidden av disse.



Figur 66 Gjennomsnittlige plasmakortisol responsen etter 30 minutters sammentrengingsstressor (264 kg/m³) hos laks, berggyllt og rognkjeks.

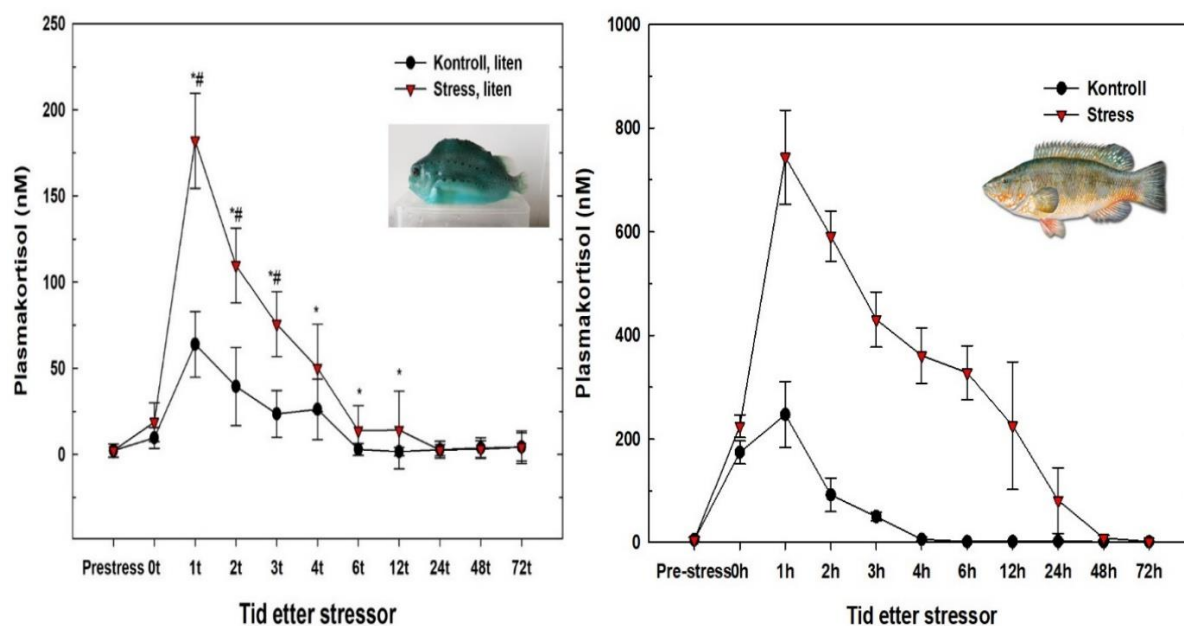
Akutt og kronisk håndtering av rensefisk. Effekt av størrelse.

Akutt stress

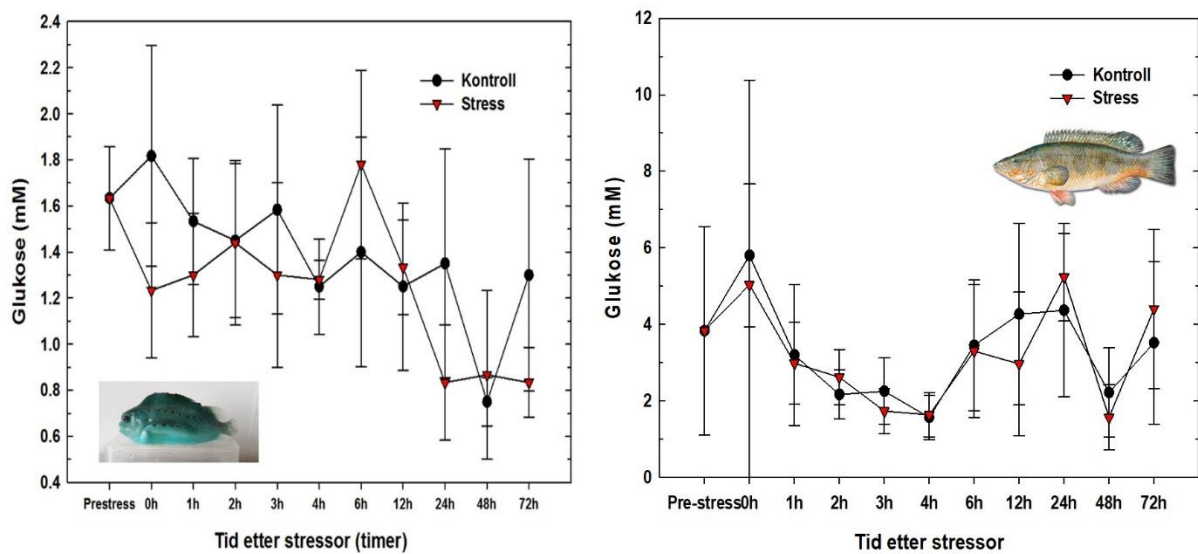
Resultatene er oppsummert i figurene 67 – 73. For mer detaljert diskusjon på forskjeller mellom rognkjeks og berggyllt under akutt stress se diskusjon ovenfor og Master i bioscience (Jensen, 2018). Kort oppsummert viste fiskene forhøyede verdier av kortisol som vendte tilbake til normalen innen 48 timer etter å ha blitt utsatt for en allostatisk overbelastning av type I (akutt stress). Det ble registrert en midlertidig oversensitivitet av ACTH, men ingen negativ effekt på det negative

tilbakekoblingssystem, noe som tyder på at begge artene håndterer akutt stress utmerket. Stresset rognkjeks og berggyllt viste også en mer aggressiv territoriell adferd med økt finne-slitasje.

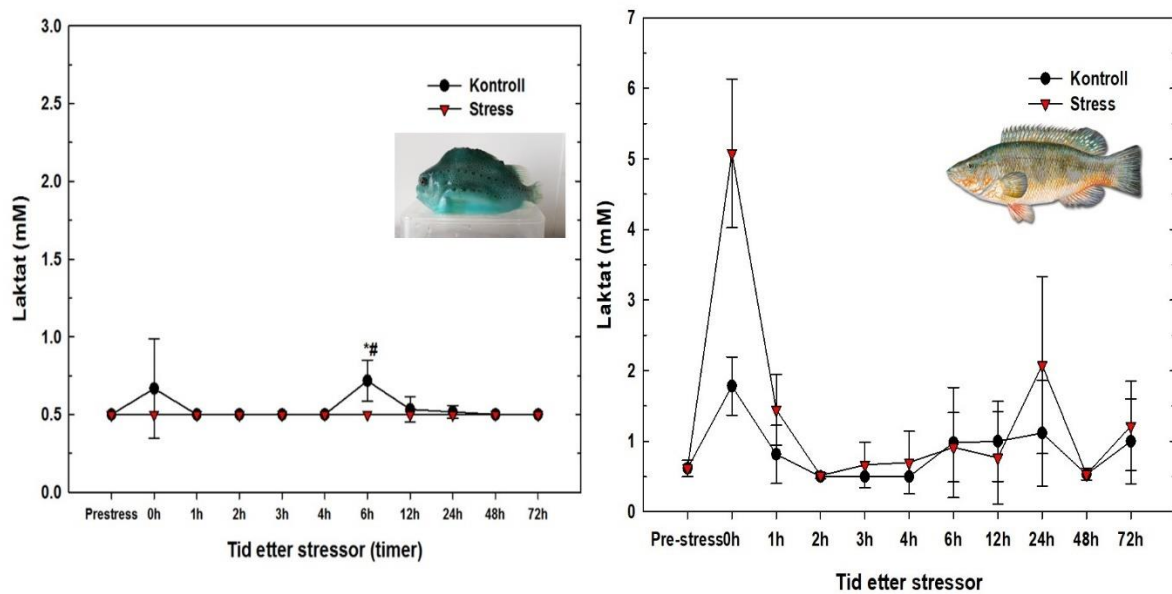
Alle parametere ser ut til å vende tilbake til startverdiene i løpet av studiet. Følgende LABVler synes å være egnet til å dokumentere akutt stress plasmakortisol, klorid, magnesium, mens andre LABVler som osmolalitet og glukose gav ingen utslag hos noen fiskeslag. Laktat kan benyttes som LABVI hos berggyllt, men egner seg ikke ved bruk hos rognkjeks.



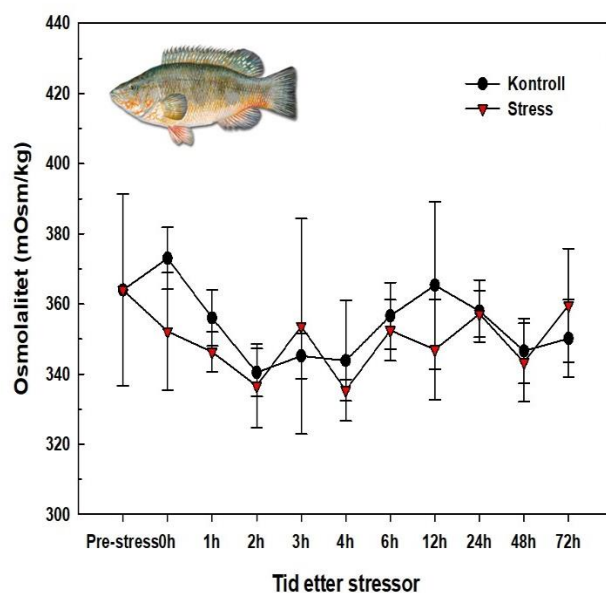
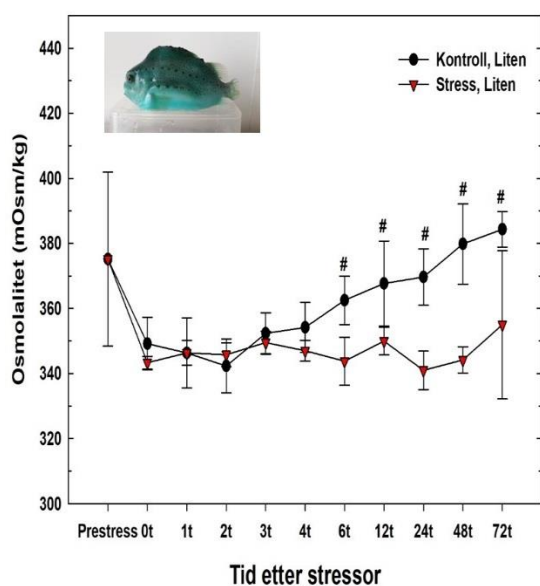
Figur 67 Gjennomsnittlige plasmakortisol responsen (nM) etter 30 minutters sammentrengingsstressor (264 kg/m^3). * indikerer statistisk forskjell (ANOVA) fra pre-stress ($p < 0.05$) og # indikerer statistisk forskjell (ANOVA) mellom gruppene ved samme tidspunkt ($p < 0.05$) (Jensen, 2018).



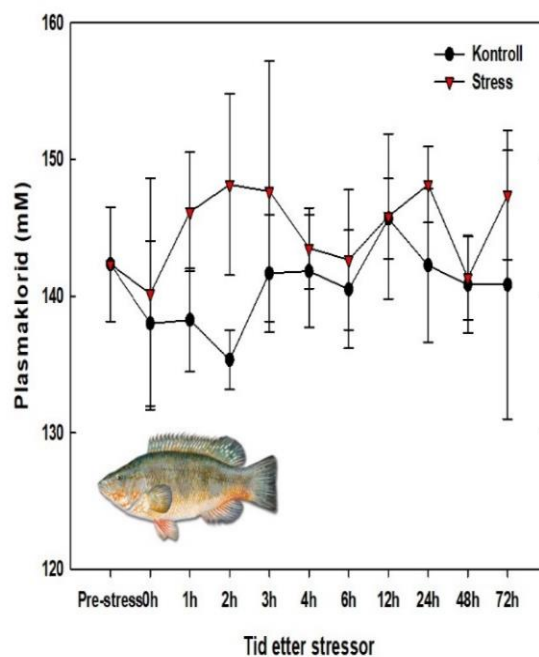
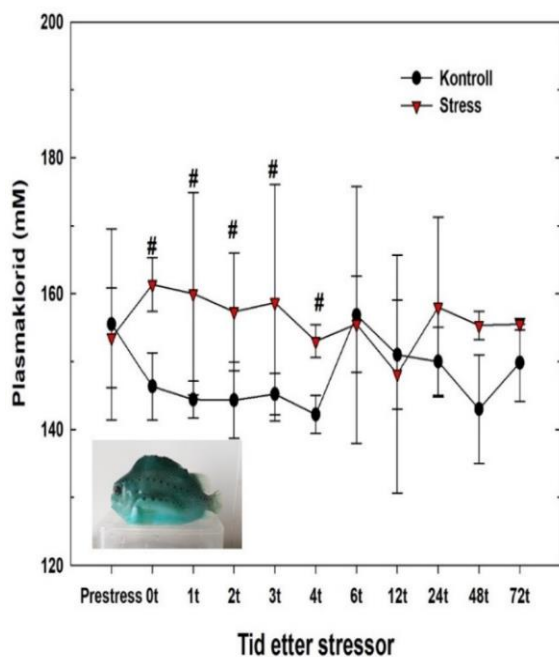
Figur 68 Gjennomsnittlige glukoserespons (mM) etter 30 minutters sammentrengingsstressor (264 kg/m^3). * indikerer statistisk forskjell (ANOVA) fra pre-stress ($p < 0.05$) og # indikerer statistisk forskjell (ANOVA) mellom gruppene ved samme tidspunkt ($p < 0.05$) (Jensen, 2018).



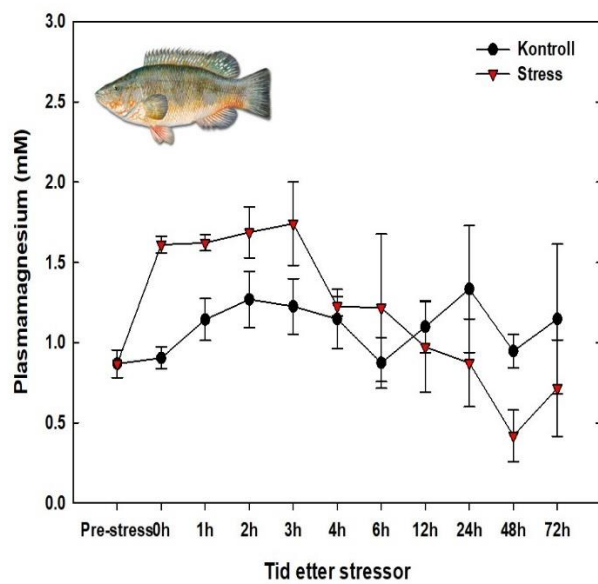
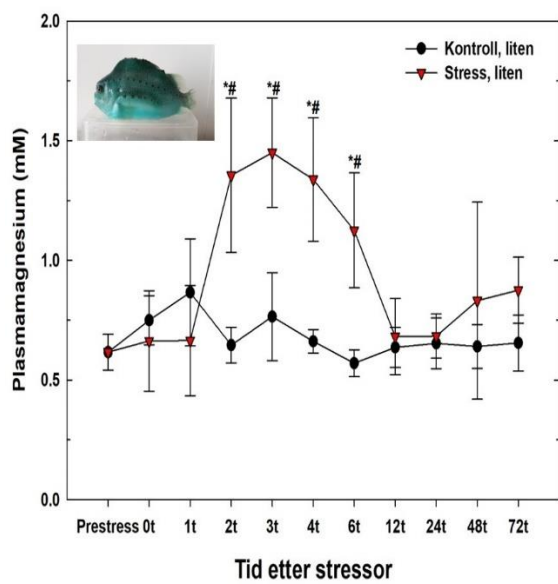
Figur 69 Gjennomsnittlige laktatrespons (mM) etter 30 minutters sammentrengingsstressor (264 kg/m^3). * indikerer statistisk forskjell (ANOVA) fra pre-stress ($p < 0.05$) og # indikerer statistisk forskjell (ANOVA) mellom gruppene ved samme tidspunkt ($p < 0.05$) (Jensen, 2018).



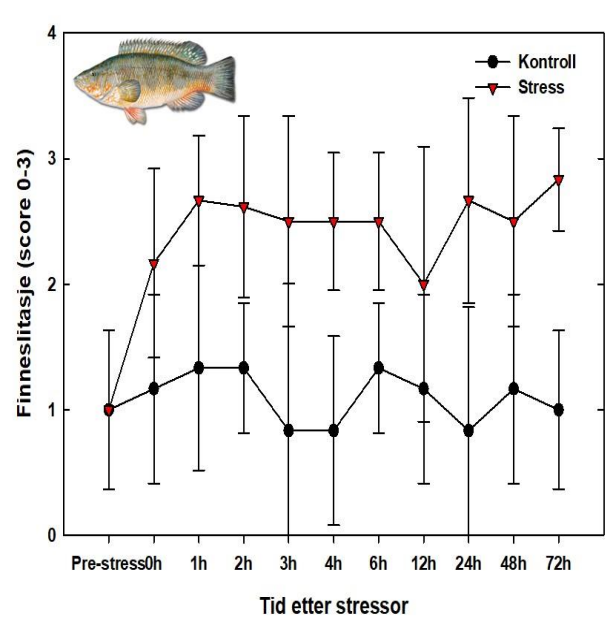
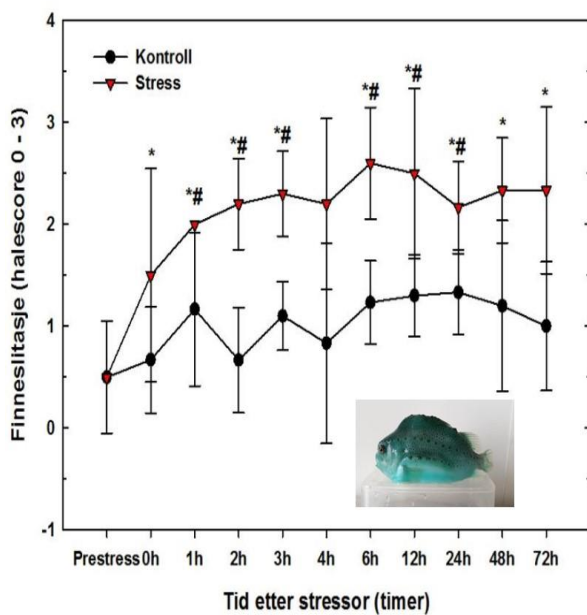
Figur 70 Gjennomsnittlige osmolalitet (mOsm/kg) etter 30 minutters sammentrengingsstressor (264 kg/m^3). * indikerer statistisk forskjell (ANOVA) fra pre-stress ($p < 0.05$) og # indikerer statistisk forskjell (ANOVA) mellom gruppene ved samme tidspunkt ($p < 0.05$) (Jensen, 2018).



Figur 71 Gjennomsnittlige plasmaklorid (mM) etter 30 minutters sammentrengingsstressor (264 kg/m^3). * indikerer statistisk forskjell (ANOVA) fra pre-stress ($p < 0.05$) og # indikerer statistisk forskjell (ANOVA) mellom gruppene ved samme tidspunkt ($p < 0.05$) (Jensen, 2018).



Figur 72 Gjennomsnittlige plasmamagnesium (mM) etter 30 minutters sammentrengingsstressor (264 kg/m^3). * indikerer statistisk forskjell (ANOVA) fra pre-stress ($p < 0.05$) og # indikerer statistisk forskjell (ANOVA) mellom gruppene ved samme tidspunkt ($p < 0.05$) (Jensen, 2018).



Figur 73 Finneslitasje etter 30 minutters sammentrengingsstressor (264 kg/m^3). * indikerer statistisk forskjell (ANOVA) fra pre-stress ($p < 0.05$) og # indikerer statistisk forskjell (ANOVA) mellom gruppene ved samme tidspunkt ($p < 0.05$) (Jensen, 2018).

0 til 2 timer etter akutt stress ble det registrert en signifikant sammenheng mellom plasmakortisol og finneslitasje på henholdsvis $r^2 = 0,754$ (rognkjeks) og $r^2 = 6,126$ (berggyllt).

Kronisk stress

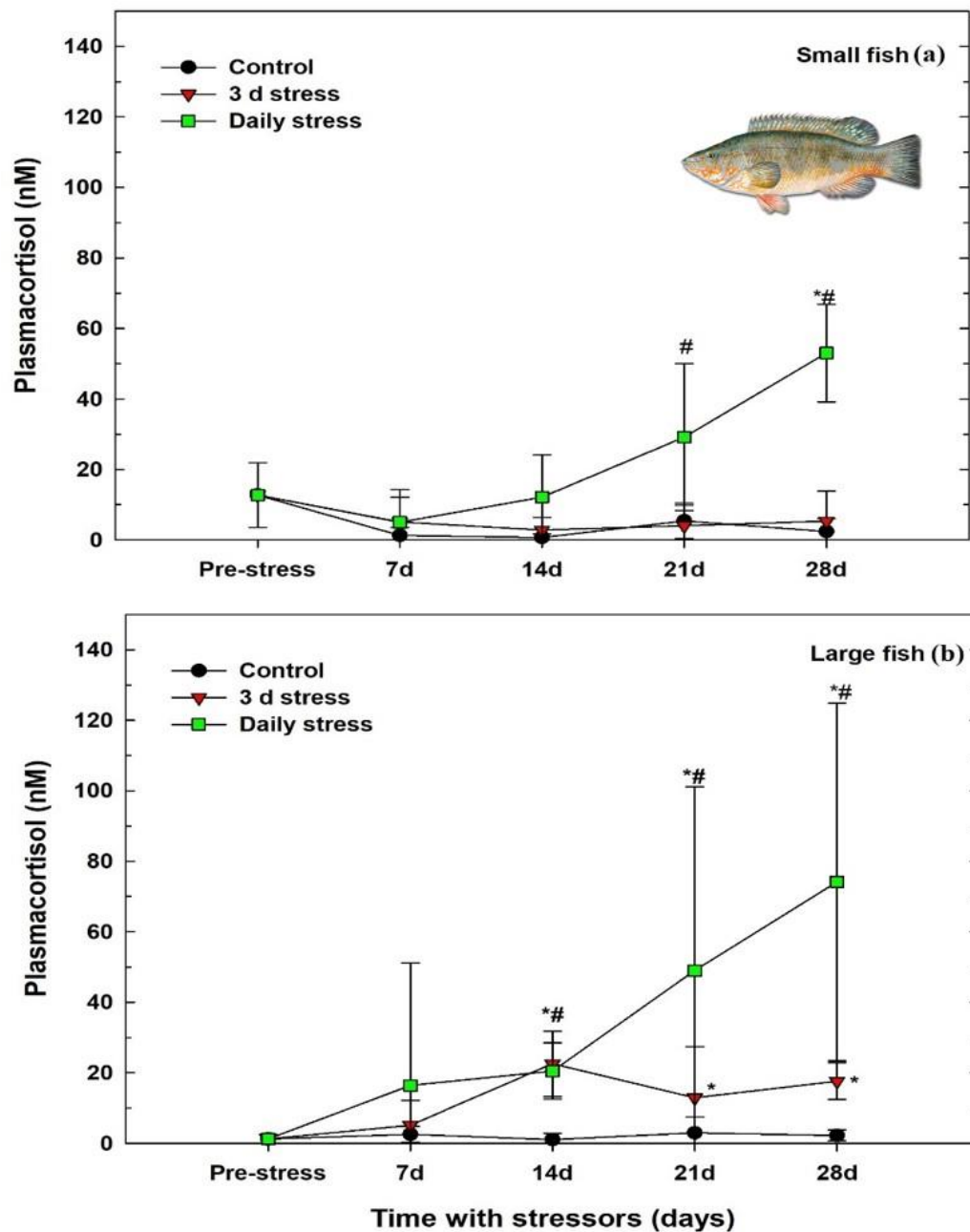
Resultatene er oppsummert i figurene 74 til 91. For mer detaljert diskusjon på forskjeller mellom rognkjeks og berggylt, og effekten av størrelse se Master i bioscience, rognkjeks (Sällebrant, 2018) og berggylt (Virtanen, 2018).

Rognkjeks

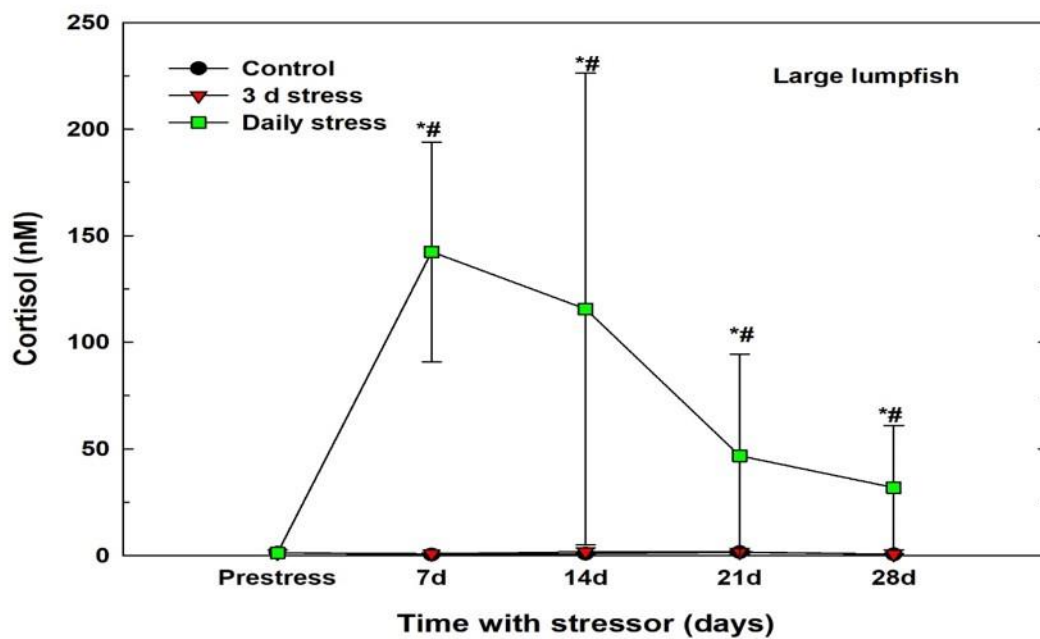
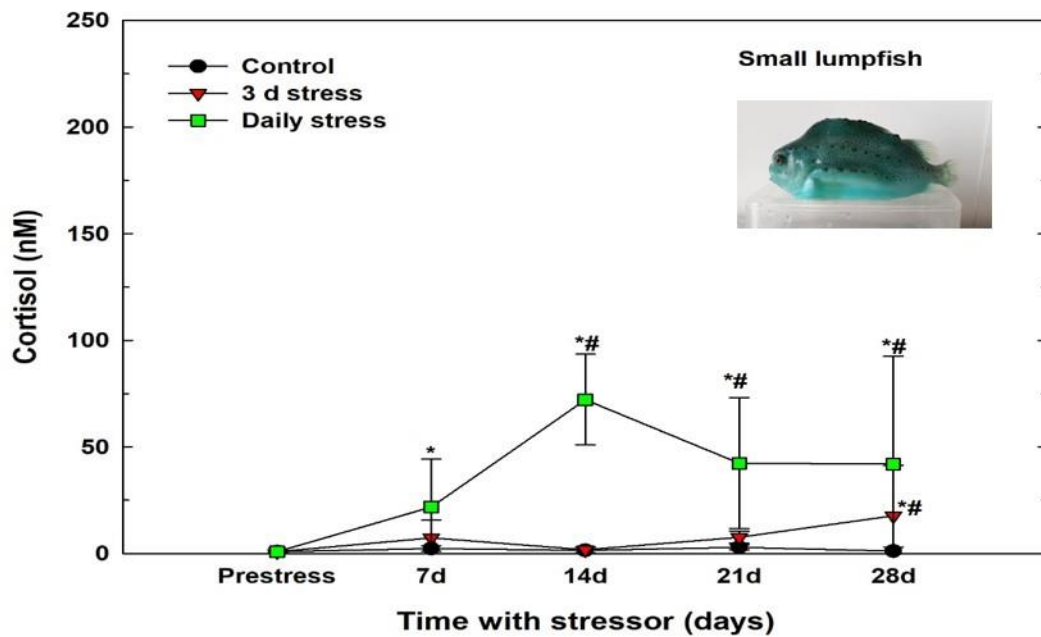
For å sikre en bærekraftig utvikling av den hurtigvoksende rognkjeksindustrien, med tanke på fiskevelferd, har man undersøkt den kroniske stressresponsen og effekten av fiskens størrelse «liten», 20,7 ($\pm 4,1$) g og «stor» rognkjeks 100,6 ($\pm 14,6$) g. En sammentrengingsstressor ble applisert i 30 minutter med to intervaller (daglig og tre ganger per uke) i 28 dager. Plasmakortisol, negativ tilbakekoblingsmekanisme og ACTH sensitivitet ble brukt som primære stressindikatorer, metabolisme (glukose og laktat) samt osmoregulering (magnesium, klorid og osmolalitet) ble brukt som indikasjon på sekundære stressresponser. Tilsvarende ble tilvekst og finne-erosjon brukt som indikasjon på tertiære stressresponser. Basert på de observerte endringene i den primære, sekundære og tertiære stressresponsen kan det tyde på at rognkjeks utvikler en type 2 allostatisk overbelastning (kronisk stress) ved daglig stress, men med noen vesentlige forskjeller mellom størrelsene. «Liten» rognkjeks viser en mer karakteristisk proaktiv forsvarsmekanisme som inkluderer lavere kortisol respons, dominant adferd og god tilvekstfaktor. «Stor» rognkjeks viser antydning på en mer reaktiv forsvarsmekanisme med høyere plasma kortisol, mindre finne-biting og redusert tilvekst. Både «stor» og «liten» rognkjeks viser tegn på en type 2 allostatisk overbelastning (kronisk stress), men med forskjeller i tid og styrke av de forskjellige responsene. Stor rognkjeks ser ut til å være mer følsom for graden av stressoren og viser maladaptive tegn tidligere enn liten rognkjeks hos daglig stresset fisk. Samtidig ser det ut som om stor rognkjeks håndterer stress 3 ganger per uke bedre enn liten fisk, som viser tegn på maladaptiv overbelastning av HPI-aksen likt daglig stresset fisk. Rognkjeks ser ut til å håndtere stress under optimale forhold og ny kunnskap, som den presentert her kan bidra til å utvikle god oppdrettspraksis for å minimere påvirkningen av langvarig stress hos rognkjeks i forskjellige utviklingsfaser (Sällebrant, 2018).

Berggylt

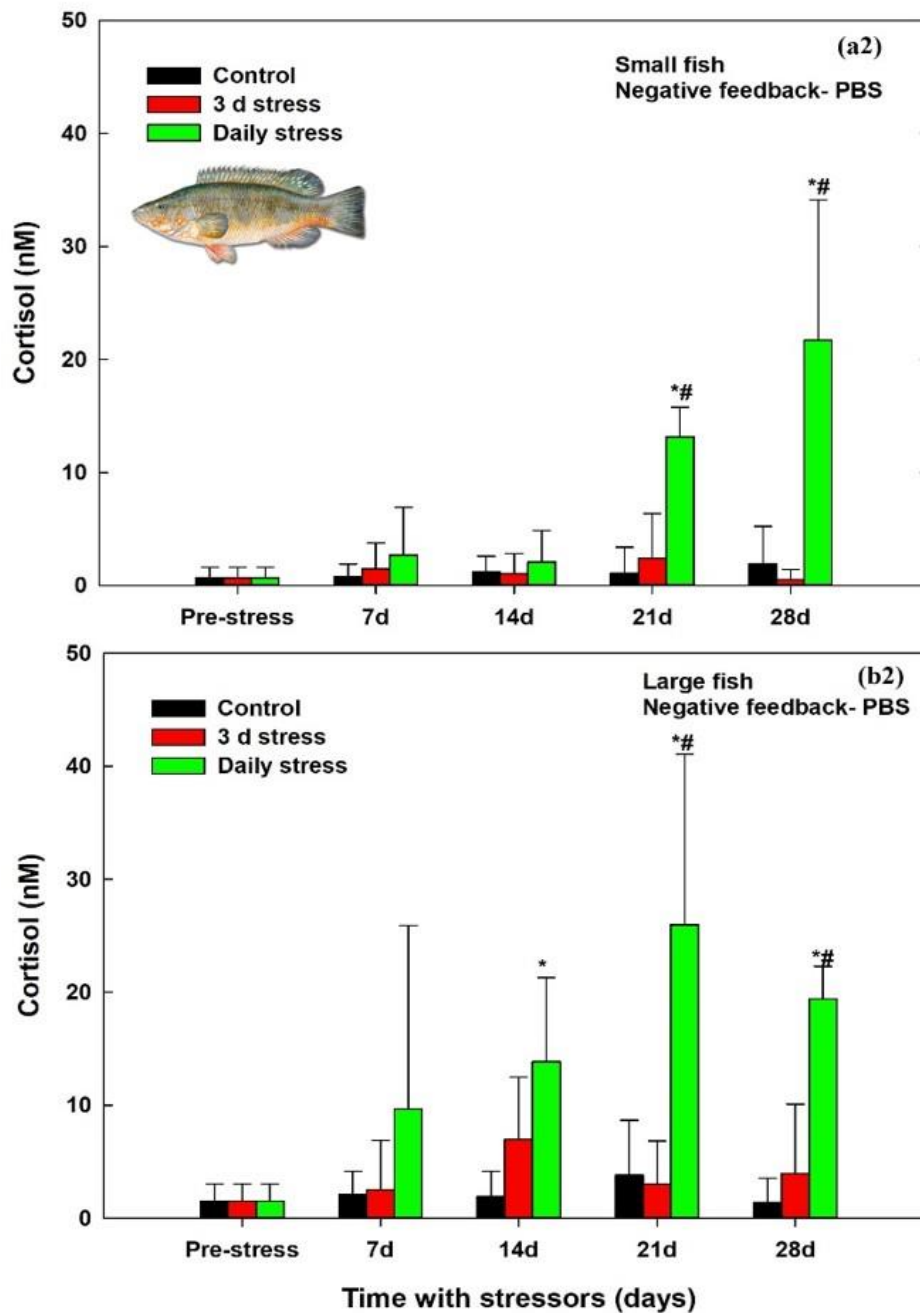
Studien besto av seks grupper berggylt basert på størrelse og behandling; 1) «liten» kontroll, 2) «liten» semi-stress, 3) «liten» daglig stresset, 4) «stor» kontroll, 5) «stor» semi-stresset og 6) «stor» daglig stresset. Størrelsesforskjellen mellom gruppene «liten» og «stor» berggylt var henholdsvis 23,62 $\pm$ 8,60 g og 43,79 $\pm$ 8,36 g). Stressoren bestod av en 30 minutter sammentrengingsstressor som ble initiert ved å tømme tankene til en tetthet på 264 kg/m³ ble nådd enten daglig eller 3 ganger i uka. En ACTH-stimuleringstest viste overfølsomhet hos både «liten» og «stor» daglig stresset berggylt. Tilsvarende viste den negative tilbakekoblingstesten redusert regulering av kortisol på både 21 dag og 28 dager for uavhengig av størrelse i samme gruppe. Basalnivåene av plasmakortisol økte betydelig fra 14, 21 og 28 dagers hos «stor» berggylt, og fra 21 og 28 dagers hos «liten» berggylt utsatt for daglig stressor. De LABVier som viste en signifikant forskjell mellom «liten» og «stor» berggylt inkluderte sekundære stressresponsene; laktat, klorid og osmolalitet, og de tertiære stressresponsene; finne-erosjon og SGR. Resultatene av denne studien indikerte forskjellige nyttige LABVier for både «liten» og «stor» berggylt. De mest lovende velferd indikatorene i rekkefølge fra mest verdifulle for «liten» berggylt var finne-erosjon, SGR, kortisol og plasmamagnesium, og for «stor» berggylt plasmakortisol, SGR, klor og osmolalitet (Virtanen, 2018).



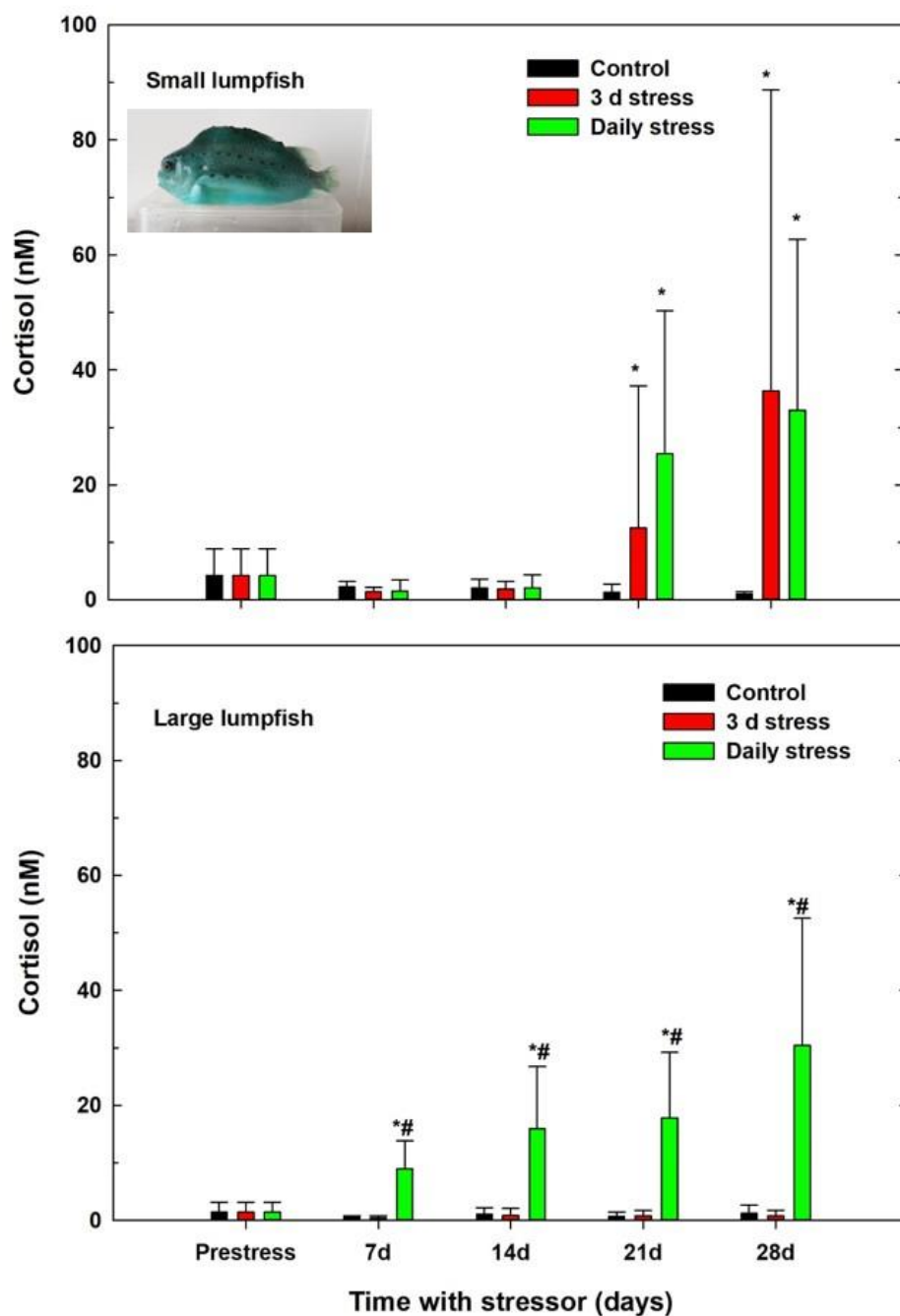
Figur 74 Gjennomsnittlige plasmakortisol (nM) hos berggyllt etter ingen (kontroll), 3 ganger i uka og daglig 30 minutters sammentrengingsstressor (264 kg/m³). * indikerer statistisk forskjell (ANOVA) fra pre-stress ($p < 0.05$) og # indikerer statistisk forskjell (ANOVA) mellom gruppene ved samme tidspunkt ($p < 0.05$) (Virtanen, 2018).



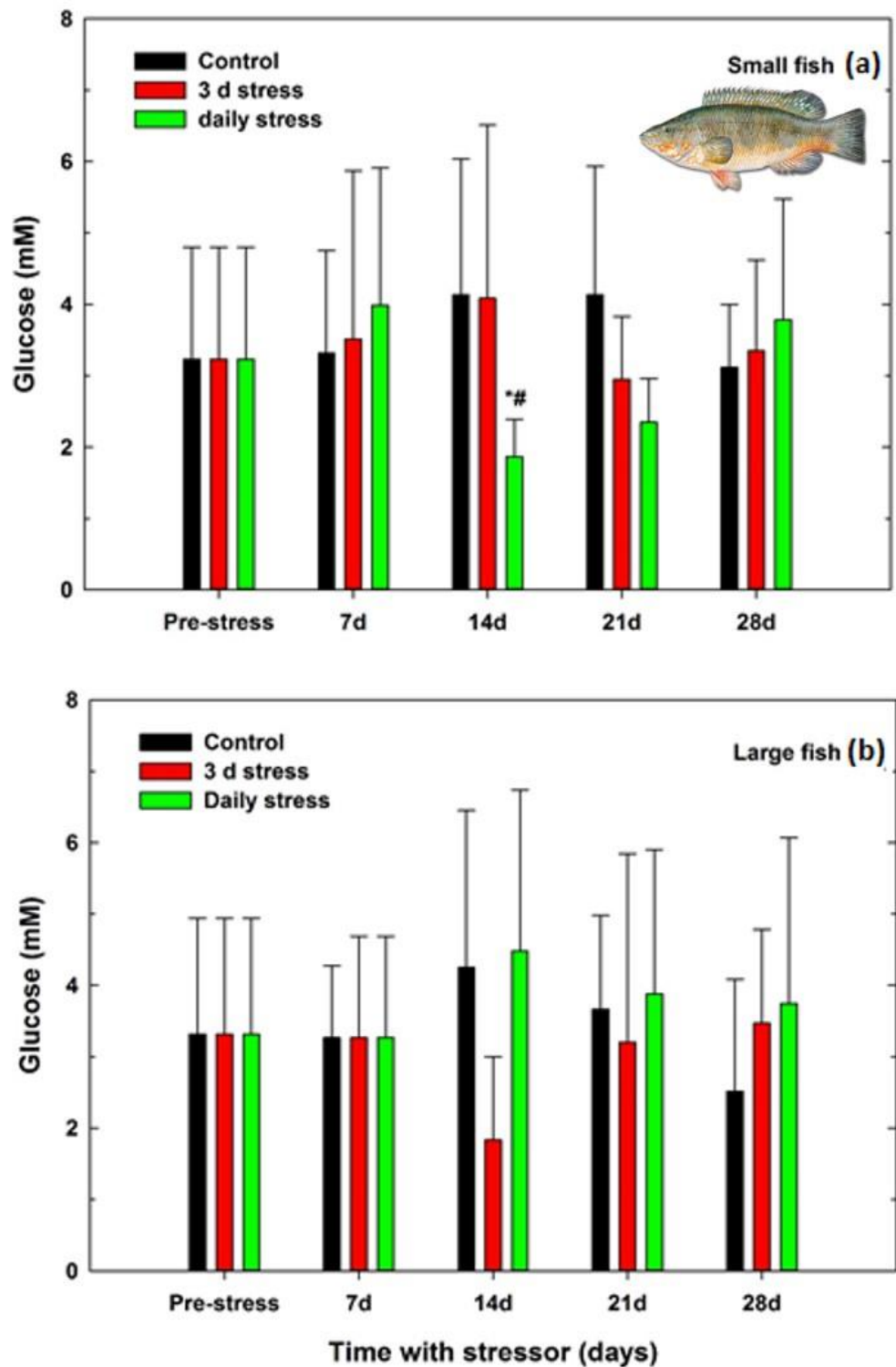
Figur 75 Gjennomsnittlige plasmakortisol (nM) hos rognkjeks etter ingen (kontroll), 3 ganger i uka og daglig 30 minutters sammentrengingsstressor (264 kg/m^3). * indikerer statistisk forskjell (ANOVA) fra pre-stress ($p < 0.05$) og # indikerer statistisk forskjell (ANOVA) mellom gruppene ved samme tidspunkt ($p < 0.05$) (Sällebrant, 2018).



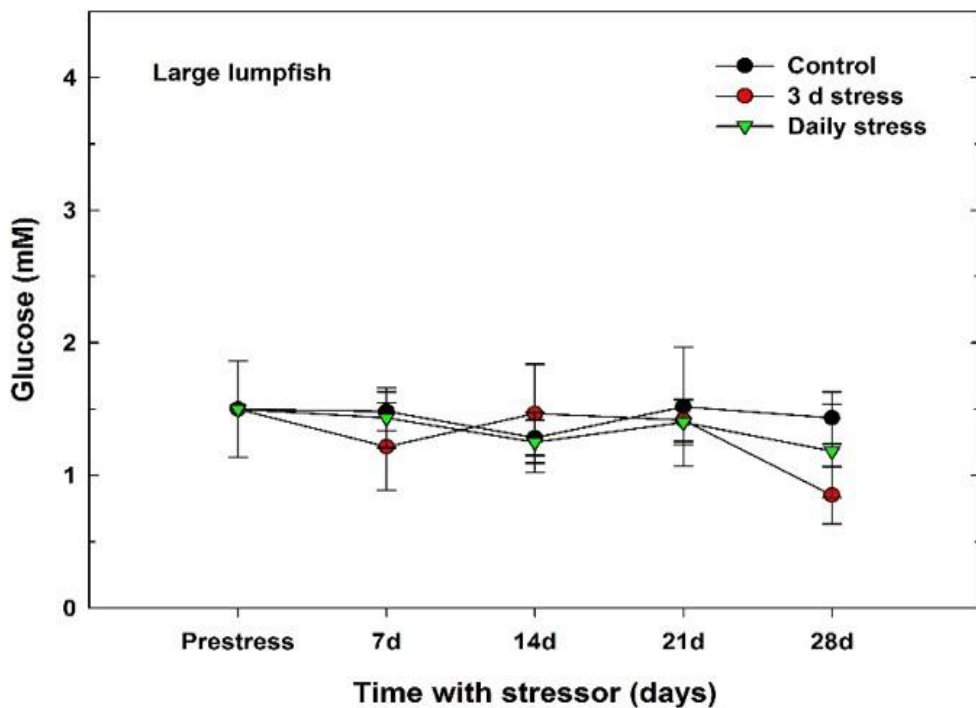
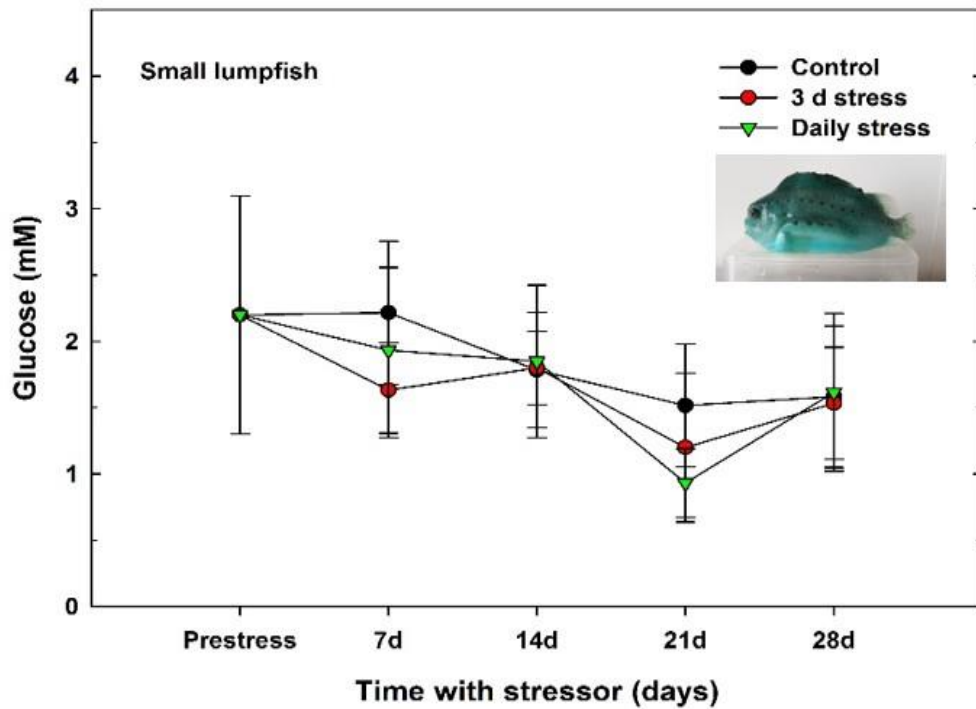
Figur 76 Negativ tilbakekoblingstest målt som plasmakortisol (nM) hos berggylt etter ingen (kontroll), 3 ganger i uka og daglig 30 minutters sammentrengingsstressor (264 kg/m³). * indikerer statistisk forskjell (ANOVA) fra pre-stress ($p < 0.05$) og # indikerer statistisk forskjell (ANOVA) mellom gruppene ved samme tidspunkt ($p < 0.05$) (Virtanen, 2018).



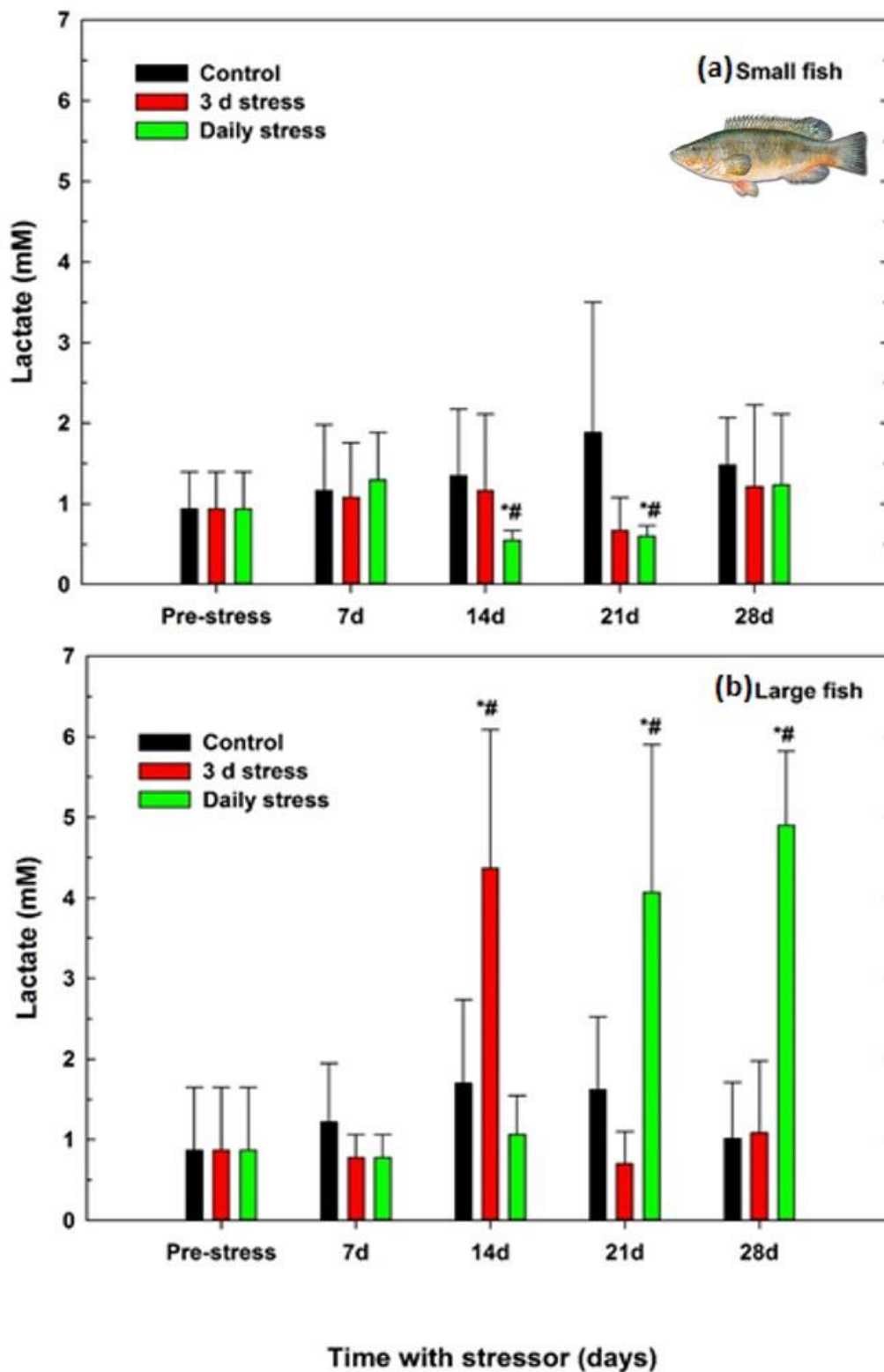
Figur 77 Negativ tilbakekoblingstest målt som plasmakortisol (nM) hos rognkjeks etter ingen (kontroll), 3 ganger i uka og daglig 30 minutters sammentrengingsstressor (264 kg/m^3). * indikerer statistisk forskjell (ANOVA) fra pre-stress ($p < 0.05$) og # indikerer statistisk forskjell (ANOVA) mellom gruppene ved samme tidspunkt ($p < 0.05$) (Sällebrant, 2018).



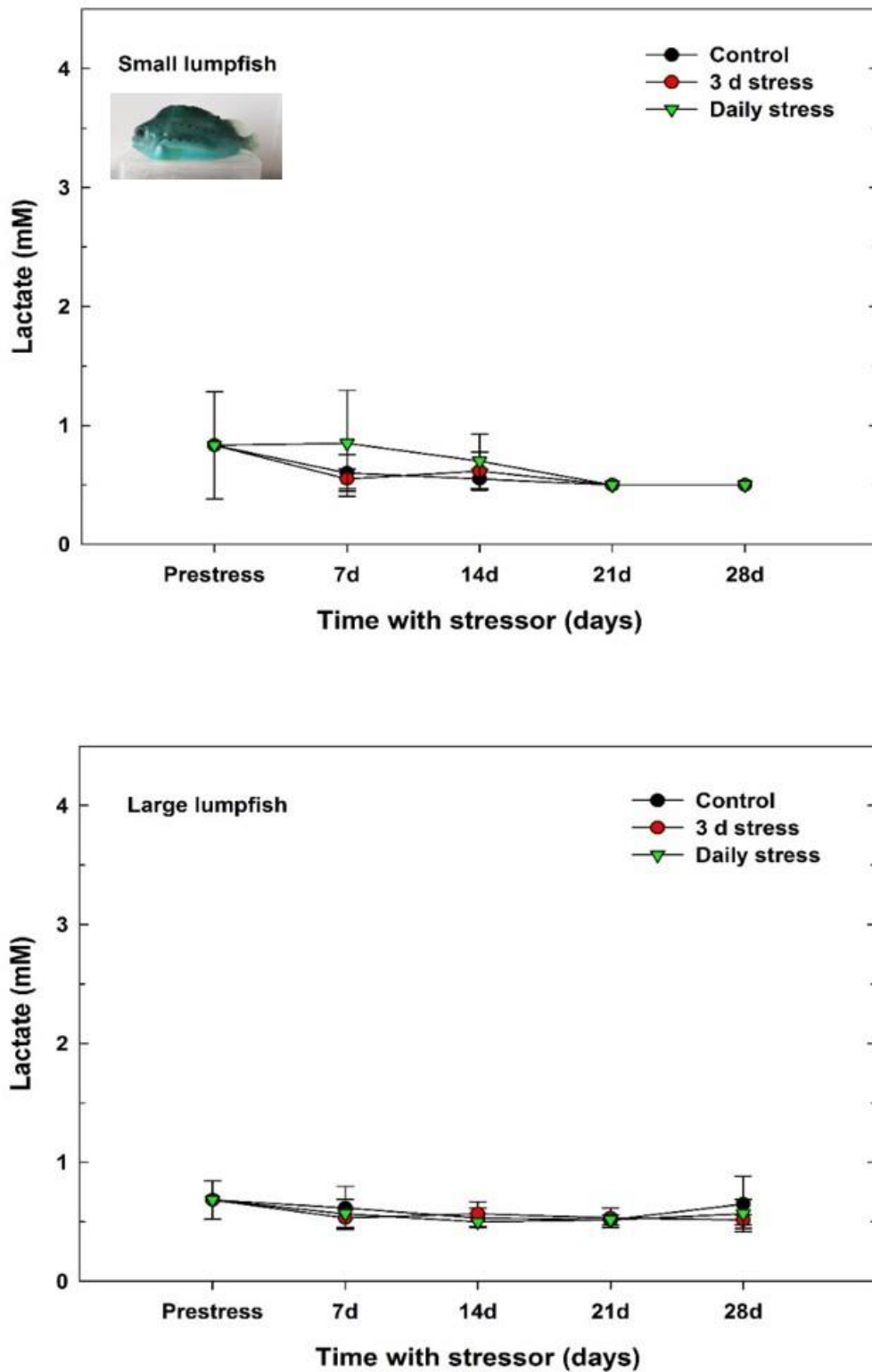
Figur 78 Gjennomsnittlige glukose respons (mM) hos berggyt etter ingen (kontroll), 3 ganger i uka og daglig 30 minutters sammentrengingsstressor (264 kg/m^3). * indikerer statistisk forskjell (ANOVA) fra pre-stress ($p < 0.05$) og # indikerer statistisk forskjell (ANOVA) mellom gruppene ved samme tidspunkt ($p < 0.05$) (Virtanen, 2018).



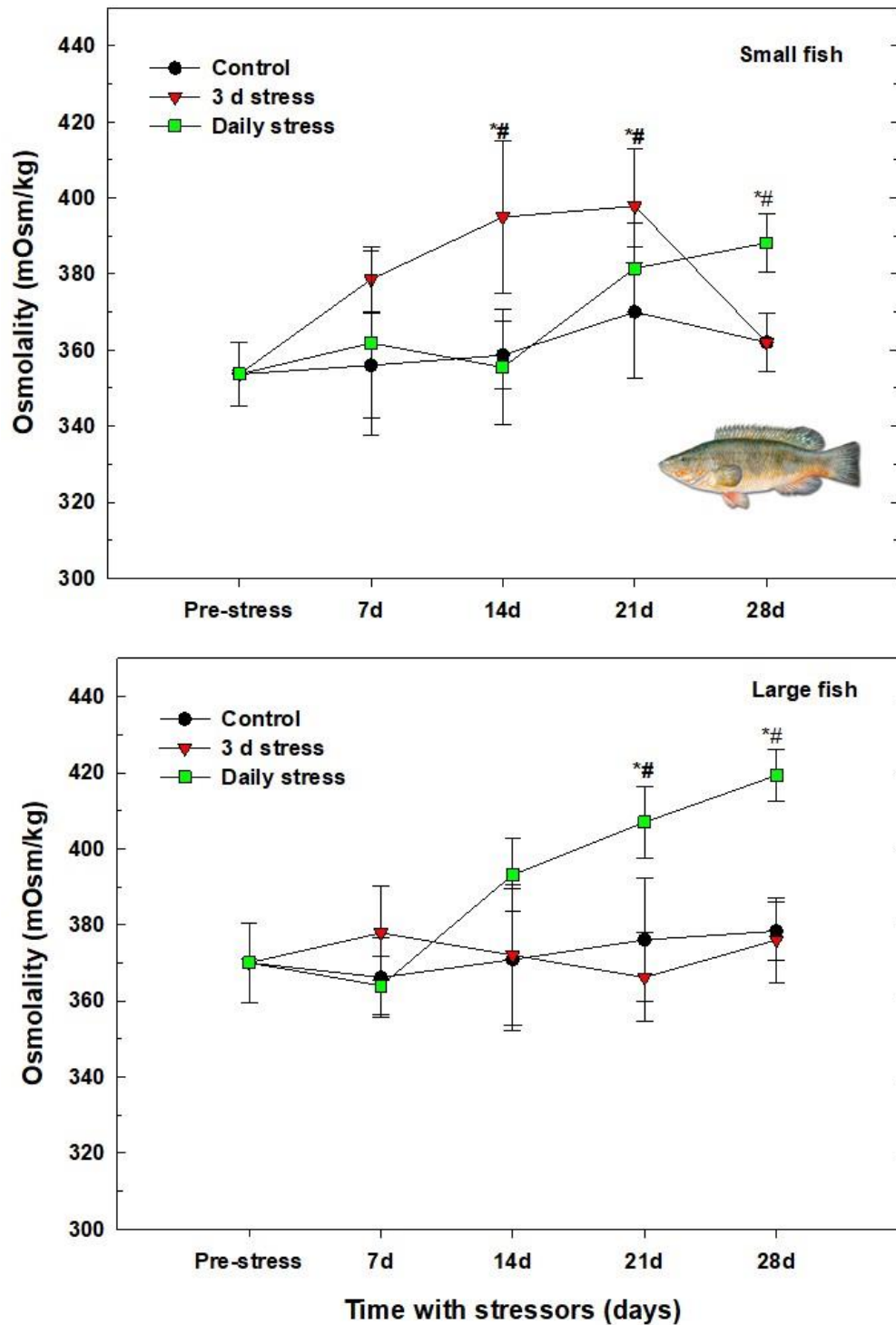
Figur 79 Gjennomsnittlige glukose respons (mM) hos rognkjeks etter ingen (kontroll), 3 ganger i uka og daglig 30 minutters sammentrengingsstressor (264 kg/m^3). * indikerer statistisk forskjell (ANOVA) fra pre-stress ($p < 0.05$) og # indikerer statistisk forskjell (ANOVA) mellom gruppene ved samme tidspunkt ($p < 0.05$) (Sällebrant, 2018).



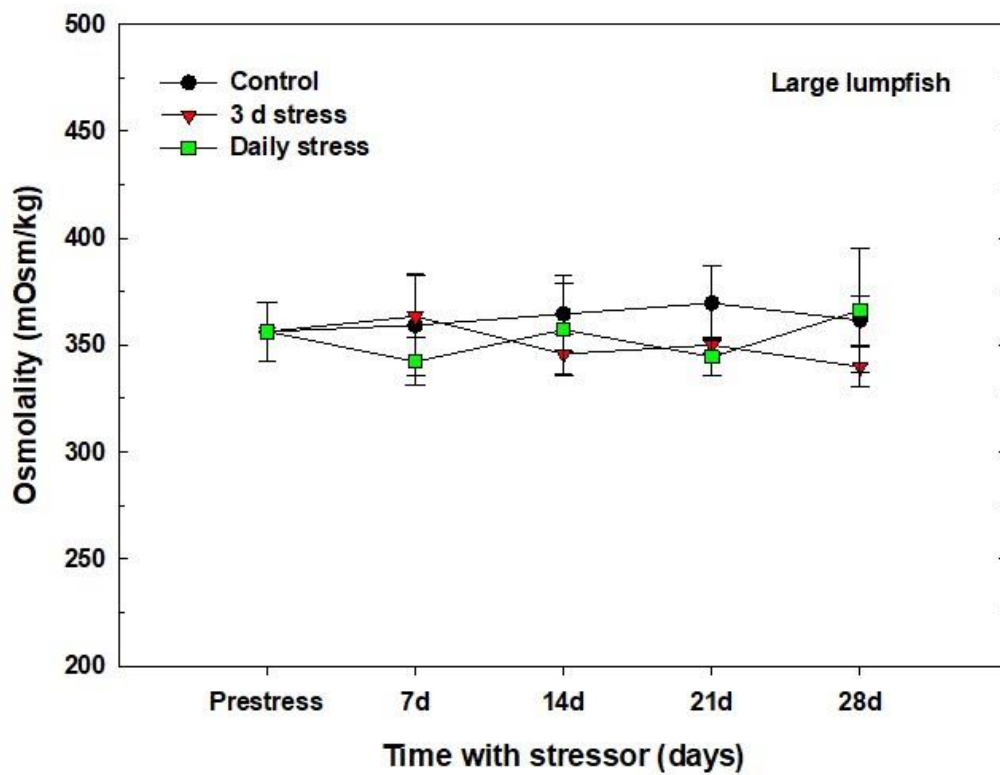
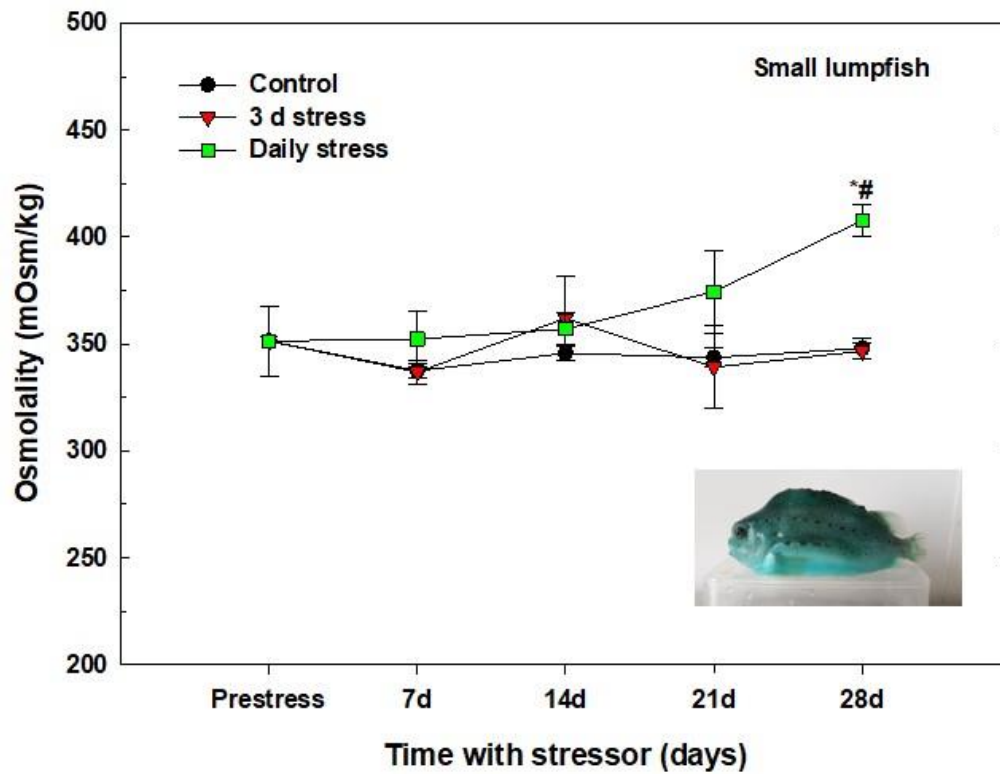
Figur 80 Gjennomsnittlige laktat respons (mM) hos berggylt etter ingen (kontroll), 3 ganger i uka og daglig 30 minutters sammentrengingsstressor (264 kg/m³). * indikerer statistisk forskjell (ANOVA) fra pre-stress ($p < 0.05$) og # indikerer statistisk forskjell (ANOVA) mellom gruppene ved samme tidspunkt ($p < 0.05$) (Virtanen, 2018).



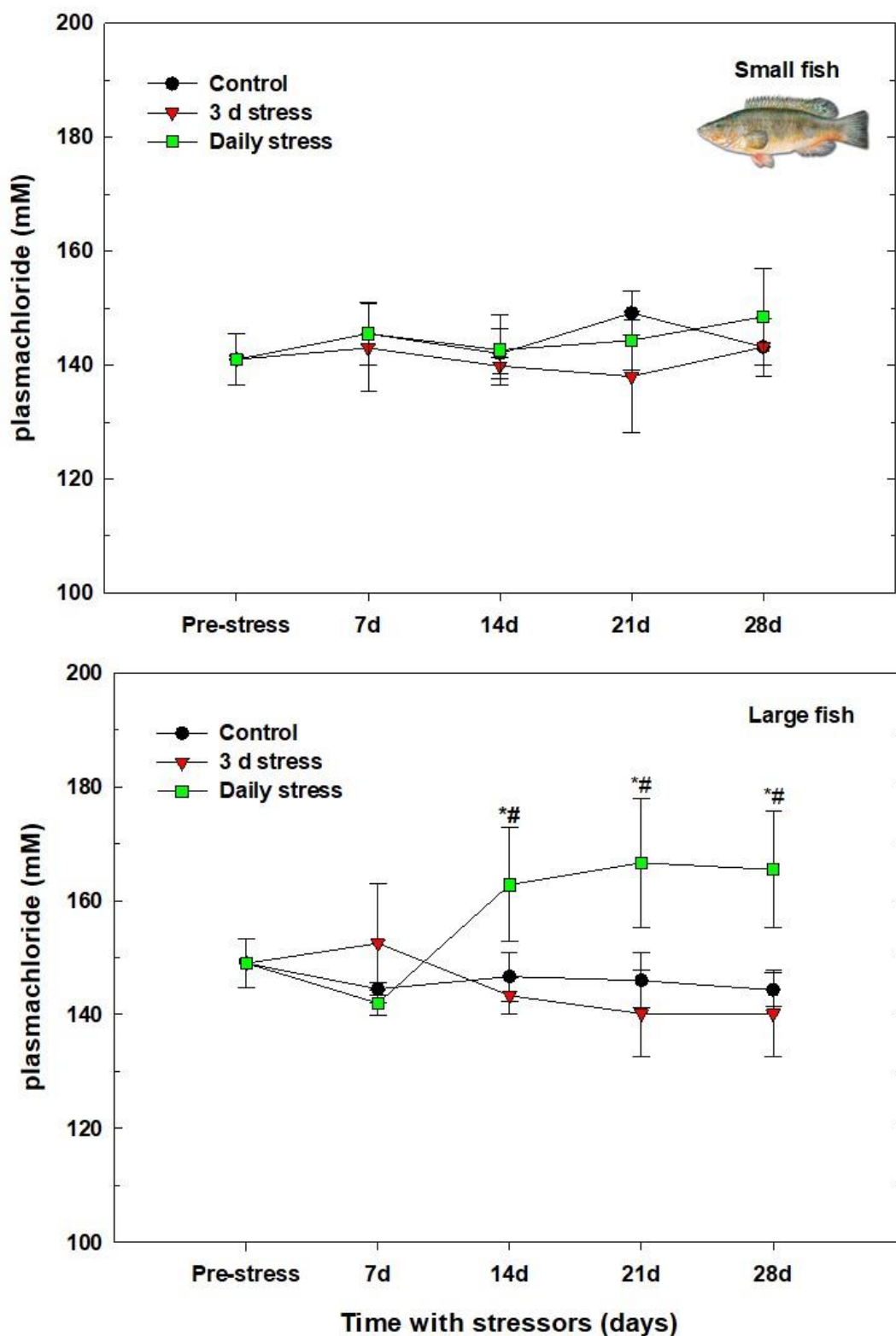
Figur 81 Gjennomsnittlige laktat respons (mM) hos rognkjeks etter ingen (kontroll), 3 ganger i uka og daglig 30 minutters sammentrengingsstressor (264 kg/m^3). * indikerer statistisk forskjell (ANOVA) fra prestress ($p < 0.05$) og # indikerer statistisk forskjell (ANOVA) mellom gruppene ved samme tidspunkt ($p < 0.05$) (Sallebrant, 2018).



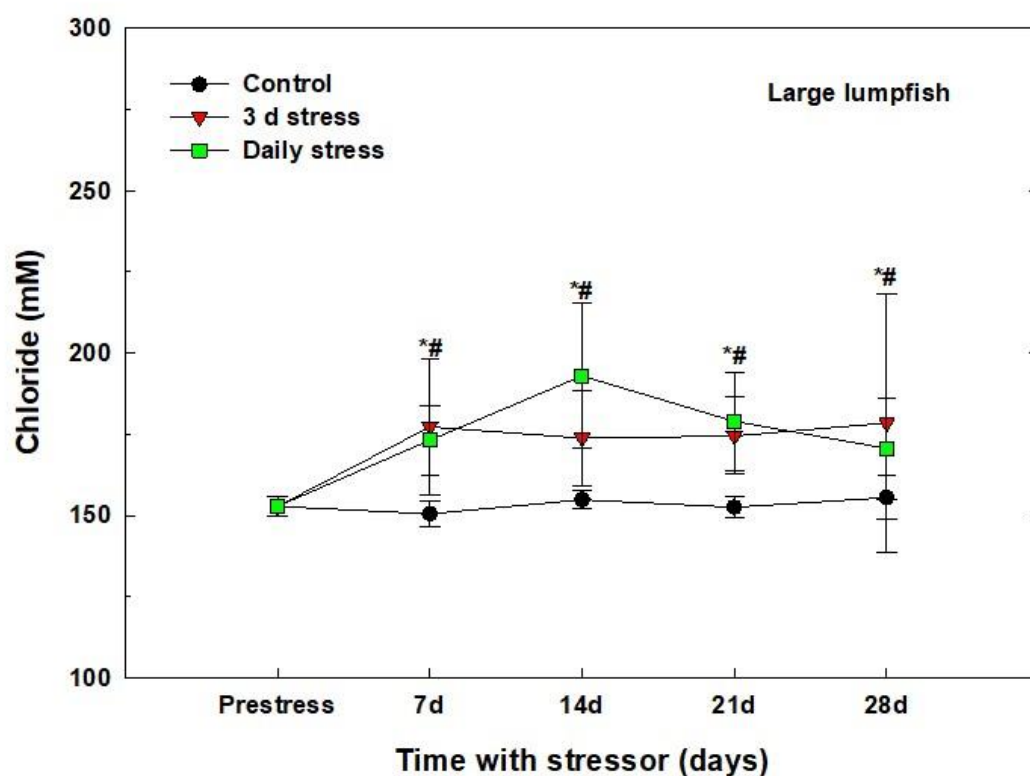
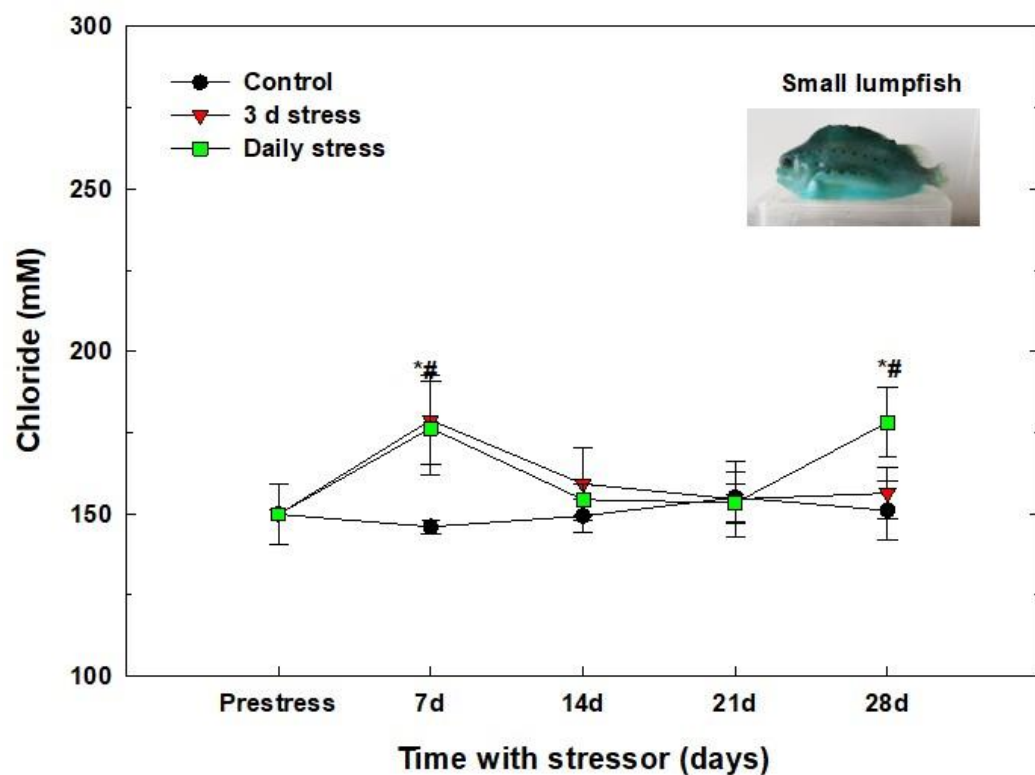
Figur 82 Gjennomsnittlige osmolalitet (mOsm/kg) hos berggyllt etter ingen (kontroll), 3 ganger i uka og daglig 30 minutters sammentrengingsstressor (264 kg/m³). * indikerer statistisk forskjell (ANOVA) fra pre-stress ($p < 0.05$) og # indikerer statistisk forskjell (ANOVA) mellom gruppene ved samme tidspunkt ($p < 0.05$) (Virtanen, 2018).



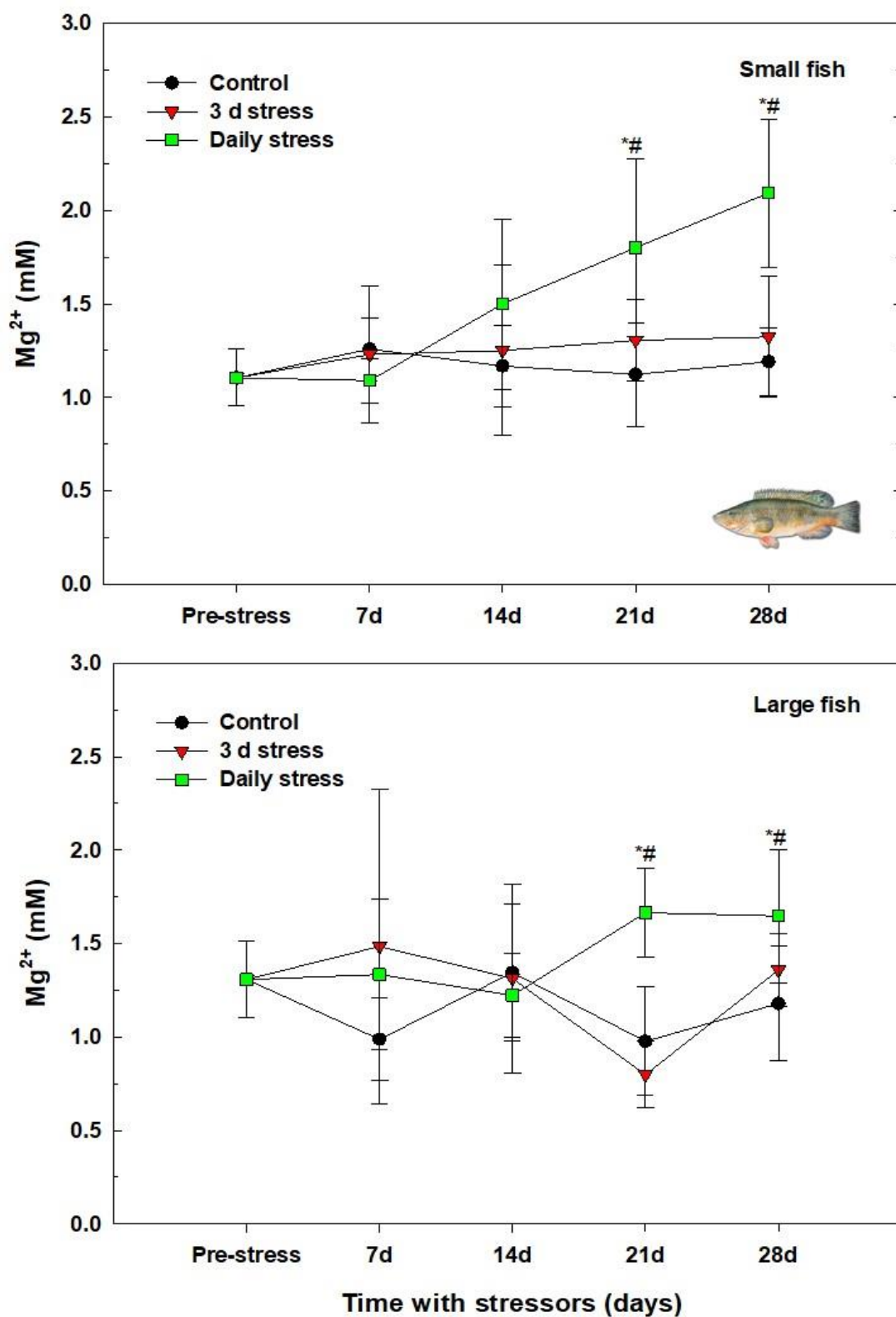
Figur 83 Gjennomsnittlige osmolalitet (mOsm/kg) hos rognkjeks etter ingen (kontroll), 3 ganger i uka og daglig 30 minutters sammentrengingsstressor (264 kg/m³). * indikerer statistisk forskjell (ANOVA) fra pre-stress ($p < 0.05$) og # indikerer statistisk forskjell (ANOVA) mellom gruppene ved samme tidspunkt ($p < 0.05$) (Sällebrant, 2018).



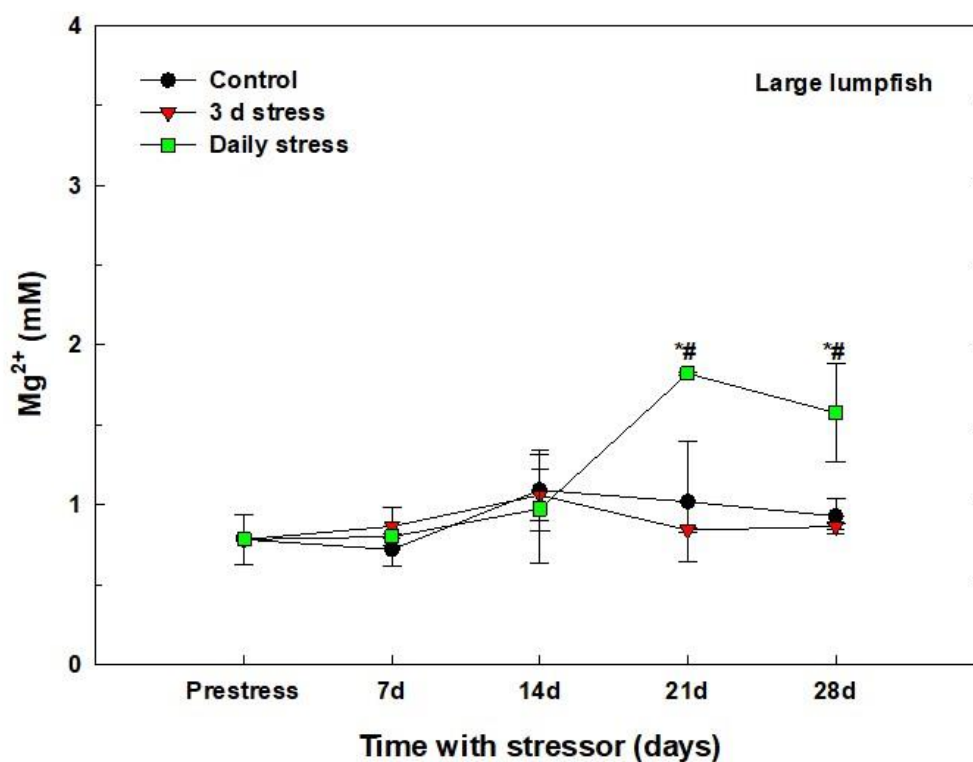
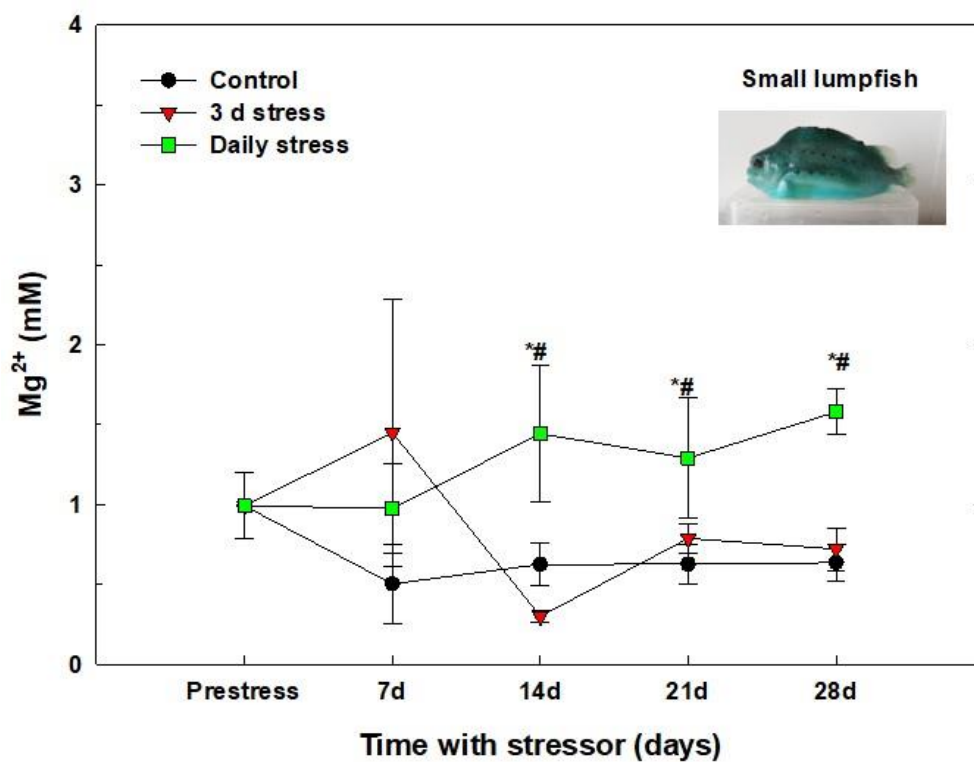
Figur 84 Gjennomsnittlige klorid (mM) hos berggylt etter ingen (kontroll), 3 ganger i uka og daglig 30 minutters sammentrengingsstressor (264 kg/m³). * indikerer statistisk forskjell (ANOVA) fra pre-stress ($p < 0.05$) og # indikerer statistisk forskjell (ANOVA) mellom gruppene ved samme tidspunkt ($p < 0.05$) (Virtanen, 2018).



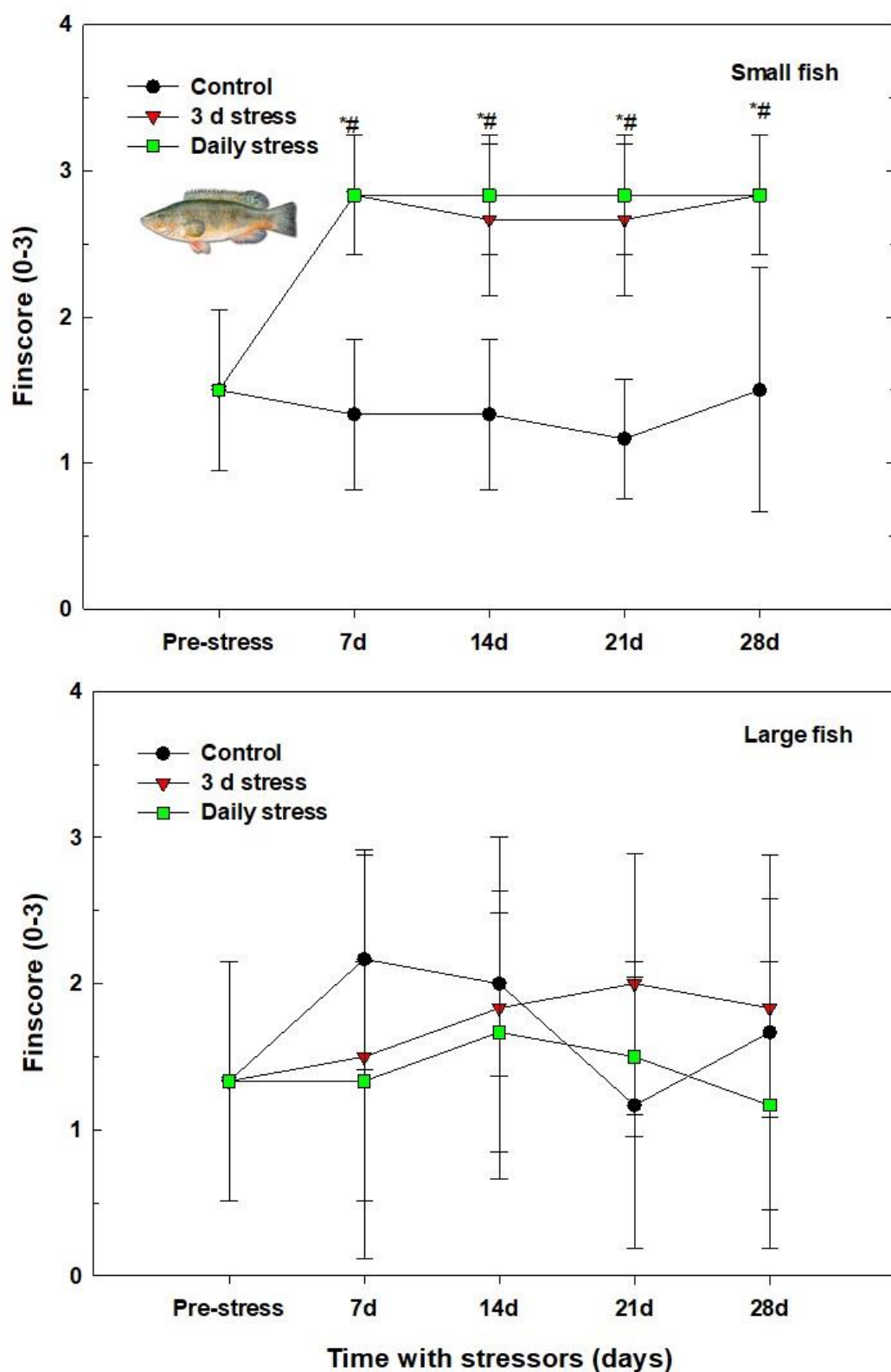
Figur 85 Gjennomsnittlige klorid (mM) hos rognkjeks etter ingen (kontroll), 3 ganger i uka og daglig 30 minutters sammentrengingsstressor (264 kg/m^3). * indikerer statistisk forskjell (ANOVA) fra pre-stress ($p < 0.05$) og # indikerer statistisk forskjell (ANOVA) mellom gruppene ved samme tidspunkt ($p < 0.05$) (Sällebrant, 2018).



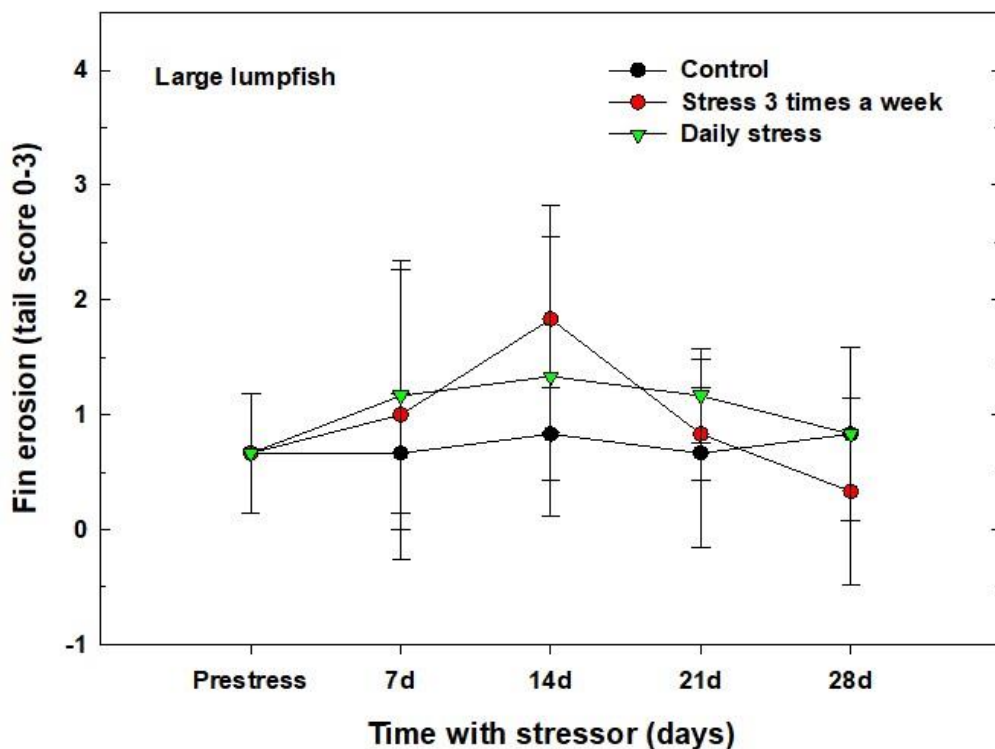
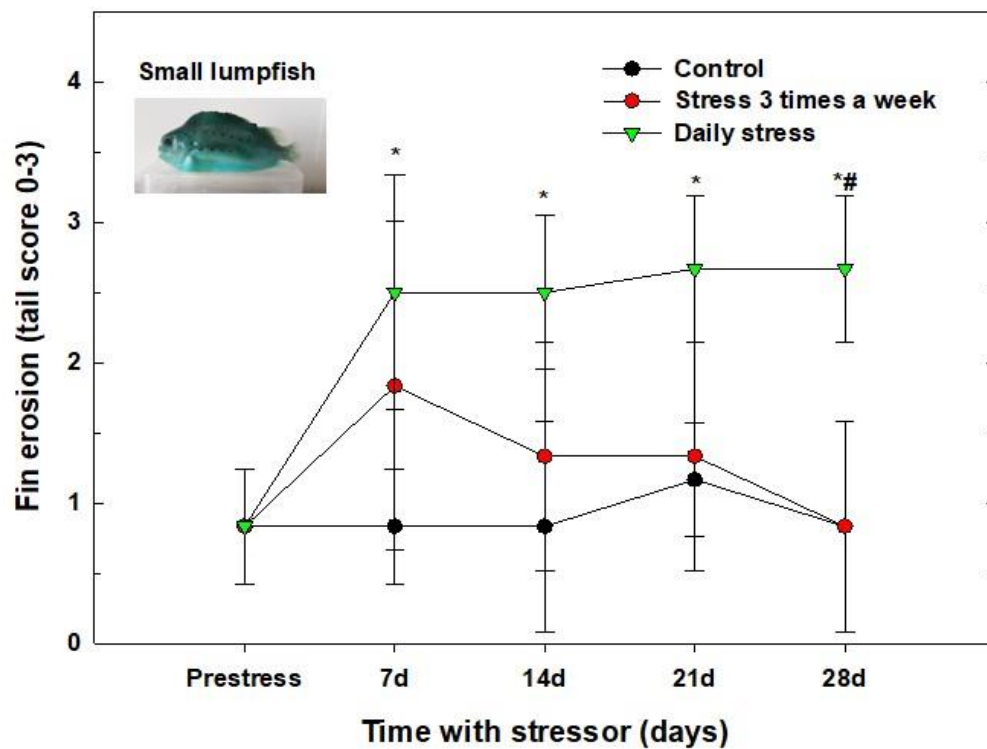
Figur 86 Gjennomsnittlige magnesium (mM) hos berggylt etter ingen (kontroll), 3 ganger i uka og daglig 30 minutters sammentrengingsstressor (264 kg/m³). * indikerer statistisk forskjell (ANOVA) fra pre-stress ($p < 0.05$) og # indikerer statistisk forskjell (ANOVA) mellom gruppene ved samme tidspunkt ($p < 0.05$) (Virtanen, 2018).



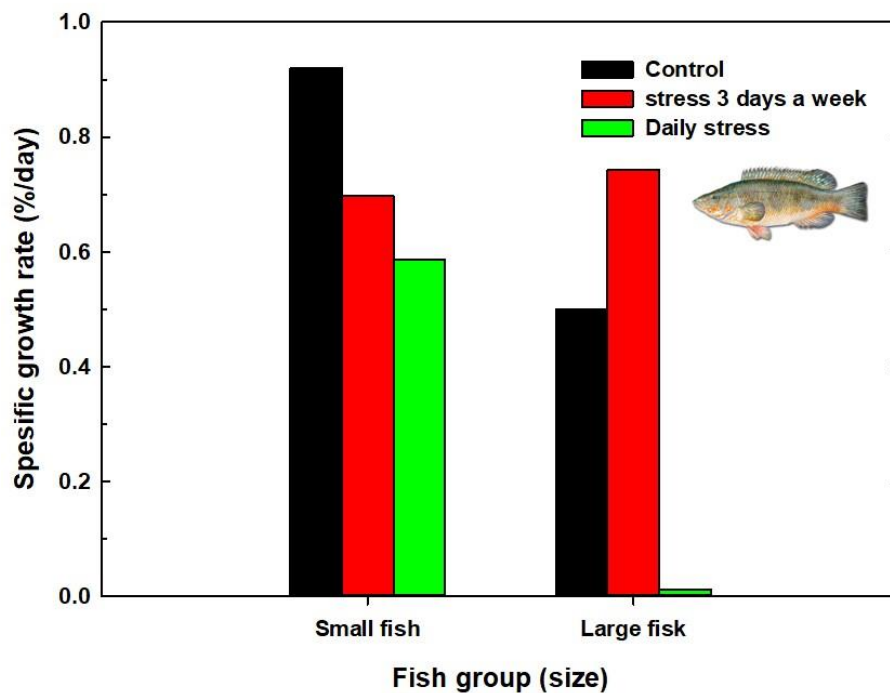
Figur 87 Gjennomsnittlige magnesium (mM) hos rognkjeks etter ingen (kontroll), 3 ganger i uka og daglig 30 minutters sammentrengingsstressor (264 kg/m³). * indikerer statistisk forskjell (ANOVA) fra pre-stress ($p < 0.05$) og # indikerer statistisk forskjell (ANOVA) mellom gruppene ved samme tidspunkt ($p < 0.05$) (Sällebrant, 2018).



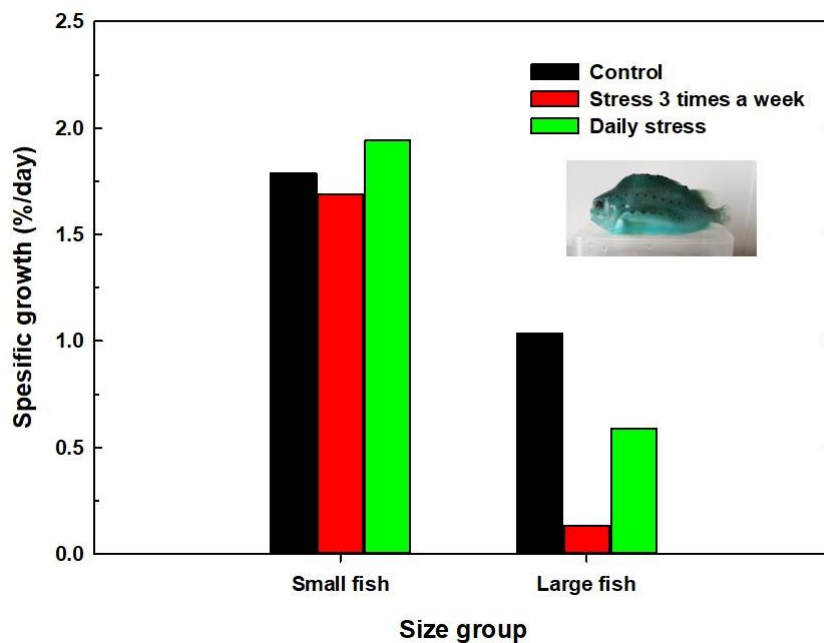
Figur 88 Gjennomsnittlige finne-score (0-3) hos berggylt etter ingen (kontroll), 3 ganger i uka og daglig 30 minutters sammentrengingsstressor (264 kg/m³). * indikerer statistisk forskjell (ANOVA) fra pre-stress ($p < 0.05$) og # indikerer statistisk forskjell (ANOVA) mellom gruppene ved samme tidspunkt ($p < 0.05$) (Virtanen, 2018).



Figur 89 Gjennomsnittlige finne-score (0-3) hos rognkjeks etter ingen (kontroll), 3 ganger i uka og daglig 30 minutters sammentrengingsstressor (264 kg/m^3). * indikerer statistisk forskjell (ANOVA) fra pre-stress ($p < 0.05$) og # indikerer statistisk forskjell (ANOVA) mellom gruppene ved samme tidspunkt ($p < 0.05$) (Sallebrant, 2018).



Figur 90 Spesifikk vekstrate (%/dag) hos berggyllt etter ingen (kontroll), 3 ganger i uka og daglig 30 minutters sammentrengingsstressor (264 kg/m³). * indikerer statistisk forskjell (ANOVA) fra pre-stress ($p < 0.05$) og # indikerer statistisk forskjell (ANOVA) mellom gruppene ved samme tidspunkt ($p < 0.05$) (Virtanen, 2018).



Figur 91 Spesifikk vekstrate (%/dag) hos rognkjeks etter ingen (kontroll), 3 ganger i uka og daglig 30 minutters sammentrengingsstressor (264 kg/m³). * indikerer statistisk forskjell (ANOVA) fra pre-stress ($p < 0.05$) og # indikerer statistisk forskjell (ANOVA) mellom gruppene ved samme tidspunkt ($p < 0.05$) (Sallebrant, 2018).

Karakterisering av slim og hudkomponenter hos stresset og ustresset rognkjeks

I forbindelse med de ovennevnte forsøkene ble det tatt ut skinn og skinnmucus fra stresset og ustresset rognkjeks. Proteomkart for skinn og skinnmucus fra rognkjeks ble etablert ved bruk av todimensjonale geler og massespektrometri. Den proteomiske analysen identifiserte mange proteiner som er involvert i stressrespons, immunerespons, cytoskjelettorganisering, energimetabolisme og lokalisering- og utviklingsprosesser. Viktige proteiner identifisert i skinnmucus er blant andre kalmodulin, varmesjokk beslektet protein 70 kDa, enolase alpha, natterin 2, apolipoprotein A1, pentraxin and histon proteiner. Disse proteinene er direkte involvert i eller knyttet til immune- og/eller stressresponsveier som kan gjøre dem til mulige immune- eller stressmarkører (Brinchmann *et al.*, 2018a, Brinchmann *et al.*, 2018b, Patel og Brinchmann, 2017).

To dimensjonal gelbasert proteomikk ble utført for å finne forskjeller i proteinuttrykk i den stressede gruppen sammenlignet med kontroll gruppen. Proteomikkanalysen viste en forskjell i uttrykk av kalmodulin, varmesjokk-protein 70kDa, histon H4, fettsyrebindende protein, glutathione-S-transferase, 14-3-3 alpha/beta, keratin og guanin nukleotid bindende protein. Varmesjokkproteinene hadde redusert uttrykk i den stressede gruppen sammenlignet med kontrollgruppen ved alle tidspunktene (7, 14, 21, 28 dager). En mulig forklaring kan være at fisken ikke var i stand til å opprettholde metabolsk likevekt og homeostasen ble dermed hemmet på grunn av den allostatisk overbelastning (Patel *et al.*, 2019b).

Strukturelle og proteomiske forskjeller ble observert mellom de dorsal, kaudale og ventral områdene i skinn hos rognkjeks. De strukturelle forskjellene var en tykkere epidermis og høyere antall goblet celler i det ventrale området («sugekoppområdet») sammenlignet med de dorsale og kaudale områdene. Sakkulærlignende celler ble observert i de dorsale og kaudale områdene, men var ikke tilstede i den ventrale delen av skinnet. Flere proteiner, slik som histon H4, varmestress beslektet protein, parvalbumin, natterin-2, kollagen alfa-1 and kollagen alfa-2, 40S ribosomal protein and topoisomerase A and B ble differensielt uttrykt mellom de tre områdene i rognkjeksskinn (Patel *et al.*, 2019a).

Oppsummering

Både berggyllt og rognkjeks reagerer på akutt stress. Selv om uttrykket i den primære stressresponsen (plasmakortisol) er forskjellig i nivå og varighet, og plasmakortisol er tre til fire ganger høyere i berggyllt sammenlignet med rognkjeks ved eksponering av en stressor, bør man være forsiktig med å tolke dette som om berggyllt er mer mottakelig for stressrelaterte sideeffekter. Dette kan være et uttrykk for ulike evolusjonære tilpasninger til ulike livsstiler, enn et uttrykk for høy resistens mot stressrelaterte hendelser hos rognkjeks. Følgende LABVler synes å være egnet til å dokumentere akutt stress plasmakortisol, klorid, magnesium, mens andre LABVler som osmolalitet og glukose gav ingen utslag hos noen fiskeslag. Laktat kan benyttes som LABVI hos berggyllt, men egner seg ikke ved bruk hos rognkjeks.

Både berggyllt og rognkjeks påvirkes negativt av kronisk stress, med redusert vekst (SGR) og økt finneslitasje. Stor fisk av begge arter syntes å være mer mottagelig og påvirket av kronisk stress i form av høyere basalnivå av plasmakortisol, oversensitiv HPI-akse, osmotisk ubalanse og redusert vekst. Følgende LABVler synes å være nyttige i dokumentasjonen av kronisk stress hos begge arter: basalnivå av plasmakortisol, osmolalitet, klor (stor fisk), magnesium, mens laktat er kun egnet hos berggyllt og

ikke hos rognkjeks. Glukose anbefales ikke. Følgende OVler synes å gi nyttig dokumentasjon av en kronisk stress tilstand er finneslitasje (liten fisk) og vekst (eks. SGR) hos begge fiskearter.

Stor rensefisk ser ut til å være mer følsom for graden av stressoren og viser tidligere kroniske stresslidelser enn liten rensefisk. Rensefisk ser ut til å håndtere akutt stress under optimale forhold, men begge arter påvirkes negativt av kronisk stress med den konsekvensen at det påvirker fiskevelferden negativt. Ny kunnskap, som presentert her kan bidra til å utvikle god oppdrettspraksis for rensefisk ved aktivt jobbe med å bekjempe og redusere stressbelastningen i produksjonen.

4.6 Utvikle protokoll med OVler

Som beskrevet i Kapittel 4.1 har resultatene og erfaringene fra forsøkene i RENSVEL, sammen med eksisterende litteratur, blitt sammenfattet til et verktøy som oppdrettere og andre som vurderer rensefisk helse/velferd kan ha nytte av.

I samråd med styringsgruppen ble det bestemt at verktøyet skulle ha form som artsspesifikke faktaark og ikke en protokoll over alle velferdsindikatorer foreslått i Kap 4.1, slik tidligere planlagt. Begrunnelsen for dette er at det fortsatt eksisterer så pass mange kunnskapshull for noen velferdsindikatorer, at protokoll blir for mangelfull der vi står i dag.

Totalt vil det bli distribuert to faktaarkserier; en for berggylt og en for rognkjeks. Begge seriene dekker 34 OVI'er og LABVI'er for henholdsvis berggylt og rognkjeks. I vedlegg 1 finnes faktaarkene for rognkjeks. Disse, i tillegg til faktaarkene for berggylt vil i tillegg bli distribuert separat til alle som ønsker det. Det planlegges også et skårskjema med bilder over velferdsutfordringer med alvorhetsgrad. Malen er modifisert fra FISHWELL (FHF pr. #901157).

5 Hovedfunn

- «Aggressiv klumping» av berggylt skjer når fisken befinner seg veldig tett og oppå hverandre, tidvis ute av vannet. Denne atferden er uønsket da den skader fisken og med stor sannsynlighet både er en årsak av og forårsaker stress. Denne type klumping har man erfart kan begrenses ved hjelp av riktig lys og vannstrøm.
- Generelt ser det ut til at lysets bølgelengde har større effekt på de ulike velferdsmålene enn lysets mengde.
- Våre resultater tyder på at 520 nm bølgelengde (grønt lys) gir mest stress hos både rognkjeks og berggylt, og at 450 nm (blått lys) gir minst stress. Hvitt lys er delvis i samme område som blått lys, men for enkelte indikatorer gir det også en viss økning i stress.
- Vi fant at berggylt har en kritisk svømmehastighet (U_{crit}) på 20-30 cm/s (1.5-2.5 BL/s). Dette er basert på fisk som er villig til å svømme. Nærmere 50 % av prøvefisken viste ikke tegn til å ville svømme, men holdt seg bakerst i svømmetunellen.
- Oksygennivåer fra 75 %-125 % påvirket ikke overlevelse til berggylt, men gav utslag på nivåer av glukose, laktat, magnesium i tillegg til atferd, noe som tyder på at berggylt har redusert velferd både ved hypoksi og hyperoksi.
- Tettheter på 15, 30 og 60 kg/m³ påvirket ikke overlevelsen, vekst eller velferd hos rognkjeks.
- Kortisolnivåene var lavere ved lav tetthet og halebiting mer utbredt ved lav tetthet og forholdsvis små fisk (20g).
- I skjermet kasse i sjø tar det ca. 10-14 dager før død bergnebb, rognkjeks og berggylt går i oppløsning ved 5°C, og ca. 3 dager ved 15°C.
- Leppefisken foretrekker skjul av kinatare, mens rognkjeks foretrekker hardplastskjul.
- Vi har utarbeidet metodikk for å måle uttrykk av immunoglobuliner i larver og en rekke ulike vev hos rognkjeks og verifisert at metode og reagenser har høy kvalitet og er dermed velegnet for bruk i videre studier.
- Studier av immunitet hos berggylt tyder på at berggylt reagerer veldig forskjellig fra andre fiskearter. Resultatene reiser spørsmål om hodenyre er et immun (lymfatisk) organ hos berggylt. Det synes å være noen andre spesifikke trekk ved responsene for å bekjempe infeksjoner hos berggylt.
- Den funksjonelle annoteringen av berggyltens genom og transkriptom antyder at de har et svært komplekst og diversifisert immunsystem.
- Stor rensefisk er mer følsom for stress, og viser tidligere kronisk stressbelastning enn liten rensefisk.
- LABVier som er egnet for dokumentasjon av stress er plasmakortisol, klorid, og magnesium.

- Laktat er kun velegnet som LABVI hos berggylt.
- Finneslitasje og vekst er OVler som kan benyttes for dokumentasjon av stress hos begge arter

Oppsummert

- Kortisol i plasma ser ut til å være en god indikator for stress både for rognkjeks og berggylt, selv om nivåene hos rognkjeks er mye lavere enn hos berggylt. Prosentvis er økningen i kortisol ved stressbelastning like stor hos rognkjeks og berggylt.
- Rensefisk håndter akutt stress bra, men fiskevelferden påvirkes negativt av langvarig kronisk stressbelastning, uavhengig av art.

6 Leveranser

6.1 Presentasjoner

Gerd Marit Berge, Grete Hansen Aas og Anne Stene (2016). Velferd, ernæring og skjul i merd – Dialogmøte Bergen, 01.06.16.

Gerd Marit Berge. (2017). Velferd i merd? Ernæringsstatus og overvintring Dialogmøte Værnes, august 2017.

Grete Hansen Aas, Anne Stene, Gerd Berge (2016). Mål for velferd i merd? Rensefiskkonferansen Trondheim, 9. februar 2016.

Grete Hansen Aas, Anne Stene, Stig Tuene og Gerd Marit Berge (2017). Hvordan føre rensefisk i merd. Fiskeernæringsseminar 2017.

Grete Hansen Aas, Anne Stene, Stig Tuene, Lars Gansel, Gerd Berge (2017). Hvordan måle velferd i merd? Rensefiskkonferansen Trondheim, 8. februar 2017.

Grete Hansen Aas (2018). Velferd for rensefisk I merd. Marin Arena Nordmøre, 11. september 2018.

Grete Hansen Aas (2018). Velferd for rensefisk I merd. Marin Samhandlingsarena, 15. mai 2018.

Grete Hansen Aas og Stig Tuene (2019). Spiser laksefisk rensefisk? Lusekonferansen 2019, Trondheim, 22 januar 2019.

Ingrid Lein (2019). Kvalitetskrav til rensefisken – krav til fisken og drifta. Lusekonferansen, Trondheim. 21-23. januar.

Ingrid Lein, Jelena Kolarevic, Bjarne Gjerde, Karoline Valseth, Rita Storslett og Åsa Espmark (2018). Performance and welfare in cleaner fish reared at different light regimes. EAS/WAS Montpellier, 25-29. August.

Ingrid Lein, Gerd Marit Berge, Jelena Kolarevic, Grete H. Aaas, Bjarne Gjerde, Åsa M. Espmark (2018). Rensvel: Velferd hos rensefisk – operative velferdsindikatorer. Dialogmøte Bergen 13. mars 2018.

Ingrid Lein, Gerd M. Berge, Grete Bæverfjord, Jelena Kolarevic, Bjarne Gjerde, Åsa Espmark (2018). Hva er god kvalitet/velferd hos rensefisk-hvordan kan denne måles? Rensefiskkonferansen Trondheim. 21-23. januar.

Ingrid Lein, Jelena Kolarevic, Bjarne Gjerde og Åsa Marie Espmark (2017). Performance and welfare of lumpfish juveniles at different stocking densities. European Aquaculture Conference, Dubrovnik, Kroatia, 17-20. oktober.

Katie Gaffney (2017). The Effect of Dissolved Oxygen Concentration on the Swimming Performance and Welfare of Ballan Wrasse *Labrus bergylta*. University of Nantes, July 2017.

Heidrun Wergeland (2016). Rognkjeks Immunitet-utvikling. FHF møte Trondheim 2016.

Heidrun Wergeland (2016). En ny art i oppdrett. Rensefiskkonferansen Gardermoen 2016.

Heidrun Wergeland (2018). Fish Immunology, Immunresponses and microbial interactions. BIO møte.

Åsa Maria Espmark (2015). Velferd hos rensefisk Operative velferdsindikatorer (OVI) – RENSVEL 2015 – 2018. Dialogmøte Trondheim november 2015.

Åsa Maria Espmark (2016). Velferd hos rensefisk - Operative velferdsindikatorer RENSVEL. Dialogmøte Bergen juni 2016.

Åsa Maria Espmark (2016). Velferd hos rensefisk - Operative velferdsindikatorer RENSVEL. Dialogmøte Bergen 10. november 2016.

Åsa Maria Espmark (2017). Smakebiter fra RENSVEL Velferd hos rensefisk - Operative velferdsindikatorer. Dialogmøte Værnes, august 2017.

Åsa Maria Espmark, Ingrid Lein, Jelena Kolarevic, Martin Haugmo Iversen (2017). Hvordan måle velferd i produksjon av rensefisk? Rensefiskkonferansen Trondheim 8. februar 2018.

Postere

Grete Hansen Aas, Stig Tuene, Anne Stene and Gerd Marit Berge (2017). Feeding and distribution of cleanerfish in net pens. EAS Dubrovnik Oktober 2017.

Lunde, Harald Sæbø; Haugland, Gyri Teien; Rønneseth, Anita; Walde, Cecilie; Eggestøl, Håvard Øritsland; Wergeland, Heidrun Inger. Genuttrykk av immunglobuliner i rognkjekslarver og i vev fra større fisk.. Havbrukskonferansen 2018; 2018-04-18 - 2018-04-20.

Lunde, Harald Sæbø; Haugland, Gyri Teien; Rønneseth, Anita; Walde, Cecilie; Eggestøl, Håvard Øritsland; Østerhus, Thomas; Wergeland, Heidrun Inger. Characterization of immunoglobulins in lumpfish. 18th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish; 2017-09-04 - 2017-09-07.

6.2 Publikasjoner

Lein I., Kolarevic J., Refstie T., Gjerde B. and Espmark Å.M. (In prep). Stocking density for lumpfish *Cyclopterus lumpus* with emphasis on production performance and fish welfare.

Aas G.H and Thuene S. (In Prep). Salmonids aggressive behavior in large net pens towards cleaner fish.

Gaffney K., Burgerhout E., Espmark Å.M., Lein I. (In Prep). The impact of dissolved oxygen concentration on the welfare and swimming performance of Ballan wrasse (*Labrus bergylta* Ascanius, 1767).

Patel D.M., Bhide K., Bhide M., Iversen M.H., Brinchmann M.F. (2019). Proteomic and structural differences in lumpsucker skin among dorsal, caudal and ventral region. Scientific Reports, accepted

Patel D.M., Iversen M.H., Brinchmann M.F. (In Prep). Effect of chronic stress on the skin proteome of lumpfish, *Cyclopterus lumpus*.

6.3 Media

Ingrid Lein og Åsa Espmark i RensefiskNytt fra FHF, nr 1 Mars 2018.

Stort fokus på rensefiskens velferd. www.Kyst.no 04.01.2018.

Rognkjeks tåler høy tetthet www.Kyst.no 27.10.2017.

6.4 Styringsgruppemøter

Det er ført referat fra følgende styringsgruppemøter. De fleste er avholdt i forbindelse med Dialogmøter, mens noen har blitt arrangert fysisk annet sted og noen har blitt avholdt på Skype for Business:

1. Værnes 22. september 2015
2. Skype for Business 10. november 2015
3. Bergen 8. februar 2016 – felles for Transportstress FHF prosjekt # 901158) og RENSVEL
4. Bergen 1. juni 2016
5. Skype for Business 8. desember 2016
6. Hell (Værnes) 28. august 2017
7. Skype for Business 13. mars 2018
8. Gardermoen 6. september 2018

I tillegg er det ført referat for 10 prosjektmøter.

6.5 Studenter

Følgende studenter har vært tilknyttet RENSVEL:

Bacheloroppgaver

1. **Velferd for rensefisk: rognkjeks og berggyllt.** Bacheloroppgave: Alice Danielle Røyset Fylling, Renate Rimstad Bøe og Guro Mette Hagen, 56 s. Veiledere: Grete Hansen Aas og Anne Stene.
2. **Rensefiskens atferd i laksemerd.** Bacheloroppgave våren 2017, 48 s. Karin Grebstad og Adriane Jakupi Skinnes. Veiledere Grete Hansen Aas og Stig Tuene.
3. **Atferd og fordeling av rognkjeks i laksemerd.** Bacheloroppgave: Maria Dahle Bekjorden, 54 s. Veiledere: Grete Hansen Aas og Stig Tuene.
4. **Hvordan forbedre rensefiskens velferd i kar og merd.** Bacheloroppgave; Frøydis Jeilen. 47 sider: Veiledere: Anne Stene og Stig Tuene.
5. **Svinn av rensefisk i lakseoppdrett.** Bacheloroppgave: Sindre Svensli Bersås og Lindis Lynge. 52 s. Veiledere: Grete Hansen Aas og Stig Tuene.

6. **Predasjonsadferd hos laks (*Salmo salar*) og ørret (*Onchorynchus mykiss*) i oppdrettsmerder.**
Bacheloroppgave: Johan Breder Faye og Stine Nordbø. Veileder Stig Tuene.

Master of Science

1. **Katie Gaffney (2018).** The Impact of Dissolved Oxygen Concentration on the Swimming Performance and Welfare of Ballan Wrasse (*Labrus bergylta* Ascanius, 1767). Master of Science Thesis (Veiledere Ingrid Lein og Giorgos Koumoundouros).
2. **John Sällebrant,** MSc. Chronic allostatic overload on the hypothalamic-pituitary-interrenal axis of lumpfish (*Cyclopterus lumpus*). Effect of size, 2018 (Veiledere Martin Haugmo Iversen og Monica F. Brinchmann).
3. **Miirto Virtanen,** MSc. Chronic stress responses of small (<30g) and large (>40g) Ballan wrasse (*Labrus bergylta*). A comparative study of the effect on primary, secondary and tertiary stress responses (Veiledere Martin Haugmo Iversen og Monica F. Brinchmann).
4. **Jan Jensen,** MSc. Effekten av akutt allostatisk belastning på hypothalamus – hypofyse – interrenal aksene hos liten rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*), 2018 (Veiledere Martin Haugmo Iversen og Monica F. Brinchmann).

Doctor of Science

1. **Deepti Patel,** Ph.D, Characterization of skin immune and stress factors of lumpfish, *Cyclopterus lumpus*, 2017 (Veiledere Martin Haugmo Iversen og Monica F. Brinchmann).

7 Referanser

- Barton, B.A. & Iwama, G.K. (1991) Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*, 3-26.
- Bertotto, D., Poltronieri, C., Radaelli, G., Negrato, E., Poli, B.M., Tibaldi, E., Simontacchi, C. (2007) Welfare and quality of farmed trout fed high plant protein diets. 3 alternative indicators to evaluate stress in fish. *Ital J Anim Sci* 6:789-789.
- Bierman, H.S., Zottou, S.J. & Hale, M.E. (2009) Evolution of the Mauthner axon cap. *Brain Behaviour Evolution* 73, 174–187.
- Brett, J. R. (1964) The Respiratory Metabolism and Swimming Performance of Young Sockeye Salmon. *J. Fish. Res. Board Canada* 21, 1183–1226.
- Brinchmann, M., Patel, D. & Iversen, M.H. (2018a) The Role of Galectins as Modulators of Metabolism and Inflammation. *Mediators of Inflammation*, 49, 1-11.
- Brinchmann, M.F., Patel, D.M., Pinto, N. & Iversen, M.H. (2018b) Functional Aspects of Fish Mucosal Lectins—Interaction with Non-Self. *Molecules*, 23 (5) 1119.
- Broom, D. M. (1986). Indicators of poor welfare. *British veterinary journal*, 142(6), 524-526.
- Davenport, J. (1985) Synopsis of biological data on the lumpsucker *Cyclopterus lumpus* (Linnaeus, 1958). *FAO Fisheries Synopsis*, 147, 31 pp.
- Davenport, J. & Thorsteinsson, V. (1990) Sucker action in the lumpsucker *Cyclopterus lumpus* L. *Sarsia*, 75, 33-42.
- Dawkins, M., (2015). Chapter Two - Animal Welfare and the Paradox of Animal Consciousness. *Advances in the Study of Behavior* 47, 5-38.
- Deady, S., et al. (1995). "The use of cleaner-fish to control sea lice on two Irish salmon (*Salmo salar*) farms with particular reference to wrasse behaviour in salmon cages." *Aquaculture* 131(1): 73-90.
- Ebrecht, M., Hextall, J., Kirtley, L.G., Taylor, A., Dyson, M., Weinman, J. (2004). Perceived stress and cortisol levels predict speed of wound healing. *Psychoneuroendocrinology* 29, 798-809.
- Eaton, R.C., Didomenico, R. & Nissanov, J. (1988) Flexible body dynamics of the goldfish C-start: implications for reticulospinal command mechanisms. *Journal of Neuroscience*, 8, 2758–2768.
- Eggsetøl, H Ø; Lunde, H S; Rønneseth, A; Fredman, D; Petersen, Kjell; Mishra, C K; Furmanek, T; Colquhoun, D John; Wergeland, H I; Haugland, G T. Transcriptome-wide mapping of signaling pathways and early immune responses in lumpfish leukocytes upon in vitro bacterial exposure. *Scientific Reports* 2018; Volum 8:5261. Suppl. 65.
- Eliassen, K., et al. (2018). "The cleaning efficacy of lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) in Faroese salmon (*Salmo salar*) farming pens in relation to lumpfish size and seasonality." *Aquaculture* 488: 61-65.
- Hale, M.E. (2000) Startle responses of fish without Mauthner neurons: Escape behavior of the lumpfish (*Cyclopterus lumpus*). *Biological Bulletin*, 199, 180-182.
- Halvorsen, K.A.T. (2015). UiA om bruk og kast av leppefisk, og om avl: <http://www.aftenposten.no/viten/Leppefisk-mot-lakselus-Det-store-eksperimentet-7941667.html>.
- Hanssen, A.B., Patel, D., Brinchmann, M.F. & Iversen, M.H. (2016) The effect of long-term stress on basal levels of plasma cortisol and hypothalamic–pituitary–Interrenal (HPI) Axis in lumpsucker (*Cyclopterus lumpus*). *Aquaculture Research submitted*.

- Haugland, G T; Jakobsen, R A; Vestvik, N; Ulven, K; Stokka, L; Wergeland, H I. Phagocytosis and respiratory burst activity in lump sucker (*Cyclopterus lumpus* L.) leucocytes analysed by flow cytometry. PLoS ONE 2012; Volum 7.(10).
- Iversen, M.H. & Eliassen, R.A. (2014) The effect of allostatic load on hypothalamic-pituitary-interrenal (HPI) axis before and after secondary vaccination in Atlantic salmon postsmolts (*Salmo salar* L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 40, 527-538.
- 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.
- 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, MH, Jakobsen, R, Eliassen, R, Ottesen, O. (2015). Aki av berggylt og rognkjeks for å redusere stress og dødelighet. Norsk Fiskeoppdrett 2015; Volum NFexpert. s. 42-46.
- Jensen, J. (2018) Effekten av akutt allostatisk belastning på hypothalamus – hypofyse – interrenal aksene hos liten rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*). Msc in Bioscience, Faculty of Aquaculture and Bioscience, Nord University, 63pp.
- Li, J., Barreda, D.R., Zhang, Y.A., Boshra, H., Gelman, A.E., Lapatra, S., Tort, L., Sunyer, J.O. (2006). B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nat Immunol.* 7: 1116-24.
- Moon, T.W. & Foster, G.W. (1995) Tissue carbohydrate metabolism, gluconeogenesis and hormonal and environmental influences. *Metabolic and Adaptational Biochemistry*, 65-100.
- Nilsson, J., Stien, L.H., Iversen, M.H., Kristiansen, T.S., Torgersen, T., Oppedal, F., Folkedal, O., Hvas, M., Gismervik, K., Ellingsen, K., Nielsen, K.V., Mejdell, C.M., Kolarevic, J., Izquierdo-Gomez, D., Sæther, B.-S., Espmark, Å.M., Midling, K.Ø., Roth, B., Turnbull, J.F. & Noble, C. (2018) *Velferdsindikatorer for oppdrettslaks: Hvordan vurdere og dokumentere fiskevelferd – Del A. Fiskevelferd og oppdrettslaks, kunnskap og teoretisk bakgrunn*, FHF, Oslo. 126 s. ISBN: 978-82-8296-504-0.
- Nytrø, A.V., Vikingstad, E., Foss, A. (2014). The effect of temperature and fish size on growth of juvenile lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.). *Aquaculture* 434, 296-302.
- Palme, R. (2005) Measuring fecal steroids - Guidelines for practical application. *Bird Hormones and Bird Migrations: Analyzing Hormones in Droppings and Egg Yolks and Assessing Adaptations in Long- Distance Migration* 1046:75-80
- Pickering AD, Pottinger TG (1989) Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiol Biochem*, 7, 253-258.
- Patel, D.M., Bhide, K., Bhide, M., Iversen, M.H. & Brinchmann, M.F. (2019a) Proteomic and structural differences in lump sucker skin among dorsal, caudal and ventral region. *Scientific Report. Major revision*.
- Patel, D.M. & Brinchmann, M.F. (2017) Skin mucus proteins of Lump sucker (*Cyclopterus lumpus*) skin mucus. *Biophysics and Biochemistry reports* 9, 217-225.
- Patel, D.M., Iversen, M.H. & Brinchmann, M.F. (2019b) Effect of chronic stress on the skin proteome of lumpfish, *Cyclopterus lumpus*. *Manuscript*.
- Poppe, T. (2015). Rensefugl – en lignelse» om dyrs egenverdi: http://www.kyst.no/nyhet/?article_id=110929
- Rønneseth, A; Dawit, B G; Wergeland, H I; Haugland, G T. Functional characterization of IgM+ B cells and adaptive immunity in lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.). *Developmental and Comparative Immunology* 2015; Volum 52 (2): s. 132.

- Sällebrant, J.B. (2018) Chronic allostatic overload on the hypothalamic-pituitary-interrenal axis of lumpfish (*Cyclopterus lumpus*). Effect of size Msc in Bioscience, Faculty of Aquaculture and Bioscience, Nord University, 70pp.
- Schreck, C.B., Maule, A.G. & Kaattari, S.L. (1993) Stress and disease resistance In *Recent Advances in Aquaculture, IV* (Roberts, R.J. & Muir, J.F. eds.), pp. 170-175 Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Skiftesvik, A.B., Bjelland, R.M., Durif, C.M.F. (2013). Delousing of Atlantic salmon (*Salmo salar*) by cultured vs. wild ballan wrasse (*Labrus bergylta*). *Aquaculture* 402, 113-118.
- Stien, L.H. Bracke, M.B.M., Folkedal, O., Nilsson, J., Oppedal, F., Torgersen, T., Kittilsen, S., Midtlyng, P.J., Vindas, M.A., Øverli, Ø., Kristiansen, T.S. (2013). Salmon Welfare Index Model (SWIM 1.0): a semantic model for overall welfare assessment of caged Atlantic salmon: review of the selected welfare indicators and model presentation. *Reviews in Aquaculture*, 5, 33-57.
- Tort, L. (2011) Stress and immune modulation in fish. *Dev Comp Immunol* 35:1366-13.
- Treasurer, J., Noble, C., Puvanendran, V., Planellas, S.R. & Iversen, M.H. (2018) Cleaner fish welfare In *Cleaner Fish Biology and Aquaculture Applications* (Treasurer, J. ed.), pp. 287-318. 5mBooks.com, Sheffield; UK.
- Virtanen, M.I. (2018) "Chronic stress responses of small (<30g) and large (>40g) Ballan wrasse (*Labrus bergylta*). A comparative study of the effect on primary, secondary and tertiary stress responses." Msc in Bioscience, Faculty of Aquaculture and Bioscience, Nord University, 65pp.
- Voskoboinikova, O. S., Kudryavtseva O. Y. (2014). Development of bony skeleton in the ontogeny of lumpfish *Cyclopterus lumpus* (Cyclopteridae, Scorpaeniformes). *Journal of Ichthyology*, 54, No5: 301- 310.
- Wankowski (1978). Morphological limitations, prey size selectivity, and growth response of juvenile atlantic salmon, *Salmo salar*. *J. Fish Biology*, 14, 89-100.
- Wedemeyer, G.A. (1996) *Physiology of fish in intensive culture systems*, Chapman & Hall, New York.
- Wendelaar Bonga, S.E. (1997) The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77, 591-625.
- Wendelaar Bonga, S.E. (2011) Hormonal responses to stress In *Encyclopedia of Fish Physiology* (Anthony, P.F. ed.), pp. 1515-1523. Academic Press, San Diego.
- Zhang, Y., Timmerhaus, G., Anttila, K., Mauduit, F., Jørgensen, S.M., Kristensen, T., Claireaux, G., Takle, H. and Farrell, A.P., (2016). Domestication compromises athleticism and respiratory plasticity in response to aerobic exercise training in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 463, pp.79-88.
- Øverland, HS; Pettersen EF; Rønneseth A; Wergeland HI. Phagocytosis by B-cells and neutrophils in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) (2010). *Fish Shellfish Immunol.* 28(1):193-204.

RENSVEL OWI FACT SHEET SERIES:
AN INTRODUCTION TO OPERATIONAL
AND LABORATORY-BASED WELFARE
INDICATORS FOR BALLAN WRASSE
(Labrus bergylta)

RENSVEL OWI FACT SHEET SERIES:
AN INTRODUCTION TO OPERATIONAL AND
LABORATORY-BASED WELFARE INDICATORS
FOR BALLAN WRASSE (*Labrus bergylta*)



Chris Noble¹, Martin H. Iversen², Ingrid Lein¹, Jelena
Kolarevic¹, Lill-Heidi Johansen¹, Erik Burgerhout¹, Velmurugu
Puvanendran¹, Katerina Kousoulaki¹, Grete Hansen Aas³,
Anne Stene³ & Åsa M. Espmark¹

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE



Suggested citation: Noble, C., Iversen, M. H., Lein, I., Kolarevic, J., Johansen, L. –H., Burgerhout, E., Puvanendran, V., Kousoulaki, K., Aas, G. H., Stene, A. & Espmark, Å. M. (2019). RENSVEL OWI FACT SHEET SERIES: An introduction to Operational and Laboratory-based Welfare Indicators for ballan wrasse (*Labrus bergylta*). 43 pp.

ISBN 978-82-8296-590-3

An output of the FHF financed project 901136 «RENSVEL: Velferd hos rensefisk – operative indikatorer»

April 2019

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. If you wish to use previously published work that has been reproduced in this article, you must contact the original copyright holder to seek permission before using that material (source of copyright is listed in relevant figures and tables).

Front cover photo: © Nofima

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

TABLE OF CONTENTS

Introduction	5
Outline of the OWIs and LABWIs covered in this fact sheet series	6
Environment based OWIs	7
Oxygen	8
Temperature.....	9
CO ₂ /pH	10
Salinity.....	11
Light	12
Density	13
Turbidity/TSS	14
Total ammonia nitrogen (TAN), Nitrite (NO ₂ ⁻) and Nitrate (NO ₃ ⁻).....	15
Water speed	16
Individual based OWIs	17
Epidermal damage	18
Active and healed fin damage.....	19
Eye damage including cataracts	20
Vertebral deformities	21
Snout and mouth damage.....	22
Opercular damage.....	23
Gill beat rate	24
Emaciation state incl. condition factor	25
Group based OWIs.....	26
Mortality rate	27
Health status.....	29
Appetite and growth rate.....	30
Behaviour	31
Blood and scales in the water	33

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

Physiological LABWIs and OWIs.....	34
Plasma cortisol	35
Lactate.....	36
Glucose.....	37
Osmolality	38
Magnesium	39
Chloride.....	40
References.....	41

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

INTRODUCTION

Fish welfare, defined by Stien et al., (2013) as the “*quality of life as perceived by the animals themselves*” requires various tools to assess and evaluate it (see e.g. Noble et al., 2018). These tools are termed Welfare Indicators (WIs) and can be classified as either animal or environment based (e.g. Nilsson, Stien, Iversen et al., 2018):

- Animal-based (Direct) indicators – an indicator that is on, or from the fish, applied at either the individual or group level.
- Environment-based (Indirect) indicators – an indicator that is based upon the rearing environment e.g. water quality, various management processes or the farm infrastructure.

WIs that can be used out on the farm are termed Operational Welfare Indicators, or OWIs (e.g. Noble et al., 2012). WIs that are sampled at the farm (either from the animal or the environment it is subjected to) but are then sent to a lab for further analysis are termed Laboratory-based Welfare Indicators, or LABWIs (Nilsson, Stien, Iversen et al., 2018).

Health and welfare are key to the successful rearing and deployment of cleaner fish out on the farms. However, knowledge on their welfare is relatively scarce in relation to other more established farmed species, although attempts are being made to correlate what is available and give an overview of the potential welfare challenges the fish face (e.g. Treasurer et al., 2018).

This fact sheet series will give a brief overview of some of the latest science-based findings and some practical experience with regard to a suite of life-stage and species-specific OWIs and LABWIs for ballan wrasse (*Labrus bergylta*). For each OWI/LABWI we will i) briefly outline the indicator, ii) give a science-based overview of the information we currently have about it, such as potential risk factors and mitigation strategies that can be linked to it, and either iii) give an overview of some practical knowledge related to the OWI, or iv) address the methods for measuring the OWI/LABWI.

This fact sheet series is an output of the FHF financed project 901136 «RENSVEL: Velferd hos rensefisk – operative indikatorer», led by Nofima and is written in partnership with researchers from Nord University and NTNU. The authors would especially like to thank the steering group of the project (Olav Breck, Mowi ASA; Espen Lie Dahl, SalMar ASA; Kjetil Heggen, Lerøy Seafood Group ASA; Halvard Hovland, Havlandet Marin Yngel AS; Lars Jørgen Ulvan, Nordland leppefisk AS) for all of their guidance and inputs throughout the project.

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

OUTLINE OF THE OWIs AND LABWIs COVERED IN THIS FACT SHEET SERIES

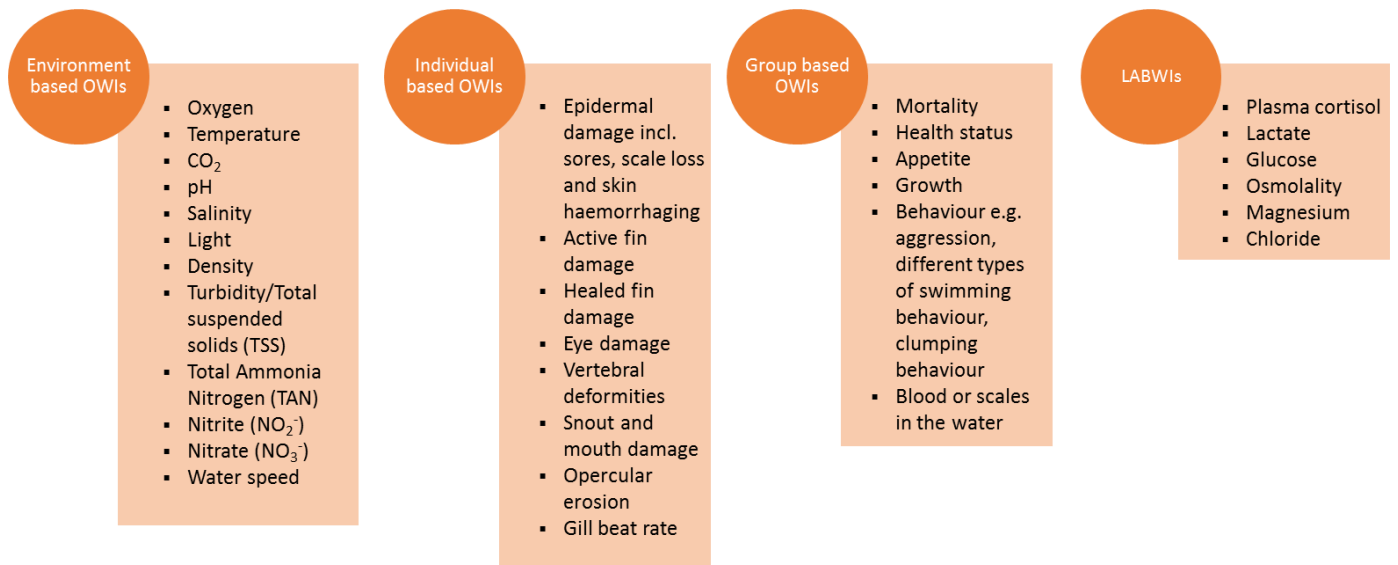


Figure 1: Overview of the OWIs and LABWIs addressed in the RENSVEL OWIs and LABWIs for ballan wrasse fact sheet series (Figure: Chris Noble, Nofima. Adapted from figures in “Noble, C., Gismervik, K., Iversen, M. H., Kolarevic, J., Nilsson, J., Stien, L. H. & Turnbull, J. F. (Eds.) (2018). Welfare Indicators for farmed Atlantic salmon: tools for assessing fish welfare 351pp.” with permission.

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

ENVIRONMENT BASED OWIs

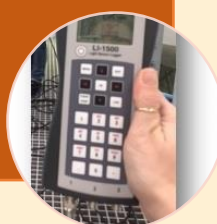
Environment based OWIs are well established indirect welfare indicators for numerous farmed species (Noble et al., 2018; RSPCA 2018a, b; Stien et al., 2013). However, there is little published information on environment based OWIs for ballan wrasse (Treasurer et al., 2018).



Key Environment based OWIs covered in these Factsheets:

- Oxygen
- Temperature
- CO₂
- pH
- Salinity
- Light
- Density
- Turbidity/Total suspended solids (TSS)
- Total Ammonia Nitrogen (TAN)
- Nitrite (NO₂⁻)
- Nitrate(NO₃⁻)
- Water speed

Environment
based OWIs



RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

Oxygen

Oxygen is a critical water quality indicator and levels that are too low or high can cause welfare problems in numerous fish species including ballan wrasse (e.g. Treasurer et al., 2018). Different life stages can also have differing oxygen requirements.



Science based knowledge

- Dissolved Oxygen (DO) saturation levels and recommendations for differing life stages:
 - Juveniles:
 - > 7 mg/l in the hatchery (RSPCA, 2018a).
 - 80-90% DO saturation (Treasurer et al., 2018).
 - RENSVEL results suggest 100% DO saturation is optimal in juvenile fish weighing 20-30g (Gaffney et al., in prep).
 - Adults and broodstock:
 - As far as the authors are aware, there are no recommendations for DO saturation levels in adult/broodstock ballan wrasse but studies have reported using > 90% DO saturation for rearing broodstock (e.g. Grant et al., 2016) or recording average DO levels of > 11 mg/l in a study on cage held ballan wrasse (> 70g mean weight, Leclercq et al., 2018).

Practical based knowledge

Practical DO saturation levels and recommendations:

- > 7 mg/l when wrasse held in RAS (Treasurer et al., 2018).
- 80-100% saturation during transport and not greater than 125% (Transportation of wrasse guidelines <http://lusedata.no/wp-content/uploads/2012/05/05062015-Veileder-til-transport-av-leppefisk.pdf>).
- However, another recommendation is that oxygen levels should not exceed 110% during transport https://www.northernperiphery.eu/files/archive/Downloads/Project_Publications/18/ECOFISH_lea_flet7_Farm_Application_of_Wrasse_web_version.pdf
- DO saturations of 80-90% have been used for rearing adult ballan wrasse with good results (I. Lein, pers. comm.).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

Temperature

Temperature is a key environmental parameter and affects poikilothermic fish in numerous ways (e.g. Jobling, 1997; EFSA, 2008). Temperature preferences and thresholds vary with life stage in ballan wrasse.



Science based knowledge

- It has been suggested that wrasse can tolerate temperatures 4 – 20 °C (Treasurer et al., 2018) but become less active at < 10 °C (Brooker et al., 2018) and inactive at < 6 °C (Treasurer, 2002).

Life stage	Temperature range	Reference
Juvenile	Begin at 12 °C and then gradually increase to 16 °C 8 – 16 °C	Treasurer (2018) RSPCA (2018a)
Adult	Optimal temperature = ca. 16 °C in 20 g and >50 g fish Become less active at < 10 °C Become inactive at < 6 °C	Treasurer (2018) Brooker et al., (2018) Treasurer (2002)
Broodstock	11 °C	Treasurer (2018)

Practical based knowledge

- Practical based experience on water temperature requirements in relation to life stage:
 - Juvenile fish: 14 – 16 °C (Treasurer et al., 2018).
 - Brooker et al., (2018) suggests the best time to deploy wrasse is from spring onwards when the water temperature is increasing.
- It has been suggested that water temperature during transport should be 8 – 18 °C (Transportation of wrasse guidelines <http://lusedata.no/wp-content/uploads/2012/05/05062015-Veileder-til-transport-av-leppefisk.pdf>).
- Temperature during transport should not increase by more than 2 °C during the transport process. https://www.northernperiphery.eu/files/archive/Downloads/Project_Publications/18/ECOFISH_leafile7_Farm_Application_of_Wrasse_web_version.pdf

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

CO₂/pH

Elevated levels of water-borne CO₂ can be a welfare challenge for numerous fish species (see e.g. Nilsson, Stien, Iversen et al., 2018) as can pH levels that are either too low or high. However, as far as the authors are aware, optimal or critical levels for CO₂ have not been reported for ballan wrasse and this is also the same for pH (e.g. Treasurer et al., 2018).



Science based knowledge

As stated above, the authors have not found any peer-reviewed published information for optimal or critical levels for CO₂ and pH (see also Treasurer et al., 2018).

- However, the RSPCA welfare standards for Atlantic salmon suggest wrasse in hatcheries must be reared to a pH of 7.4 – 8.2 (RSPCA, 2018a).

Practical based knowledge

- With regard to CO₂, it has been suggested that CO₂ tolerances in ballan wrasse are potentially comparable to other marine species and should be < 15 mg/l (Treasurer et al., 2018).
- With regard to pH, it has also been suggested that pH tolerances for wrasse are potentially comparable to other marine species, and production data has reported pH values in the region 7.2 – 8.0 (Treasurer et al., 2018).
- CO₂ levels during transport should be < 15 mg/l and pH should be > 7.0 (Transportation of wrasse guidelines <http://lusedata.no/wp-content/uploads/2012/05/05062015-Veileder-til-transport-av-leppefisk.pdf>).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

Salinity

Ballan wrasse are a marine fish that reportedly has a low tolerance of freshwater (Bolton-Warberg, 2018; Brooker et al., 2018), unlike lumpfish (Treasurer and Turnbull, 2019).



Science based knowledge

With regard to freshwater exposure:

- Both Bolton-Warberg, (2018) and Brooker et al., (2018) have reported that ballan wrasse have a low tolerance to freshwater. This means they must be separated from the salmon before e.g. freshwater bathing.
- Skiftesvik et al., (2018) also state ballan wrasse do not withstand being directly transferred to freshwater, but can tolerate 2 hours of freshwater exposure if salinity is gradually decreased.

Practical based knowledge

- Salinity levels during transport should be > 25 ppt (Transportation of wrasse guidelines <http://lusedata.no/wp-content/uploads/2012/05/05062015-Veileder-til-transport-av-leppefisk.pdf>).
- Salinities during tank rearing should be ca. 34 ppt. https://www.northernperiphery.eu/files/archive/Downloads/Project_Publications/18/ECOFISH_1_eaflet7_Farm_Application_of_Wrasse_web_version.pdf
- However, it has been suggested that wrasse can survive short-term exposure to salinities that drop as low as 14 ppt and can also survive for 5 – 7 days in salinities that are as low as 21 ppt. The same authors also state that low salinities are stressful for the wrasse and can lead to mortalities. See https://www.northernperiphery.eu/files/archive/Downloads/Project_Publications/18/ECOFISH_1_eaflet7_Farm_Application_of_Wrasse_web_version.pdf

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

Light

The manipulation of daylength and changes in daylength are widely used techniques for e.g. controlling reproduction and initiating maturation in numerous farmed fish species. However, with regard to cleaner fish, the field is still in its infancy. As far as the authors are aware, there have been few scientific studies on the effects of light intensity or wavelength upon cleaner fish welfare and performance. The information that we have found will be reported here.



Science based knowledge

- As stated above, as far as the authors are aware, there is little published information regarding optimal light intensity or wavelength for ballan wrasse in relation to their welfare.
- RENSVEL results suggest that neither wavelength (green light: 520 nm, blue light: 450 nm, or broadspectrum white) or intensity (1, 5, 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) affect survival or growth (Espmark et al., 2019).
- However, Espmark et al., (2019) suggest fish under green light (520 nm) had a higher proportion of cataracts than those under blue light (450 nm). Light intensity also affected the incidence of cataracts, with the highest proportion of fish with cataracts at 5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Fish under green light (520 nm) also had higher activity levels, glucose levels and more epidermal damage than those under blue light (450 nm).
- Skiftesvik et al., (2017) have reported that wavelength can affect the behaviour of wild caught ballan wrasse, with fish held under green light being more active than those under blue, and fish held under red light being more aggressive towards conspecifics in comparison to fish held under other wavelengths.
- Helland et al., (2014) recommended that wrasse should not be abruptly transferred from a 24 h light regime to a 16:8 LD regime in the tank rearing phase and suggested a more gradual transition should be tested.
- Skiftesvik et al., (2014) reported that unexpected shadowing over the tank or sudden changes in light can trigger 'clumping' behaviour in wrasse larvae and juveniles. They suggested keeping light diffuse and uniform to reduce the risk of clumping.
- Cleaner fish detect lice by sight and short days or low light intensities during winter may reduce their lice detection abilities and effectiveness (Skiftesvik et al., 2017).

Practical based knowledge

- Blue light may be perceived as unpleasant for humans. A solution to this may be to use wide or full-spectrum white light which also contains the blue wavelength (450 nm).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

Density

Stocking density is a common OWI for fish but its use can be somewhat problematic as its influence depends on other factors such as water quality, life stage, behavioural interactions, feed management etc. (e.g. Turnbull et al., 2008). Its potential welfare effects must therefore be considered in partnership with other OWIs (see Turnbull et al., 2005).



Science based knowledge

- As stated above, it is a challenge to define optimal or undesirable stocking densities, even in well established aquaculture species, due to the number of factors that can influence its ultimate effect. However, it is clear that inappropriate densities (e.g. too high) can be detrimental to fish welfare, especially if they have a negative impact upon e.g. water quality, behavioural interactions or feed access.
- Suitable shelters should be provided for ballan wrasse to rest in at night and also to reduce the risk of potential predation by either salmon or trout (Rimstad et al., 2017) or by predatory seabirds around the pen https://www.northernperiphery.eu/files/archive/Downloads/Project_Publications/18/ECOFISH_leaflet7_Farm_Application_of_Wrasse_web_version.pdf
- Other stocking density recommendations:
 - Wrasse > 10 grams in weight must not be subjected to stocking densities over 30 kg/m³ in hatcheries (RSPCA, 2018a).
 - Wrasse 20 g or > 50g should be subjected to densities of 15 – 25 kg/m³ during ongrowing (Treasurer, 2018).
 - Stocking density should be < 110 kg/m³ during transport (RSPCA, 2018a).

Practical based knowledge

- It has also been recommended that densities during tank rearing should not be > 5 kg/m³. https://www.northernperiphery.eu/files/archive/Downloads/Project_Publications/18/ECOFISH_leaflet7_Farm_Application_of_Wrasse_web_version.pdf
- Densities of 7-10 kg/m³ have been used for rearing ballan wrasse broodstock (I. Lein, pers. comm.)

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

Turbidity/TSS

Kolarevic, Stien et al., (2018) state “*Turbidity refers to the clarity of the water and TSS refers to the suspended material in the water and while these two parameters are related they are not always highly correlated*”. Turbidity can be influenced by dissolved and suspended solids and the nature of these solids is critical for determining their effect on the fish. High concentrations of suspended solids can lead to reduced dissolved oxygen saturations due to microbial activity and smaller particles can also potentially affect gill function (Timmons and Ebeling, 2007). However, as far as the authors are aware, optimal or critical levels for turbidity or TSS have not been reported for ballan wrasse.



Science based knowledge

- As stated above, **the authors have not found any peer-reviewed published information on optimal or critical levels for Turbidity and TSS in relation to ballan wrasse welfare.**
- *Until this information becomes available, we draw the readers attention to the recommendations for TSS drawn up for Atlantic salmon (Thorarensen and Farrell, 2011):*
 - *The upper limit of TSS for Atlantic salmon salmon ha been suggested to be ≤ 15 mg/l (Thorarensen and Farrell, 2011).*
- *TSS values for other aquaculture species have been reported as being between 10 and 80 mg/l and are species specific (Timmons and Ebeling, 2007).*

Practical based knowledge

- Practical experience regarding turbidity/TSS suggest increased turbidity and organic matter in RAS can cause an increase in temperature and a reduction in dissolved oxygen and should be monitored.

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

Total ammonia nitrogen (TAN), Nitrite (NO_2^-) and Nitrate (NO_3^-)

Ammonia (NH_3) is a poisonous product of protein catabolism and is referred to as Unionised Ammonia, UIA (Thorarensen and Farrell, 2011) that reacts with water to form ionised ammonium (NH_4^+). The total quantity of NH_3 and NH_4^+ is termed Total Ammonia Nitrogen (TAN). Ammonia concentrations in the water depend upon TAN, pH and temperature. Low DO levels and variable concentrations of NH_3 lead to increased ammonia toxicity whilst increased salinity and sodium levels reduce NH_3 toxicity (Colt, 2006). Nitrite (NO_2^-) and nitrate (NO_3^-) can accumulate in water, particularly in cases where water is reused (RAS and/or transport). Nitrite can be toxic for fish, but mainly in freshwater where it competes with chloride uptake in the gills. In seawater the presence of chloride in the water alleviates the adverse effects of nitrite toxicity making it less harmful. Nitrate has been known to be less toxic for some species (for example Atlantic salmon) compared to nitrite. As far as the authors are aware, optimal or critical levels for TAN, nitrite or nitrate have not been reported in ballan wrasse.



Science based knowledge

- As stated above, **the authors have not found any peer-reviewed published information on optimal or critical levels for TAN, nitrite or nitrate in relation to ballan wrasse welfare.**
- *Until this information becomes available, we draw the readers attention to the conservative recommendations for UIA, nitrite or nitrate that have been drawn up for Atlantic salmon (as reported in Noble et al., 2018):*
 - *Recommendations regarding UIA in Atlantic salmon:*
 - *Short-term exposure (4 hours): 0.1 mg/l (Wedemeyer, 1996); long-term exposure: 0.012 mg/l (Fivelstad et al., 1995).*
 - *Recommendations regarding nitrite in Atlantic salmon:*
 - *0.1 mg/l (Wedemeyer, 1996; Thorarensen and Farrell, 2011).*
 - *Recommendations regarding nitrate in Atlantic salmon:*
 - *< 100 mg/l (Bregnballe, 2010).*

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

Water speed

Water speed is a well established indirect OWI in fish (e.g. Kolarevic, Stien et al., 2018). It affects the swimming behaviour of the fish (Nilsson, Stien, Iversen et al., 2018) and its effects can be beneficial e.g. by exercising the fish (e.g. Kolarevic, Stien et al., 2018). However, currents that are too high can lead to exhaustion.



Science based knowledge

- In a study by Leclercq et al., (2018), wrasse distribution and swimming activity did not appear to be affected by the tidal cycle, although the farm site was considered to be sheltered with a mean water flow of ca. 6 cm/s.
- Results from RENSVEL suggest the critical swimming speeds of juvenile ballan wrasse (mean weight = 32g) can range from 1.7 – 2.5 body lengths/second (bl/s), dependent upon DO saturation (Gaffney et al., in prep).
 - DO saturations of 75% significantly reduced RU_{crit} to 1.7 bl/s.
 - DO saturations of 85% led to an RU_{crit} of 2.1 bl/s.
 - DO saturations of 100% led to an RU_{crit} of 2.5 bl/s.
 - DO saturations of 125% led to an RU_{crit} of 2.0 bl/s.
- When exposed to water velocities in a swim tunnel, 12.5 – 18.5 % of the fish do not swim at all (Gaffney et al., in prep.; Espmark et al., 2019).

Practical based knowledge

- When wrasse are held in cages over winter they become less active and should be protected from e.g. strong currents (Treasurer et al., 2018).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

INDIVIDUAL BASED OWIs

Individual based OWIs including morphological injuries are well established OWIs for numerous farmed species (Noble et al., 2018; RSPCA 2018a, b; Stien et al., 2013) including cleaner fish (Treasurer and Feledi, 2014; Treasurer et al., 2018) and are also applicable at differing lifestages (Treasurer et al., 2018). However, there is still very little published information relating to individual based OWIs in ballan wrasse (Treasurer et al., 2018).



Key Individual based OWIs covered in these Factsheets:

- Sores
- Scale loss
- Skin haemorrhaging
- Active fin damage
- Healed fin damage
- Eye damage
- Vertebral deformities
- Snout and mouth damage
- Opercular damage
- Gill beat rate

Individual
based OWIs



RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

Epidermal damage

Addresses the damage or loss of epidermal tissue, including sores/ulcers, scale loss and haemorrhaging. The epidermis is a barrier to infection and contains nociceptors. Any damage to the epidermis is a well established risk for fish welfare (Noble et al., 2012) and has been used as an OWI in ballan wrasse (Treasurer and Feledi, 2014).



Science based knowledge

Risk factors for sores and skin haemorrhaging in ballan wrasse:

- Sores/Ulcers:
 - Health related risk factors: infections with *Moritella viscosa* (Rimstad et al., 2017; Scholz et al., 2018); *Tenacibaculum* spp. (Rimstad et al., 2017); Atypical *Aeromonas salmonicida* (Rimstad et al., 2017); Viral hemorrhagic septicemia (VHS) virus (Scholz et al., 2018).
- Skin haemorrhaging:
 - Has been used as an OWI in ballan wrasse by Treasurer and Feledi (2014) but no haemorrhaging was observed in their cage deployment study.
- Scale loss:
 - Scale loss has been widely used as an OWI in other species e.g. Atlantic salmon (Noble et al., 2018) and we suggest it can be used as a potential OWI for ballan wrasse.
 - Aggression has been reported in wrasse male broodstock during spawning and this can lead to scale loss and mortalities during the spawning season (Treasurer, pers. obs. reported in Treasurer et al., 2018).

Practical based knowledge

- Epidermal damage in wrasse has also been observed in cages in relation to handling and care should be taken when carry out any handling procedures (Rabadan, 2018). For example, knotless nets should be used for handling.
- Epidermal damage may also be due to net cleaning or other operations (Rimstad et al., 2017).
- 'Clumping' or 'balling' behaviour may lead to fin or epidermal injuries when the fish attempt to swim into the dense mass of fish and get injured.

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

Active and healed fin damage

Fin damage is a well established welfare issue in cleaner fish (Treasurer et al., 2018) as it is damage to live tissue (Ellis et al., 2008) and active fin damage may also be a welfare and health risk due to infection risk via opportunistic pathogens (e.g. Scholz et al., 2018). Treasurer and Feledi (2014) have suggested fin damage is one of the most common forms of physical injury in ballan wrasse.



Science based knowledge

- Fins susceptible to fin damage include:
 - Caudal, Dorsal, Pectoral, Anal fin with the caudal fin especially at risk (Treasurer and Feledi, 2014).
- Active fin damage is also a potential route for opportunistic pathogens such as *Tenacibaculum* spp. (e.g. Scholz et al., 2018).
- With regard to health related issues, fin damage can also be exacerbated by *Tenacibaculum* spp. (Scholz et al., 2018).
- Stress may also induce/exacerbate fin damage, especially in juvenile ballan wrasse (Virtanen, 2018; Espmark et al., 2019).

Practical based knowledge

- Further potential risk factors for fin damage may be the choice of feeding strategy and feed withdrawal.
- Potential mitigation factors for fin damage can be improved feed management and minimising exposure to stressors.
- 'Clumping' or 'balling' behaviour may lead to fin or epidermal injuries when the fish attempt to swim into the dense mass of fish and get injured.

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

Eye damage including cataracts

Eye damage is also a well established welfare threat in fish and can be due to trauma from e.g. handling (see Nilsson, Stien, Iversen et al., 2018). Cataracts (clouding of the lens) can also be a problem in wrasse.



Science based knowledge

- Potential risk factors for eye damage:
 - Light (Green light: 520 nm) (Espmark et al., 2019).
 - RENSVEL results (Espmark et al., 2019) suggest light intensity also affected the incidence of cataracts, with the highest proportion of fish with cataracts at $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in comparison to either 1 or $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.
 - Malnutrition is also a risk factor for eye damage and cataracts (FHF CleanFeed project 901131).
- *Risk factors in other species: environmental and nutritional factors are key to cataract formation.*

Practical based knowledge

- Further potential risk factors for eye damage: abrasion or dessication during handling.
- Potential mitigation factors: gentle handling, knotless nets, limited air exposure, reducing the risk of potential drying of the eye.

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

Vertebral deformities

Vertebral deformities are a well established welfare indicator in fish and can impact upon welfare by e.g. reducing the effectiveness of foraging or swimming behaviour (e.g. Noble et al., 2018 and references therein). However, as far as the authors are aware, there is limited information on vertebral deformities in cleaner fish, e.g. in terms of their aetiology, driving factors or prevalence and severity.



Science based knowledge

Risk factors for vertebral deformities:

- Subjecting the early life stages of ballan wrasse to inadequate nutrition, in particular due to the use of feed crumbles from hard, hot extruded diets which may be consumed by the stomachless larvae-juveniles may not be utilized enough, resulting in reduced growth, significantly lower levels of minerals in the body (such as phosphorus, calcium and magnesium) and multiple skeletal anomalies (Kousoulaki et al., 2018).
- Also poor quality live feed for larvae (Kjørsvik et al., 2014; Høyland, 2015).
- High incubation temperatures (the temperature optima lies between 10-15 °C, Shchepak, 2011).

Practical based knowledge

- Practical based experience suggests risk factors for vertebral deformities include high water current speed in the early tank rearing phase, leading to lordosis (Lekva and Grøtan, 2018).
- As stated above, vertebral deformities may also be due to nutritional problems or inappropriate rearing temperatures (Lekva and Grøtan, 2018).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

Snout and mouth damage

Snout damage can be due to e.g. handling and contact with sharp edges, hard surfaces or abrasion with the net (see e.g. Gismervik et al., 2018). Mouth damage is also a clear welfare threat as it may hinder feeding and the ingestion of food items (Branson and Turnbull, 2008). It is an established OWI in ballan wrasse (Treasurer and Feledi, 2014).



Science based knowledge

Risk factors and snout damage and mouth haemorrhaging:

- Pathogens such as *Tenacibaculum* spp. (Scholz et al., 2018).
- Inappropriate weaning diets can lead to head/jaw deformities in wrasse (Kousoulaki et al., 2018).
- *In other species, it can be due to physical contact with the net, hard surfaces or sharp edges (e.g. Noble et al., 2012).*

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

Opercular damage

The opercula have a role in, and contribute to, the buccal pump mechanism and can improve the effectiveness of respiration in fish. Any damage can reduce this effectiveness and may become a welfare challenge, especially if the fish e.g. have gill health problems or are subjected to hypoxic conditions (Ferguson and Speare, 2006).



Science based knowledge

- Opercular damage is a widely used welfare indicator in other fish species e.g. Atlantic salmon (Noble et al., 2018; RSPCA, 2018a). However, as far as the authors are aware, there is limited information available on the risk factors that can contribute to opercular damage in ballan wrasse, or its severity.
- *Risk factors for opercular damage in other species:*
 - *Opercular damage may also be due to physical damage, poor nutrition or poor rearing conditions (e.g. Eriksen et al., 2007; Nilsson, Stien, Iversen, et al., 2018).*

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

Gill beat rate

An elevated gill beat rate or ventilation frequency may not always be due to stress or indicate a welfare risk. However, it can indicate low dissolved oxygen (DO) saturations or gill problems (Nilsson, Stien, Iversen et al., 2018). It has been suggested as an OWI for ballan wrasse by Treasurer et al., (2018).



Science based knowledge

- Potentially valuable OWI if the fish are slow moving or the observer has good visibility (Treasurer et al., 2018).
- Can be a good indicator of hypoxia - If fish are exposed to hypoxic conditions they can respond by hyperventilating (Perry et al., 2009).

Practical based knowledge

- Another potential risk factor for increased gill beat rate is AGD (Treasurer personal observation, reported in Treasurer et al., 2018).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

Emaciation state incl. condition factor

Emaciation is a robust indicator of a welfare challenge in cleaner fish (Nilsen et al., 2014). Condition factor has also been used as an OWI for ballan wrasse (Treasurer and Feledi, 2014).



Science based knowledge

- Emaciation in ballan wrasse can be caused by poor nutrition and wrasse do need supplementary feeding during cage deployment to maintain their body condition as they may not get enough nutrition from eating lice alone (e.g. Skiftesvik et al., 2013) .
- With regard to certain weaning protocols (e.g. those involving Artemia and weaning onto dry feeds) the majority of fish starve if the weaning diet feed contains significant amounts of fish meal, in particular fish hydrolysates stabilized with the synthetic antioxidant ethoxyquin (Bogevik et al., 2015). This problem may be also be observed during later life stages if the fish meal used in the feed is of poor quality e.g. oxidized. The feed needs to contain significant amounts of high quality shrimp or krill meal.
- A reduction in condition factor has previously been used as an OWI in ballan wrasse (e.g. Skiftesvik et al., 2013).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

GROUP BASED OWIs

Group based OWIs are also well established OWIs for numerous farmed species (Noble et al., 2018; RSPCA 2018a, b; Stien et al., 2013) including cleaner fish (Treasurer et al., 2018) and are also applicable at differing lifestages (Treasurer et al., 2018).



Key Group based OWIs covered in these Factsheets:

- Mortality
- Health status
- Appetite
- Growth
- Behaviour e.g. aggression, different types of swimming behaviour, clumping behaviour
- Blood or scales in the water

Group based
OWIs



RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

Mortality rate

Mortality rate (especially changes in mortality rate) is a very widely used OWI. If mortality is high or begins to rise it is a clear indicator of a welfare problem. On the other hand, low mortalities do not automatically mean that welfare is good – fish can experience welfare problems that do not lead to mortality (e.g. Nilsson, Stien, Iversen et al., 2018).



Science based knowledge

- Mortality can be used as both a long and short-term OWI in numerous farmed species (e.g. Nilsson, Stien, Iversen et al., 2018; Treasurer et al., 2018).
 - Long term: The total accumulated mortality during a production cycle
 - Short term: Daily, weekly, monthly
- Short-term mortality such as an active increase in mortality rate can be used to identify ongoing welfare risks or potential problems on the farm. Long-term mortality can be used to retrospectively assess potential welfare or health problems in the rearing unit, farm, company or region (see e.g. Nilsson, Stien, Iversen et al., 2018).
- Mortality is benchmarked in a number of other farmed species such as Atlantic salmon (Soares et al., 2011; Stien et al., 2016) and this benchmarking, if carried out actively or in real time, can also be used to actively or retrospectively assess or evaluate potential welfare problems.
- **However, there is anecdotal evidence that the carcasses of cleanerfish can rapidly decompose in the rearing unit (e.g. Nilsen et al., 2014) which is problematic for obtaining precise data on mortality rates and identifying the causes of mortality (Treasurer et al., 2018).**
- **It has also been suggested that dead cleaner fish in sea cages may also be eaten by wild fish as they lay on the net floor (Nilsen et al., 2014).**
- Dead fish should be collected as fast as possible to circumvent this. If possible the potential causes of mortality should also be identified.

Risk factors for mortalities:

- Nilsen et al., (2014) carried out a mortality mapping study in 2013 that reported ballan wrasse mortalities in sea cages were due to: sores/fin erosion (53%) or mechanical injuries (3%), with 37% due to other causes (8% of mortalities were also old/rotten). No mortalities were recorded as due to bacterial infections (unlike lumpfish).
- Specific health related risk factors for mortalities include: Atypical *Aeromonas salmonicida* (Rimstad et al., 2017; Scholz et al., 2018); *Vibrio anguillarum* (Rimstad et al., 2017; Scholz et al., 2018); VHSv (Rimstad et al., 2017); *Moritella viscosa* (Scholz et al., 2018); AGD (Scholz et al., 2018).
- Small wrasse may also be predated upon by salmon or trout. A high risk period for predation can be when the salmon or trout are fasted. This risk may be reduced by providing the wrasse with shelters (Rimstad et al., 2017).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

Mortality rate continued

Science based knowledge continued

Risk factors for mortalities:

- Wrasse have a closed swim bladder, so any fish that are acclimated to deeper water in the net cage can die if they are brought to the surface too rapidly e.g. if the nets or the dead fish collector are lifted too fast (Treasurer and Feledi, 2014; Rimstad et al., 2017).
- Aggression has been reported in wrasse male broodstock during spawning, which can lead to scale loss and mortalities during the spawning season (Treasurer, pers. obs. reported in Treasurer et al., 2018).

Practical based knowledge

- High mortalities after cage deployment can also be related to handling, damage incurred during transport or due to chemical or mechanical de-licing practices (e.g. Rimstad et al., 2017; Kousoulaki et al., 2018).
- Mortalities may also be due to net cleaning, delicing baths or other operations (Rimstad et al., 2017).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

Health status

Health has a major impact upon fish welfare and health status is a commonly used welfare indicator. In certain situations health problems can be diagnosed on the farm (OWIs) and others require samples from the fish to be sent to a laboratory for further analysis (LABWIs), see Nilsson, Stien, Iversen et al., (2018).



Science based knowledge

- The health status of ballan wrasse is regularly monitored by the farmer and internal or external fish health personnel. If a potential health problem is noticed and identified, the response time to the challenge can be much more rapid. A rapid response time is key as it has been previously reported that the majority of wrasse mortalities can be related to health problems such as sores or fin rot (Nilsen et al., 2014).
- Nilsson, Stien and Iversen et al., (2018) suggest detailed health plans are a good resource based WI. They also state *“While frequent treatments may indicate poor disease control and a welfare problem they can also indicate an effective monitoring and response to disease problems they therefore have to be considered in context”*.
- The impacts of infectious diseases on certain OWIs such as epidermal damage, eye damage, behaviour, appetite and mortality are addressed in each relevant OWI factsheet in this series.
- Numerous reviews and risk assessments also give an good overview of the overall health impacts (and welfare risks) posed by cleaner fish pathogens (e.g. Rimstad et al., 2017; Scholz et al., 2018) and will not be covered in these factsheets.

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

Appetite and growth rate

A drop or sudden loss of appetite, or a poor feeding response can be due to stress (Huntingford and Kadri, 2014). Good monitoring of appetite and the feeding response of ballan wrasse can help the farmer identify any potential welfare problems as soon as possible (Treasurer et al., 2018). The same applies to growth rate: if farmers notice a sudden change or drop in growth rate, it may be due to a welfare problem (e.g. Nilsson, Stien, Iversen et al., 2018).



Science based knowledge

Appetite:

- A well established OWI in numerous fish species (e.g. Huntingford and Kadri, 2014; Noble et al., 2018; Treasurer et al., 2018). Usually used as a qualitative OWI as quantifying appetite can be difficult due to variability in appetite and the feeding response on a potentially hourly or daily basis (Treasurer et al., 2018).
- However a drop in, or lack of appetite may not just be due to a potential problem. For example, it may be because fish have just eaten and are satiated. It may also be related to environmental factors, such as water temperatures that are too low (Treasurer et al., 2018) or the life stage of the fish.
- A drop in appetite can be an indicator for potential health problems in wrasse including infections with *Aeromonas salmonicida* (Scholz et al., 2018); *Vibrio anguillarum* (Scholz et al., 2018); *Tenacibaculum* spp. (Scholz et al., 2018).
- Long term appetite problems lead to emaciation (see earlier section of these factsheets).
- The presence of feed in the intestine is an indicator that the fish have recently eaten (although this is dependent on fish size and temperature). An assessor can carry out this check during auditing of recently euthanised fish (e.g. Kolarevic, Stien et al., 2018) and its presence/absence is already monitored in vaccine control protocols (e.g. by PHARMAQ, as outlined in Haugland et al., 2018).

Growth and growth rate:

- Growth and growth rate are fundamentally connected with feeding, appetite and the nutritional status of the fish (Nilsson, Stien, Iversen et al., 2018) and can be a reflection of problems associated with these factors.
- Requires good growth monitoring practices in order to be a robust, quantifiable OWI.
- As with appetite, poor growth may not just be linked to poor welfare *per se*, as longer term changes in growth rate may be linked to e.g. season or the life stage of the fish (Treasurer et al., 2018). To help identify whether poor growth is due to a welfare challenge, it should be coupled with other OWIs (Ellis et al., 2002).
- Size variation with the group may reflect feed access and can also be used as an OWI for cleaner fish (Treasurer et al., 2018).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

Behaviour

Fish behaviour is a central tool in the OWI toolbox (see Nilsson, Stien, Iversen et al., 2018). Potential behavioural OWIs suitable for ballan wrasse include aggression, different types of swimming behaviour and clumping behaviour (Treasurer et al., 2018).



Science based knowledge

General information regarding their behaviour:

- Wrasse can become adapted to and tolerate exposed, energetic water conditions and habitats (Rimstad et al., 2017).
- Ballan wrasse are diurnal (Brooker et al., 2018).
- Wrasse > 10 grams must be provided with environmental enrichment in hatchery tanks (RSPCA, 2018a).
- Ballan wrasse can express escape /avoidance behaviours by actively swimming away from the perceived threat (e.g. Iversen et al., 2015). They can also express “clumping” behaviour where the fish form very tight high density groups.

Behaviour in the tank rearing phases:

- Water flow must not have a negative impact upon wrasse behaviour and the fish should express normal behaviour (RSPCA, 2018a).
- RENSVEL results suggest juvenile ballan wrasse (20-30 g) have a U_{crit} of 1.7 – 2.5 bl/s dependent upon DO saturation (Gaffney et al., in prep).
- Wrasse can exhibit clumping behaviour from around 40-50 days post hatch and this clumping behaviour can persist through the tank rearing phase (Lekva and Grøtan, 2018). It is thought to be a stress response in the absence of shelter (Lekva and Grøtan, 2018). Treasurer et al., (2018) have also suggested it is due to elevated stress levels and it has been suggested as a potential OWI by the same authors, especially if it happens regularly.
- Skiftesvik et al., (2014) reported that disturbances such as noise, unexpected shadowing over the tank, sudden changes in light and also feeding can trigger clumping behaviour in wrasse larvae and juveniles. They suggested reducing the fish’s exposure to disturbances, or keeping light diffuse and uniform.
- Aggression is not considered a problem in larval or juvenile rearing but has been reported in wrasse male broodstock during spawning, which can lead to scale loss and mortalities during the spawning season (Treasurer, pers. obs. reported in Treasurer et al., 2018).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

Behaviour continued

Science based knowledge cont.

Health impacts upon behaviour:

- Lethargy in wrasse can be due to infections with atypical *Aeromonas salmonicida* (Scholz et al., 2018); *Tenacibaculum spp.* (Scholz et al., 2018) or *Vibrio anguillarum* (Scholz et al., 2018).

Behaviour during sea cage deployment:

- The RSPCA (2018a) report that wrasse will often exhibit tight clumping or shoaling type behaviours when under duress.
- Small wrasse may also be predated upon by salmon or trout. A high risk period for predation can be when the salmon or trout are fasted. This risk may be reduced by providing the wrasse with shelters (EURL, 2016; Rimstad et al., 2017).
- Ballan wrasse prefer the sides of the net cage or the corners, irrespective of whether it's day nor night, and were also observed resting on or near the bottom of the cage (Leclercq et al., 2018).
- Wrasse adjust their swimming depths throughout the day, spending ca. 60% of their daytime activity at depths below 15 m and swimming shallower at night (Leclercq et al., 2018).
- In a study by Leclercq et al., (2018), wrasse distribution and swimming activity did not appear to be affected by the tidal cycle, although the farm site was considered to be shelter with a mean water flow of ca. 6 cm/s.

Practical based knowledge

- It has been reported that juvenile tank reared ballan wrasse will react to handling, grading or netting by resting immobile on the bottom of the tank for several minutes after the procedure (Leclercq et al., 2014).
- Practical experience suggests wrasse do need shelter for rest for periods and prefer artificial kelp type shelters (artificial kelp).
- 'Clumping' or 'balling' behaviour may lead to fin or epidermal injuries when the fish attempt to swim into the dense mass of other fish and get injured. This type of behaviour may lead to anoxic conditions within the clump of fish.

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

Blood and scales in the water

Blood or scales in the water have been suggested as potential OWIs for Atlantic salmon by Nilsson, Stien, Iversen et al., (2018). Blood in the water is usually due to damage to the skin or gills and “red water” is evidence that the fish is injured. Scales floating in the water are an indicator of physical damage to the epidermis.



Science based knowledge

- These OWIs are manually and qualitatively diagnosed.
- Can be clearly diagnosed if the fish are in light coloured closed containers (Nilsson, Stien, Iversen et al., 2018) or if the water outflow from a pipe or tank is monitored.
- Is a rapid indicator of an acute or ongoing welfare problem, but their cause or severity cannot be diagnosed without a more detailed investigation of the problem (Nilsson, Stien, Iversen et al., 2018).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

PHYSIOLOGICAL LABWIs and OWIs

Physiological LABWIs and OWIs are often used to document stress-related loads and challenges in numerous species (e.g. Noble et al., 2018) including cleaner fish (Treasurer et al., 2018).



Key Physiological LABWIs and OWIs covered in these Factsheets:

- Plasma cortisol
- Lactate
- Glucose
- Osmolality
- Magnesium
- Chloride

Physiological
LABWIs and
OWIs



RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

Plasma cortisol

Plasma cortisol is widely used as an indicator of the primary stress response in fish (Barton and Iwama, 1991). Elevated levels of plasma cortisol are widely accepted to be linked to negative experiences in fish, although its association with positive situations should not be overlooked (Ellis et al., 2012).



Science based knowledge

- Plasma cortisol levels can be assessed using i) enzyme-linked immunoassay (ELISA) or ii) radioimmunoassay (RIA) methods (Sopinka et al., 2016) and it is therefore classified as a LABWI.
- The acute stress profile of ballan wrasse is similar to Atlantic salmon (Treasurer et al., 2018; Espmark et al., 2019).
- In ~32g wrasse, swimming to exhaustion increased plasma cortisol levels 5-fold from 236 ± 25 nmol/l to 1233 ± 115 nmol/l (Gaffney et al., in prep; Espmark et al., 2019).
- Leclercq et al., (2014) also reported that when juvenile ballan wrasse were subjected to air exposure for 1 minute, plasma cortisol levels increased from 60.8 ± 5.5 ng/ml to 284.3 ± 26.7 ng/ml 30 minutes after exposure to the acute stressor. Levels were still significantly higher than the original pre-stressor levels for 1 – 2 hours post-stressor.
- Small wrasse (< 25g) seem to handle stress better than larger ballan wrasse (> 40g) (Virtanen, 2018; Espmark et al., 2019).
- Exposing wrasse to a daily stressor (lowering the water level, 264 kg/m^3) after 7-14 days will lead to a chronic stress load that will adversely affect welfare (Virtanen, 2018; Espmark et al., 2019).

Strengths and weaknesses of the LABWI

- If plasma cortisol levels are sampled before, during and after a routine or operation, they can give the user good, robust information on how that routine affects the fish (Barton, 2002).
- It can be difficult to interpret the samples (especially if limited or single samples are taken) and one should not interpret high levels of plasma cortisol as an indicator of reduced welfare without further information (Nilsson, Stien and Iversen et al., 2018).
- Analysis can be somewhat time consuming (taking at least 1-2 days).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

Lactate

Nilsson, Stien and Iversen et al., (2018) state “*Lactate is the product of anaerobic ATP production (glycolysis) in the cells, which occurs when oxygen is not available in sufficient amounts for the cells to utilise aerobic metabolism*”. However, it can also form under aerobic conditions (see Brooks, 2018). Lactate production can be driven by intensive exercise (e.g. Leclercq et al., 2014 and references therein).



Science based knowledge

- Elevated lactate levels have been widely used as a stress indicator in fish (Barton and Iwama, 1991) but they can be impacted upon by various other factors and as with glucose, they should not be benchmarked against a “standard level”, but measured e.g. before, during and after an operation (Nilsson, Stien, Iversen et al., 2018).
- Lactate is primarily an indicator of elevated levels of muscle activity (which can be due to stress). It can take a few hours to appear in the blood after the fish has been subjected to stress (see Nilsson, Stien, Iversen et al., 2018).
- Resting basal levels of lactate in an unstressed ballan wrasse are 1 – 2 mmol/l (Espmark et al., 2019).
- In ~32g wrasse, swimming to exhaustion increased plasma lactate levels 2.2-fold from 1.31 ± 0.1 mmol/l to 2.85 ± 0.4 mmol/l (Gaffney et al., in prep; Espmark et al., 2019).
- Exposing wrasse to a daily stressor (lowering the water level, 264 kg/m³) led to lactate levels of 4 – 10.5 mmol/l (Virtanen, 2018; Espmark et al., 2019).
- Leclercq et al., (2014) reported that when juvenile ballan wrasse were subjected to air exposure for 1 minute, lactate levels significantly peaked 30 mins post-stressor.
- Lactate appears to be a good indicator for measuring acute stress in ballan wrasse, and may also be a potential indicator for chronic stress in “large” ballan wrasse (> 40g) but this needs further study (Virtanen, 2018; Espmark et al., 2019).

Strengths and weaknesses of the OWI

- Easily accessible hand-held instruments are a validated and inexpensive tool for monitoring lactate levels (Sopinka et al., 2016) and are both robust and easy to use out on the farm. Lactate is therefore classified as an OWI.
- It is difficult to interpret the samples (especially if limited or single samples are taken) and one should not interpret high levels of lactate as an indicator of reduced welfare without further information, as levels can be affected by numerous other factors (Nilsson, Stien and Iversen et al., 2018).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

Glucose



Increased concentrations of plasma cortisol promote glycogenolysis, where tissue stores of glycogen are converted into glucose and discharged into the blood (Barton and Iwama, 1991).

Science based knowledge

- Elevated glucose levels have been widely used as a stress indicator in fish (Barton and Iwama, 1991) but they can be impacted upon by various other factors such as feed ingredients, satiation levels etc. Glucose levels should not be benchmarked against a “standard level”, but measured e.g. before, during and after an operation (Nilsson, Stien, Iversen et al., 2018).
- In ~32g wrasse, stress from swimming to exhaustion increased glucose levels increased from 2.4-fold from 1.46 ± 0.1 mmol/l to 3.44 ± 0.3 mmol/l (Gaffney et al., in prep; Espmark et al., 2019).
- Leclercq et al., (2014) reported that when juvenile ballan wrasse were subjected to air exposure for 1 minute, glucose levels increased nearly 90% from basal levels to 2.2 ± 0.1 mmol/l 30 minutes after exposure to the stressor. Levels returned to pre-stressor levels within 1 hour.

Strengths and weaknesses of the OWI

- Easily accessible hand-held instruments are a validated and inexpensive tool for monitoring glucose levels (Sopinka et al., 2016) and are both robust and easy to use out on the farm. Glucose is therefore classified as an OWI.
- It is difficult to interpret the samples (especially if limited or single samples are taken) and one should not interpret high levels of glucose as an indicator of reduced welfare without further information, as levels can be influenced by numerous other factors (Nilsson, Stien and Iversen et al., 2018).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

Osmolality

Deviations in plasma osmolality are elements of the the secondary stress response in fish (Veiseth et al., 2006). Nilsson, Stien, Iversen et al., (2018) defined osmolality as “*the number of dissolved particles in liquid, and salinity represents the amount of dissolved salt in water. Freshwater has a salinity of 0 ‰ and an osmolality of 0-10 mOsm kg⁻¹, whilst seawater has a salinity of 33-35 ‰ and an osmolality of 1000 mOsm kg⁻¹.*”



Science based knowledge

- According to the results of the RENSVEL project, unstressed ballan wrasse have an osmolality that is around 350-360 mOsm / kg (Virtanen, 2018; Espmark et al., 2019).
- Osmolality also appears to increase during both acute and chronic stress exposure and is most pronounced in “large” ballan wrasse (> 40g) (Virtanen, 2018; Espmark et al., 2019).

Strengths and weaknesses of the LABWI

- Fluctuations in osmolality are a good way to assess the acute stress response (Sopinka et al., 2016).
- It is difficult to interpret the samples in relation chronic stress exposure without further information as osmolality levels can be influenced by numerous other factors (Sopinka et al., 2016).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

Magnesium

Secondary stress responses cause changes to plasma and tissue ions, such magnesium and chloride (Treasurer et al., 2018).



Science based knowledge

- Results from RENSVEL suggest an unstressed ballan wrasse has a plasma magnesium level < 2 mmol/L (Virtanen, 2018; Espmark et al., 2019).
- Plasma magnesium levels also appear to increase during both acute and chronic stress exposure and are a good indicator of disturbed ion balance under stress. There is also a good correlation between levels of plasma cortisol and magnesium (Virtanen, 2018; Espmark et al., 2019).

Strengths and weaknesses of the LABWI

- Fluctuations in plasma magnesium levels are a good way to assess the acute stress response (Sopinka et al., 2016; Espmark et al., 2019).
- However, it is difficult to interpret the samples in relation chronic stress exposure without further information as plasma magnesium levels can be influenced by numerous other factors (Sopinka et al., 2016).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

Chloride

Secondary stress responses cause changes to plasma and tissue ions, such as magnesium and chloride (Treasurer et al., 2018).



Science based knowledge

- Results from RENSVEL suggest an unstressed ballan wrasse has a plasma chloride level that is ca. 140 – 145 mmol/L (Virtanen, 2018; Espmark et al., 2019).
- Plasma chloride levels also appear to increase during both acute and chronic stress exposure and this response is most pronounced in “large” ballan wrasse (> 40g), suggesting chloride levels are a good indicator of disturbed ion balance under stress (Virtanen, 2018; Espmark et al., 2019).

Strengths and weaknesses of the LABWI

- Fluctuations in plasma chloride levels are a good way to assess the acute stress response (Sopinka et al., 2016; Espmark et al., 2019).
- However, it is difficult to interpret the samples in relation to chronic stress exposure without further information as plasma chloride levels can be influenced by numerous other factors (Sopinka et al., 2016).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

REFERENCES

- Barton, B. A. (2002). Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology* 42, 517-525.
- Barton B. A., & Iwama, G. K. (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases* 1, 3-26.
- Bøgevik, A. S., Kousoulaki, K., Skiftesvik, A. B., & Opstad, I. (2016). Fishmeal quality and ethoxyquin effects on the weaning performance of ballan wrasse (*Labrus bergylta*) larvae. *Aquaculture nutrition*, 22(1), 46-50.
- Bolton-Warberg, M. (2018). An overview of cleaner fish use in Ireland. *Journal of fish diseases*, 41(6), 935-939.
- Branson, E. J., & Turnbull, T. (2008). Welfare and deformities in fish. In: *Fish welfare*. Branson, E. J. (ed) Blackwell, Oxford. pp. 202–216
- Bregnballe, J. (2010). A guide to recirculation aquaculture. Copenhagen, Denmark: Eurofish
- Brooker, A. J., Papadopoulou, A., Gutierrez, C., Rey, S., Davie, A., & Migaud, H. (2018). Sustainable production and use of cleaner fish for the biological control of sea lice: recent advances and current challenges. *Veterinary Record*, 183.
- Brooks, G. A. (2018). The science and translation of lactate shuttle theory. *Cell metabolism*, 27(4), 757-785.
- Colt, J. (2006). Water quality requirements for reuse systems. *Aquacultural Engineering*, 34(3), 143-156.
- EFSA, (2008). Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare on a request from the European Commission on Animal welfare aspects of husbandry systems for farmed Atlantic salmon. *The EFSA Journal* 736, 1-31.
- Ellis, T., North, B., Scott, A. P., Bromage, N. R., Porter, M., & Gadd, D. (2002). The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. *Journal of Fish Biology* 61(3), 493-531.
- Ellis, T., Oidtmann, B., St-Hilaire, S., Turnbull, J. F., North, B. P., MacIntyre, C. M., Nikolaidis, J., Hoyle, I., Kestin, S. C., & Knowles, T. G. (2008). Fin erosion in farmed fish. In: *Fish welfare*. Branson E. J. (ed.). Blackwell Publishing. pp. 121–149.
- Ellis, T., Yildiz, H. Y., López-Olmeda, J., Spedicato, M. T., Tort, L., Øverli, Ø., & Martins, C. I. (2012). Cortisol and finfish welfare. *Fish physiology and biochemistry*, 38(1), 163-188.
- Eriksen, M. S., Espmark, Å., Braastad, B. O., Salte, R., & Bakken, M. (2007). Long-term effects of maternal cortisol exposure and mild hyperthermia during embryogeny on survival, growth and morphological anomalies in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* offspring. *Journal of Fish Biology* 70, 462-473.
- Espmark, Å. M., Noble, C., Kolarevic, J., Berge, G. M., Aas, G. H., Tuene, S., Iversen, M. H., Wergeland, H., Johansen, L. -H., Burgerhout, E., Gjerde, B., & Lein, I. (2019). Velferd hos rensefisk – operative velferdsindikatorer (OVI) – RENSVEL. Nofima report 12/2019. ISBN 978-82-8296-589-7.
- European Union Reference Laboratory for Fish Diseases (2016). Cleaner fish in Aquaculture: Health management and legislative issues. 35p. December 2016. <http://www.eurl-fish.eu/-/media/Sites/EURL-FISH/english/reports/Scientific-meeting-report-on-cleaner-fish-in-aquaculture.ashx?la=da&hash=A769E28EE3E7035F7DAB44C421659A69905A4328> accessed 26th March 2019.
- Ferguson, H. W., & Speare, D. J. (2006). Gills and Pseudobranchs. In: *Systemic Pathology of Fish: A Text and Atlas of Normal Tissues in Teleosts and their Responses in Disease*. Ferguson, H. W. (ed). Scotian Press, London. 25–63.
- Fivelstad, S., Schwarz, J., Strømsnes, H., & Olsen, A. B. (1995). Sublethal effects and safe levels of ammonia in seawater for Atlantic salmon postsmolts (*Salmo salar* L.). *Aquacultural Engineering* 14(3), 271-280.
- Gaffney K., Burgerhout E., Espmark Å. M., & Lein I. (In Prep). The impact of dissolved oxygen concentration on the welfare and swimming performance of Ballan wrasse (*Labrus bergylta* Ascanius, 1767).
- Gismervik, K., Turnbull, J. F., Nielsen, K. V., Iversen, M. H., Nilsson, J., Espmark, Å. M., Mejdell, C. M., Sæther, B.-S., Stien, L. H., Izquierdo-Gomez, D., Kolarevic, J., Midling, K. Ø., Ellingsen, K., & Noble, C. (2018). Welfare Indicators for farmed Atlantic salmon: Part C – fit for purpose OWIs for different routines and operations. In: Noble, C., Gismervik, K., Iversen, M. H., Kolarevic, J., Nilsson, J., Stien, L. H. & Turnbull, J. F. (Eds.) (2018). *Welfare Indicators for farmed Atlantic salmon: tools for assessing fish welfare*. 351pp. ISBN 978-82-8296-556-9. pp. 238-351.
- Grant, B., Davie, A., Taggart, J. B., Selly, S. L., Picchi, N., Bradley, C., Prodohl, P., Leclercq, E., & Migaud, H. (2016). Seasonal changes in broodstock spawning performance and egg quality in ballan wrasse (*Labrus bergylta*). *Aquaculture*, 464, 505-514.
- Haugland, G. T., Rønneseth, A., & Wergeland, H. I. (2018). Immunology and vaccinology of lumpfish and wrasse. In: *Cleaner fish biology and aquaculture applications*. Treasurer J. W. (ed.). 5M Publications. Sheffield. pp. 258-280.
- Helland, S., Grøtan, E., & Noble, C. (2014). Effects of transfer from continuous light to different light regimes on growth, survival, and fin and skin health. In: *Production of ballan wrasse (Labrus bergylta)*. Science and Practice. Oslo: Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF) - The Norwegian Seafood Research Fund p. 94-95
- Huntingford, F. A., & Kadri, S. (2014). Defining, assessing and promoting the welfare of farmed fish. *Revue Scientifique et Technique-office international des Epizooties*, 33(1), 233-244.
- Høyland, O. S. (2015). The effect of different live feeds and water qualities on growth, survival, ossification and skeletal anomalies of ballan wrasse (*Labrus bergylta*) larvae (Master's thesis, NTNU).
- Iversen, M. H., Jakobsen, R., Eliassen, R. A., & Ottesen, O. (2015). Sedasjon av berggylt og rognkjeks for å redusere stress og dødelighet. *Norsk Fiskeoppdrett*, 42-46.
- Jobling, M. (1997). Temperature and growth: modulation of growth rate via temperature change. In: *Global Warming: Implications for Freshwater and Marine Fish*. Wood C. M. and McDonald D. G. (eds.). Cambridge University Press, Cambridge, pp. 225–254.
- Kjørsvik, E., Gagnat, M. R., Wold, P. A., Bardal, T., Attramadal, K., Sørøy, M., Hansen, M. H., Almli, M., Størseth, T., Dahle, S., & Øie, G. (2014). Functional development of ballan wrasse & effects of start feed quality. . In: *Production of ballan wrasse (Labrus bergylta)*. Science and Practice. Oslo: Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF) - The Norwegian Seafood Research Fund p. 54-63.
- Kolarevic, J., Stien, L. H., Espmark, Å. M., Izquierdo-Gomez, D., Sæther, B. S., Nilsson, J., Oppedal, F., Wright, D. W., Nielsen, K. V., Gismervik, K., Iversen, M. H., Turnbull, J. F., & Noble, C. (2018). Welfare Indicators for farmed Atlantic salmon: Part B–Fit for Purpose OWIs for different production systems. In: Noble, C., Gismervik, K., Iversen, M. H., Kolarevic, J., Nilsson, J., Stien, L. H. & Turnbull, J. F. (Eds.) (2018). *Welfare Indicators for farmed Atlantic salmon: tools for assessing fish welfare*. 351pp. ISBN 978-82-8296-556-9. pp. 146-237.
- Kousoulaki, K., Migaud, H., & Davie, A. (2018). Cleaner fish species nutrition and feeding practices. In: *Cleaner fish biology and aquaculture applications*. Treasurer J. W. (ed.). 5M Publications. Sheffield. pp. 179-196.
- Leclercq, E., Davie, A., & Migaud, H. (2014). The physiological response of farmed ballan wrasse (*Labrus bergylta*) exposed to an acute stressor. *Aquaculture*, 434, 1-4.
- Leclercq, E., Zerafa, B., Brooker, A. J., Davie, A., & Migaud, H. (2018). Application of passive-acoustic telemetry to explore the behaviour of ballan wrasse (*Labrus bergylta*) and lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) in commercial Scottish salmon sea-pens. *Aquaculture*, 495, 1-12.

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE

- Lekva, A. & Grøtan, E. (2018). Rearing of ballan wrasse. In: Cleaner fish biology and aquaculture applications. Treasurer J. W. (ed.). 5M Publications. Sheffield. pp. 34–45.
- Nilsen, A., Viljugrein, H., Røsæg, M. V., & Colquhoun, D. (2014). Rensefiskhelse – kartlegging av dødelighet og dødelighetsårsaker. Veterinærinstituttets rapportserie 12-2014, 84pp.
- Nilsson, J., Stien, L. H., Iversen, M. H., Kristiansen, T. S., Torgersen, T., Oppedal, F., Folkedal, O., Hvas, M., Gismervik, K., Ellingsen, K., Nielsen, K. V., Mejdell, C. M., Kolarevic, J., Izquierdo-Gomez, D., Sæther, B.-S., Espmark, Å. M., Midling, K. Ø., Roth, B., Turnbull, J. F., & Noble, C. (2018). Welfare Indicators for farmed Atlantic salmon–Part A. Knowledge and theoretical background. In: Noble, C., Gismervik, K., Iversen, M. H., Kolarevic, J., Nilsson, J., Stien, L. H. & Turnbull, J. F. (Eds.) (2018). Welfare Indicators for farmed Atlantic salmon: tools for assessing fish welfare. 351pp. ISBN 978-82-8296-556-9. pp. 10-145.
- Noble, C., Cañon Jones, H. A., Damsgård, B., Flood, M. J., Midling, K. Ø., Roque, A., Sæther, B. -S., & Cottee, S. Y. (2012). Injuries and deformities in fish: their potential impacts upon aquacultural production and welfare. *Fish physiology and biochemistry* 38(1), 61-83.
- Noble, C., Gismervik, K., Iversen, M. H., Kolarevic, J., Nilsson, J., Stien, L. H., & Turnbull, J. F. (Eds.) (2018). Welfare Indicators for farmed Atlantic salmon: tools for assessing fish welfare. 351pp. ISBN 978-82-8296-556-9
- Perry, S. F., Jonz, M. G., & Gilmour, K. M. (2009). Oxygen sensing and the hypoxic ventilatory response. In: *Fish Physiology*. Vol. 27. Richards, I. J., Farrell, J., Brauner, C. (eds.). Elsevier, London UK. pp. 193–253.
- Rabadan, C. G. (2018). Improving the use of wrasse (*Labridae*) stocked in commercial sea cages with Atlantic salmon (*Salmo salar*) for sea lice control: Key features for a successful deployment. In: Cleaner fish biology and aquaculture applications. Treasurer J. W. (ed.). 5M Publications. Sheffield. pp. 54-68.
- Rimstad, E., Basic, D., Gulla, S., Hjeltne, B. & Mortensen, S. (2017). Risk assessment of fish health associated with the use of cleaner fish in aquaculture. Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare of the Norwegian Scientific Committee for Food and Environment. VKM report 2017:32, ISBN: 978-82-8259-289-5, ISSN: 2535-4019. Norwegian Scientific Committee for Food and Environment (VKM), Oslo, Norway.
- RSPCA (2018a). RSPCA welfare standards for farmed Atlantic salmon. <https://science.rspca.org.uk/sciencegroup/farmanimals/standards/salmon> (Accessed February 2019)
- RSPCA (2018b). RSPCA welfare standards for farmed rainbow trout. <https://science.rspca.org.uk/sciencegroup/farmanimals/standards/trout> (Accessed February 2019)
- Scholz, F., Glosvik, H., & Marcos-López, M. (2018). Cleaner fish health. In: Cleaner fish biology and aquaculture applications. Treasurer J. W. (ed.). 5M Publications. Sheffield. pp. 221–257.
- Shchepak, L. (2011). Effects of different temperatures and salinities on development of fertilized eggs of Ballan wrasse (Master's thesis, Universitetet i Nordland).
- Skiftesvik, A. B., Bjelland, R. M., Durif, C. M., Johansen, I. S., & Browman, H. I. (2013). Delousing of Atlantic salmon (*Salmo salar*) by cultured vs. wild ballan wrasse (*Labrus bergylta*). *Aquaculture*, 402, 113-118.
- Skiftesvik, A. B., Durif, C., & Bjelland, R. M., (2014). Understanding and remediating clumping behaviour. In: Production of ballan wrasse (*Labrus bergylta*). Science and Practice. Oslo: Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF) - The Norwegian Seafood Research Fund p. 70-71.
- Skiftesvik, A. B., Bjelland, R. M., Durif, C., Halvorsen, K. A. T., Sema, S., Fields, D., & Browman, H. (2017). Program rensefisk: Kunstig lys og rensefisk. Rapport fra havforskningen. 16/2017. 43pp.
- Skiftesvik, A. B., Bjelland, R. M., Durif, C., Moltumyr, L., Hjellum, R. B., & Halvorsen, K. A. T. (2018). Program rensefisk: Adferd og artssamspill i laksemerder. Rapport fra havforskningen 33-2018. ISSN 1893-4536 (online). 61pp.
- Soares, S., Green, D. M., Turnbull, J. F., Crumlish, M., & Murray, A. G. (2011). A baseline method for benchmarking mortality losses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) production. *Aquaculture* 314, 7–12.
- Sopinka, N. M., Donaldson, M. R., O'Conner, C. M., Suski, C. D. & Cooke, S. J. (2016) Stress indicators in fish. In: *Biology of stress in fish*. Fish physiology volume 35. Schreck, C. B., Tort, L., Farrell, P. & Brauner, C. J. (eds.). Academic Press, 405-462.
- Stien, L. H., Bracke, M., Folkedal, O., Nilsson, J., Oppedal, F., Torgersen, T., Kittilsen, S., Midtlyng, P. J., Vindas, M. A., Øverli, Ø., & Kristiansen, T. S. (2013). Salmon Welfare Index Model (SWIM 1.0): a semantic model for overall welfare assessment of caged Atlantic salmon: review of the selected welfare indicators and model presentation. *Reviews in Aquaculture* 5, 33-57.
- Stien, L. H., Oppedal, F., & Kristiansen, T. S. (2016). Dødelighetsstatistikk for lakseproduksjon (eng: Mortality statistics for salmon production). In: Risikovurdering norsk fiskeoppdrett 2016. Svåsand, T., Karlsen, Ø., Kvamme, B. O., Stien, L. H., Taranger, G. L., Boxaspen, K.K. (eds.). Havforskningsinstituttet, Fisker og Havet, særnr; 2-2016, 129-134.
- Thorarensen, H., & Farrell, A. P. (2011). The biological requirements for post-smolt Atlantic salmon in closed-containment systems. *Aquaculture* 312(1), 1-14.
- Timmons, M. B., & Ebeling, J. M. (2007). Recirculating Systems. Northeastern Regional Aquaculture Center, Ithaca, NY.
- Treasurer, J. W. (2002). A review of potential pathogens of sea lice and the application of cleaner fish in biological control. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 58(6), 546-558.
- Treasurer, J., & Feledi, T. (2014). The Physical Condition and Welfare of Five Species of Wild-caught Wrasse Stocked under Aquaculture Conditions and when Stocked in Atlantic Salmon, *Salmo salar*, Production Cages. *Journal of the World Aquaculture Society*, 45(2), 213-219.
- Treasurer, J., & Turnbull, T. (2019). Tolerance of lumpfish, *Cyclopterus lumpus*, to freshwater bath treatment for amoebic gill disease, *Neoparamoeba perurans*, infection and efficacy of different treatment regimens. *Journal of the World Aquaculture Society*, 50(1), 42-53.
- Treasurer, J. W., Noble, C., Puvanendran, V., Planellas S. R., & Iversen, M. H. (2018). Cleaner fish welfare. In: Cleaner fish biology and aquaculture applications. Treasurer J. W. (ed.). 5M Publications. Sheffield. pp. 221–257.
- Treasurer, J. W. (2018). Appendix A1. Technical sheet – Ballan wrasse (*Labrus bergylta*). In: Cleaner fish biology and aquaculture applications. Treasurer J. W. (ed.). 5M Publications. Sheffield. pp. 500-501.
- Turnbull, J. F., Bell, A., Adams, C., Bron, J., & Huntingford, F. (2005). Stocking density and welfare of cage farmed Atlantic salmon: application of a multivariate analysis. *Aquaculture* 243(1), 121-132.
- Turnbull, J. F., North, B. P., Ellis, T., Adams, C. E., Bron, J., MacIntyre, C. M., & Huntingford, F. A. (2008). Stocking Density and the Welfare of Farmed Salmonids. In: *Fish Welfare*. Branson, E. J. (ed.). Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.
- Veiseth, E., Fjæra, S. O., Bjerkeng, B., & Skjervold, P. O. (2006). Accelerated recovery of Atlantic salmon (*Salmo salar*) from effects of crowding by swimming. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 144(3), 351-358.
- Virtanen, M. I. (2018). Chronic stress responses of small (<30g) and large (>40g) Ballan wrasse (*Labrus bergylta*). A comparative study of the effect on primary, secondary and tertiary stress responses. Msc in Bioscience, Faculty of Aquaculture and Bioscience, Nord University. 65pp.
- Wedemeyer, G. (1996). Physiology of fish in intensive culture systems. Springer Science & Business Media.

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: BALLAN WRASSE



RENSVEL OWI FACT SHEET SERIES:
AN INTRODUCTION TO OPERATIONAL
AND LABORATORY-BASED WELFARE
INDICATORS FOR LUMPFISH (*Cyclopterus*
lumpus L.)

RENSVEL OWI FACT SHEET SERIES:
AN INTRODUCTION TO OPERATIONAL AND
LABORATORY-BASED WELFARE INDICATORS
FOR LUMPFISH (*Cyclopterus lumpus* L.)



Chris Noble¹, Martin H. Iversen², Ingrid Lein¹, Jelena
Kolarevic¹, Lill-Heidi Johansen¹, Gerd Marit Berge¹, Erik
Burgerhout¹, Velmurugu Puvanendran¹, Atle Mortensen¹,
Anne Stene³ & Åsa M. Espmark¹

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH



Suggested citation: Noble, C., Iversen, M. H., Lein, I., Kolarevic, J. Johansen, L. –H., Berge, G. M., Burgerhout, E., Puvanendran, V., Mortensen, A., Stene, A., & Espmark, Å. M. (2019). RENSVEL OWI FACT SHEET SERIES: An introduction to Operational and Laboratory-based Welfare Indicators for lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.). 46 pp.

ISBN 978-82-8296-591-0

An output of the FHF financed project 901136 «RENSVEL: Velferd hos rensefisk – operative indikatorer»

April 2019

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. If you wish to use previously published work that has been reproduced in this article, you must contact the original copyright holder to seek permission before using that material (source of copyright is listed in relevant figures and tables).

Front cover photo: © Terje Aamodt, Nofima

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

TABLE OF CONTENTS

Introduction	5
Outline of the OWIs and LABWIs covered in this fact sheet series	6
Environment based OWIs	7
Oxygen	8
Temperature	9
CO ₂ /pH	10
Salinity	11
Light	12
Density	13
Turbidity/TSS	14
Total ammonia nitrogen (TAN), Nitrite (NO ₂ ⁻) and Nitrate (NO ₃ ⁻)	15
Water speed	16
Individual based OWIs	17
Epidermal damage	18
Active and healed fin damage	19
Eye damage including cataracts	21
Vertebral deformities	22
Snout and mouth damage	23
Opercular damage	24
Suction disc deformities	25
Gill beat rate	26
Emaciation state	27
Group based OWIs	28
Mortality rate	29
Health status	31
Appetite and growth rate	32
Behaviour	33
Blood in the water	36

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

Physiological LABWIs and OWIs.....	37
Plasma cortisol.....	38
Glucose	39
Osmolality	40
Magnesium	41
Chloride.....	42
References	43

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

INTRODUCTION

Fish welfare, defined by Stien et al., (2013) as the “*quality of life as perceived by the animals themselves*” requires various tools to assess and evaluate it (see e.g. Noble et al., 2018). These tools are termed Welfare Indicators (WIs) and can be classified as either animal or environment based (e.g. Nilsson, Stien, Iversen et al., 2018):

- Animal-based (Direct) indicators – an indicator that is on, or from the fish, applied at either the individual or group level.
- Environment-based (Indirect) indicators – an indicator that is based upon the rearing environment e.g. water quality, various management processes or the farm infrastructure.

WIs that can be used out on the farm are termed Operational Welfare Indicators, or OWIs (e.g. Noble et al., 2012). WIs that are sampled at the farm (either from the animal or the environment it is subjected to) but are then sent to a lab for further analysis are termed Laboratory-based Welfare Indicators, or LABWIs (Nilsson, Stien, Iversen et al., 2018).

Health and welfare are key to the successful rearing and deployment of cleaner fish out on the farms. However, knowledge on their welfare is relatively scarce in relation to other more established farmed species, although attempts are being made to correlate what is available and give an overview of the potential welfare challenges the fish face (e.g. Treasurer et al., 2018).

This fact sheet series will give a brief overview of some of the latest science-based findings and some practical experience with regard to a suite of life-stage and species-specific OWIs and LABWIs for lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.). For each OWI/LABWI we will i) briefly outline the indicator, ii) give a science-based overview of the information we have about it, such as potential risk factors and mitigation strategies that can be linked to it, and either iii) give an overview of some practical knowledge related to the OWI, or iv) address the methods for measuring the OWI/LABWI.

This fact sheet series is an output of the FHF financed project 901136 «RENSVEL: Velferd hos rensefisk – operative indikatorer», led by Nofima and is written in partnership with researchers from Nord University and NTNU. The authors would especially like to thank the reference group of the project (Olav Breck, Mowi ASA; Espen Lie Dahl, SalMar ASA; Kjetil Heggen, Lerøy Seafood Group ASA; Halvard Hovland, Havlandet Marin Yngel AS; Lars Jørgen Ulvan, Nordland leppefisk AS) for all of their guidance and inputs throughout the project.

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

OUTLINE OF THE OWIs AND LABWIs COVERED IN THIS FACT SHEET SERIES

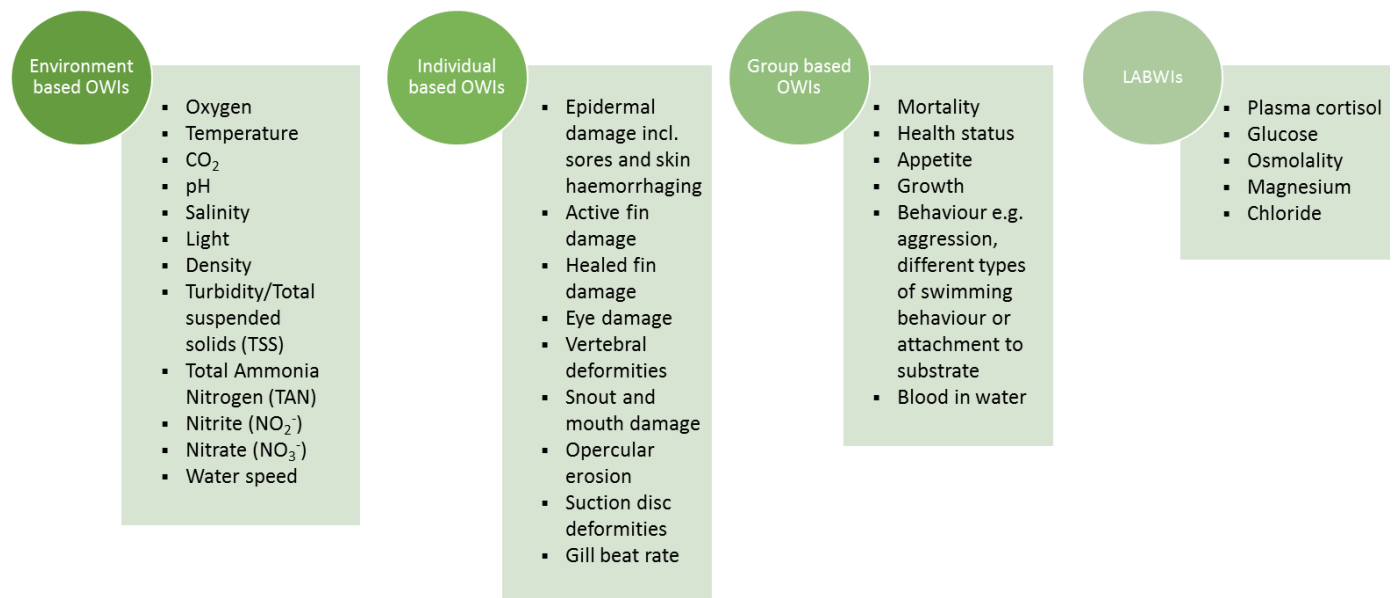


Figure 1: Overview of the OWIs and LABWIs addressed in the RENSVEL OWIs for lumpfish fact sheet series (Figure: Chris Noble, Nofima. Adapted from figures in "Noble, C., Gismervik, K., Iversen, M. H., Kolarevic, J., Nilsson, J., Stien, L. H. & Turnbull, J. F. (Eds.) (2018). Welfare Indicators for farmed Atlantic salmon: tools for assessing fish welfare 351pp." with permission.

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

ENVIRONMENT BASED OWIs

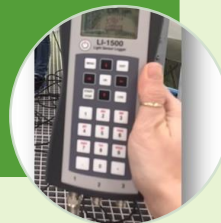
Environment based OWIs are well established indirect welfare indicators for numerous farmed species (Noble et al., 2018; RSPCA 2018a, b; Stien et al., 2013) including cleaner fish (Treasurer et al., 2018). However, there is little published information on environment based OWIs for lumpfish (Jørgensen et al., 2017; Treasurer et al., 2018).



Key Environment based OWIs covered in these Factsheets:

- Oxygen
- Temperature
- CO₂
- pH
- Salinity
- Light
- Density
- Turbidity/Total suspended solids (TSS)
- Total Ammonia Nitrogen (TAN)
- Nitrite (NO₂⁻)
- Nitrate(NO₃⁻)
- Water speed

Environment based OWIs



RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

Oxygen



Oxygen is a critical water quality indicator and levels that are too low can cause welfare problems in numerous fish species including lumpfish (e.g. Jørgensen et al., 2017). Different life stages can also have differing oxygen requirements.

Science based knowledge

- In an experiment where juvenile lumpfish were subjected to Dissolved Oxygen (DO) saturations of 55%, 69%, 81% and 96%, growth was negatively affected at all DO saturations $\leq 81\%$ in comparison to fish held at 96% DO (Jørgensen et al., 2017).
 - DO levels of 55% and 69% also had a detrimental impact upon plasma cortisol levels in comparison to the higher DO saturations.
 - Appetite was also reduced in fish subjected to DO saturations of 55% and 69%.
 - If fish are exposed to hypoxic conditions they can respond by hyperventilating (Perry et al., 2009). Fish exposed to 55% and 69% DO increased their gill beat rate/min by 71% and 60% in comparison to fish held at 96% DO after 1 month exposure to those oxygen levels.
- DO saturation levels and recommendations for differing life stages:
 - Juveniles:
 - $>80\%$ DO saturation (Jørgensen et al., 2017).
 - 80-90% DO saturation (Treasurer et al., 2018).
 - $> 7 \text{ mg/l}$ (RSPCA, 2018a).
 - Adults and broodstock:
 - 80-90% DO saturation (Treasurer et al., 2018).
 - $> 7 \text{ mg/l}$ (RSPCA, 2018a).
- DO saturation levels should be kept at ca. 100% during transport (Jonassen et al., 2018a).
- Increasing DO levels from 100% to 150% during simulated transport studies (8 h transports) did not affect the stress response of the lumpfish (Remen and Jonassen, 2017).

Practical based knowledge

Practical DO saturation levels and recommendations:

- $>90\%$ DO saturation levels during start feeding in RAS (Johannesen et al., 2018a).
- 90-100% saturation during transport (Jonassen et al., 2018a).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

Temperature

Temperature is a key environmental parameter and affects poikilothermic fish in numerous ways (e.g. Jobling, 1997; EFSA, 2008). Temperature preferences and thresholds vary with life stage in lumpfish.



Science based knowledge

Lumpfish are a eurythermal fish that can be found across a wide temperature range, tolerating very low temperatures 0-20 degs (Powell et al., 2018a).

- Juveniles exhibit high ontogenetic variability in their optimal temperature (Jonassen et al., 2018b) and optimum temperatures for marine fish usually decrease as the fish get bigger (e.g. Jobling, 1997).
- Rapid growth during the juvenile phase (which may in part be due to higher temperatures) may be a risk factor for increased prevalence of cataracts (Jonassen et al., 2018b).
- Hvas et al., (2018) also reported qualitative evidence that adult lumpfish held at > 15 °C had more cataracts.
- Both low temperatures (< 4 °C, Imsland et al., 2018a) and high temperatures (18 °C, Hvas et al., 2018) can also increase mortalities.

Life stage	Temperature range	Reference
Juvenile	Optimal temperature = ca. 16 °C in 11-40 g fish 9 – 16 °C	Nytrø et al., (2014) Jonassen et al., (2018b)
Adult	Optimal temperature = ca. 13 °C in 100-110 g fish and ca. 9 °C for 120-200 g fish 6 – 10 °C < 15 °C	Nytrø et al., (2014) Treasurer et al., (2018) Hvas et al., (2018)
Broodstock	8 – 10 °C	Treasurer (2018b)

Practical based knowledge

- Practical based experience on water temperature requirements in relation to life stage:
 - Juvenile fish: < 14 °C (Treasurer et al., 2018).
 - Adult lumpfish can feed down to 4 °C and can be more susceptible to disease when temperatures are greater than 10 °C (Brooker et al., 2018).
- When transferring fish from the hatchery to sea cages, transferring fish from medium (8 °C) to lower temperatures (3 °C) led to more problems than transferring fish from medium (8 °C) to higher temperatures (15 °C) (Jonassen et al., 2018a).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

CO₂/pH

Elevated levels of water-borne CO₂ can be a welfare challenge for numerous fish species (see e.g. Nilsson, Stien, Iversen et al., 2018) as can pH levels that are either too low or high. However, as far as the authors are aware, optimal or critical levels for CO₂ have not been reported (see also Jørgensen et al., 2017) and this is also the same for pH (e.g. Powell et al., 2018a).



Science based knowledge

As stated above, the authors have not found any peer-reviewed published information on the optimal or critical levels for CO₂ and pH in lumpfish (see also Jørgensen et al., 2017; Powell et al., 2018a).

- Simulated transport conditions using either 8 h or 20 h transports, DO levels either 100% to 150%, temperatures either 8 °C or 12 °C, 30 or 60 g fish, 30 kg/m³ or 60 kg/m³ led to CO₂ values in the range of ca. 5 - 8.5 mg/l with no obvious negative effects for 30 g lumpfish (Remen and Jonassen, 2017).

Practical based knowledge

- With regard to CO₂, it has been suggested that the CO₂ tolerances of lumpfish are potentially comparable to other marine species (Treasurer et al., 2018).
- With regard to pH, it has also been suggested that the pH tolerances of lumpfish are potentially comparable to other marine species, and production data has reported pH values in the region 7.3-8.2 (Treasurer et al., 2018).
- Practical experience states that some lumpfish hatcheries maintain pH at ca. 8.1 during start feeding in RAS (Johannesen et al., 2018a).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

Salinity

Lumpfish are generally not found in low salinities in the wild, but certain populations are found in less saline waters (Davenport, 1985; Powell et al., 2018a) and lumpfish can tolerate freshwater exposure (Treasurer and Turnbull, 2019).



Science based knowledge

With regard to freshwater exposure:

- Treasurer and Turnbull (2019) have reported that lumpfish of up to 70 g can tolerate 5 h exposure to freshwater (0 ppt) and a 10 day exposure to brackish water (15 ppt) without any discernable negative effects on their welfare, although fish were less active at 0 ppt in some trials.

Practical based knowledge

- Most hatcheries operate with salinities in the range of 30-35 ppt (Jonassen et al., 2018b). There are some experience based observations that salinities below 32 ppt may increase the risk of cataracts (Jonassen et al., 2016).
- Salinity can be held at ca. 33 ppt during start feeding in RAS (Johannesen et al., 2018a).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

Light

The manipulation of daylength and changes in daylength is a widely used technique for e.g. controlling reproduction and initiating maturation in numerous farmed fish species including lumpfish (Imsland et al., 2018b). However, with regard to cleaner fish, the field is still in its infancy. As far as the authors are aware, there have been little in the way of scientific studies on the effects of light intensity or wavelength upon lumpfish welfare and performance. The limited information that is available will be reported here.



Science based knowledge

- As stated above, as far as the authors are aware, there is little in the way of published information regarding optimal light intensity or wavelength for lumpfish in relation to their welfare.
- Skiftesvik et al., (2017) reported that lumpfish lack eye pigments for red light and do not see it, colliding with tank walls and each other. They were very active under green light and swam more calmly under blue light.
- Results from RENSVEL suggest that in general, it seems that the wavelength of light has a greater effect on welfare than light intensity (Espmark et al., 2019). Results suggest that green light (520 nm wavelength) is more stressful (significantly increases plasma cortisol levels) for lumpfish than blue light (420 nm wavelength) and also increases the frequency of fish with cataracts.
- Cleaner fish detect lice by sight and short days or low light intensities during winter may reduce their lice detection abilities and effectiveness (Skiftesvik et al., 2017).
- Photoperiod manipulation has recently been successfully used to control the timing of maturation and spawning in lumpfish (Imsland et al., 2018b; Imsland et al., 2019a).

Practical based knowledge

- During egg incubation the eggs are usually subjected to low intensity 24 h light as practical experience suggests high light intensity has a negative effect upon larvae quality (Jonassen et al., 2018b).
- It has also been suggested that reduced light intensity can reduce aggression in the tank rearing juvenile phase (Jonassen et al., 2018b).
- There is no clear standardised approach to specific photoperiod lengths during the tank rearing phase. Some farmers utilise a 24:0 LD regime, others may utilise an 18:6 LD regime, with others preferring a 12:12 LD regime (Jonassen et al., 2018b).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

Density

Stocking density is a common OWI but its use can be somewhat problematic as its influence depends on other factors such as water quality, life stage, behavioural interactions, feed management etc., (e.g. Turnbull et al., 2008). Its potential welfare effects must therefore be considered in partnership with other OWIs (see Turnbull et al., 2005).



Science based knowledge

- As stated above, it is a challenge to define optimal or undesirable stocking densities, even in well established aquaculture species due to the number of factors that can influence its ultimate effect. However, it is clear that inappropriate densities (e.g. too high) can be detrimental to fish welfare, especially if they have a negative impact upon e.g. water quality, behavioural interactions or feed access.
- Another aspect to consider is that lumpfish can either be sedentary and sit and rest on the substrate or under shelters (Johannesen et al., 2018a) or can also be quite active swimmers, (Davenport, 1985). Suitable substrates for resting on or around should therefore be provided.
- Treasurer et al., (2018) have suggested a life stage specific “surface area index” for ensuring lumpfish have enough area for settlement would be very valuable.
- Stocking juvenile lumpfish at a density of 60 kg/m³ for eight hours during simulated transport did not appear to have a detrimental impact upon their welfare. Increasing density levels from 30 kg/m³ to 60 kg/m³ did increase plasma cortisol after 4 hours but not after 8 hours (Remen and Jonassen, 2017).
- Other stocking density recommendations:
 - < 80 kg/m³ during transport (RSPCA, 2018a).
- RENSVEL results (Espmark et al., 2019) suggest densities of 15, 30 and 60 kg/m³ did not affect the survival, growth or welfare of juvenile lumpfish. However, plasma cortisol levels were lower at low density and caudal fin damage was more prevalent at low density in relatively small fish (20 g).

Practical based knowledge

- Broodstock: during maturation, stocking density should be < 20 kg/m³ without enrichment and > 20 kg/m³ with enrichment (Puvanendran, personal observations reported in Treasurer et al., 2018).
- Boyce et al., (2018) also suggested that density should be 23-43 kg/m³ after fish reach 100 g in body weight.

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

Turbidity/TSS

Kolarevic, Stien et al., (2018) state *“Turbidity refers to the clarity of the water and TSS refers to the suspended material in the water and while these two parameters are related they are not always highly correlated”*. Turbidity can be influenced by dissolved and suspended solids and the nature of these solids is critical for determining their effect on the fish. High concentrations of suspended solids can lead to reduced dissolved oxygen saturations due to microbial activity and smaller particles can also potentially affect gill function (Timmons and Ebeling, 2007). However, as far as the authors are aware, optimal or critical levels for turbidity or TSS have not been reported for lumpfish.



Science based knowledge

- As stated above, **the authors have not found any peer-reviewed published information on optimal or critical levels for Turbidity and TSS in relation to lumpfish welfare.**
- *Until this information becomes available, we draw the readers attention to the recommendations for TSS drawn up for Atlantic salmon (Thorarensen and Farrell, 2011):*
 - *The upper limit of TSS for Atlantic salmon has been suggested to be ≤ 15 mg/l (Thorarensen and Farrell, 2011).*
- *TSS values for other aquaculture species have been reported as being between 10 and 80 mg/l and are species specific (Timmons and Ebeling, 2007).*

Practical based knowledge

- Practical experience regarding turbidity/TSS suggest increased turbidity and organic matter in RAS can cause an increase in temperature and a reduction in dissolved oxygen and should be monitored.

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

Total ammonia nitrogen (TAN), Nitrite (NO_2^-) and Nitrate (NO_3^-)

Ammonia (NH_3) is a poisonous end product of protein catabolism and referred to as Unionised Ammonia, UIA (Thorarensen and Farrell, 2011) that reacts with water to form ionised ammonium (NH_4^+). The total quantity of NH_3 and NH_4^+ is termed Total Ammonia Nitrogen (TAN). Nitrite (NO_2^-) and nitrate (NO_3^-) can accumulate in water, particularly in cases where water is reused (RAS and/or transport). Nitrite can be toxic for fish, but mainly in freshwater where it competes with chloride uptake in the gills. In seawater the presence of chloride in the water alleviates the adverse effects of nitrite toxicity making it less harmful. Nitrate has been known to be less toxic for some species (for example Atlantic salmon) compared to nitrite. As far as the authors are aware, optimal or critical levels for TAN, nitrite or nitrate have not been reported in cleaner fish.



Science based knowledge

- As stated above, **the authors did not find any peer-reviewed published information on the optimal or critical levels for TAN, nitrite or nitrate in relation to lumpfish welfare.**
- *Until this information becomes available, we draw the readers attention to the conservative recommendations for UIA, nitrite or nitrate that have been drawn up for Atlantic salmon (as reported in Noble et al., 2018):*
 - *Recommendations regarding UIA in Atlantic salmon:*
 - *Short-term exposure (4 hours): $\leq 0.1 \text{ mg/l}$ (Wedemeyer, 1996); long-term exposure: $\leq 0.012 \text{ mg/l}$ (Fivelstad et al., 1995).*
 - *Recommendations regarding nitrite in Atlantic salmon:*
 - *$\leq 0.1 \text{ mg/l}$ (Wedemeyer, 1996; Thorarensen and Farrell, 2011).*
 - *Recommendations regarding nitrate in Atlantic salmon:*
 - *$< 100 \text{ mg/l}$ (Bregnballe, 2010).*

Practical based knowledge

- TAN: $0.004 \pm 0.001 \text{ mg/l}$ during start feeding of lumpfish in RAS (Johannesen et al., 2018a).
- Nitrite: $\text{ca. } 0.2 \pm 0.1 \text{ mg/l}$ during start feeding of lumpfish in RAS (Johannesen et al., 2018a).
- Nitrate: $0.79 \pm 0.12 \text{ mg/l}$ during start feeding of lumpfish in RAS (Johannesen et al., 2018a).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

Water speed

Water speed is a well established indirect OWI (e.g. Kolarevic, Stien et al., 2018). It affects the swimming behaviour of the fish (Nilsson, Stien, Iversen et al., 2018) and its effects can be beneficial e.g. by exercising the fish (e.g. Kolarevic, Stien et al., 2018). However, currents that are too high can exhaust the fish, and force lumpfish up against the wall of the rearing system (see e.g. Powell et al., 2018a).



Science based knowledge

- Lumpfish can be sedentary and sit and rest on the substrate or under shelters (Johannesen et al., 2018a) but they can also be pelagic, covering long distances in the wild (Davenport, 1985). However, swimming is rather restricted in lumpfish irrespective of life stage (Treasurer et al., 2018) and lumpfish have been described by Hvas et al., (2018) as a typical benthic species.
- Lumpfish possess a ventral cartilaginous sucker/disc that is ca. 20% of the body length and is formed by modified pelvic fins. This disc helps the lumpfish attach themselves to substrates and reduces the risk of them being dislodged in e.g. high current conditions (see Powell et al., 2018a and references therein). Lumpfish that use the suction discs to attach to the substrate can tolerate higher water speeds than fish that are swimming (Hvas et al., 2018).
- Lumpfish have a somewhat limited aerobic scope in comparison to e.g. salmon and their critical swimming speeds can range from 1.3 - 1.7 body lengths/second (bl/s) in 300 g fish (Hvas et al., 2018).
 - According to Hvas et al., (2018):
 - 75 g fish had problems remaining attached to surfaces when water current speeds were 80 – 110 cm/s.
 - 300 g fish had problems remaining attached to surfaces when water current speeds were > 70 cm/s.
 - This suggests larger fish had more problems staying attached to the substrate than smaller fish and Hvas et al., (2018) suggested this was associated with drag.

Practical based knowledge

- Lumpfish have been observed to become exhausted and pushed up against the net in high energy farming conditions (Malthe Hvas, personal communication).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

INDIVIDUAL BASED OWIs

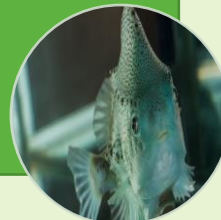
Individual based OWIs including morphological injuries are well established OWIs for numerous farmed species (Noble et al., 2018; RSPCA 2018a, b; Stien et al., 2013) including cleaner fish (Treasurer and Feledi, 2014; Treasurer et al., 2018) and are also applicable at differing lifestages (Treasurer et al., 2018). However, there is very little published information relating to individual based OWIs in lumpfish (Treasurer et al., 2018).



Key Individual based OWIs covered in these Factsheets:

- Sores
- Skin haemorrhaging
- Active fin damage
- Healed fin damage
- Eye damage
- Vertebral deformities
- Snout and mouth damage
- Opercular damage
- Suction disc deformities
- Gill beat rate

Individual
based OWIs



RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

Epidermal damage



Addresses the damage or loss of epidermal tissue, including sores/ulcers and haemorrhaging. The epidermis is a barrier to infection and contains nociceptors. Any skin damage is a well established risk for fish welfare (Noble et al., 2012).

Science based knowledge

Risk factors for sores and skin haemorrhaging:

- Sores/Ulcers:
 - Health related risk factors: *Moritella viscosa*, *Tenacibaculum* spp. (EURL, 2016; Bornø and Gulla, 2017); *Pseudomonas anguilliseptica* (Rimstad et al., 2017); *Gyrodactylus* sp. (Rimstad et al., 2017); Atypical *Aeromonas salmonicida* (Bornø and Gulla, 2017); *Tetramicra brevifilum* (Scholz et al., 2018); *Pasteurella* spp. (Scholz et al., 2018); *Scuticociliate* spp. (Scholz et al., 2018); *Trichodina* spp. (Scholz et al., 2018); *Nucleospora cyclopteri* (Scholz et al., 2018); *Exophilia* spp. (Scholz et al., 2018); VHSv (Scholz et al., 2018).
- Skin haemorrhaging:
 - Health related risk factors: *Aeromonas salmonicida* (Scholz et al., 2018); *Pseudomonas anguilliseptica* (Scholz et al., 2018); *Moritella viscosa* (Scholz et al., 2018); VHSv (Scholz et al., 2018); *Pasteurella* spp. (Scholz et al., 2018; Ellul et al., 2019); *Vibrio anguillarum* (Scholz et al., 2018).
- Skin discolouration:
 - Health related risk factors: *Aeromonas salmonicida* (Scholz et al., 2018); *Vibrio anguillarum* (Scholz et al., 2018); *Trichodina* spp. (Scholz et al., 2018); VHSv (Scholz et al., 2018).
- Epidermal damage has also been observed after transport (Jonassen et al., 2018a) and may be due to physical contact with sharp/hard/rough surfaces (Jonassen et al., 2018a).
- Knotless nets should be used for handling (e.g. Jonassen et al., 2018a).
- Epidermal damage may also be due to net cleaning or other operations (Rimstad et al., 2017).

Practical based knowledge

- Further potential risk factors for sores can be handling at low (< 7 °C) water temperatures (MarinHelse, 2018).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

Active and healed fin damage

Fin damage is a well established welfare issue in lumpfish (Treasurer et al., 2018) as it is damage to live tissue (Ellis et al., 2008) and active fin damage may also be a welfare and health risk due to infection risk via opportunistic pathogens (e.g. Scholz et al., 2018).



Science based knowledge

- Fins susceptible to fin damage include:
 - Caudal, Dorsal, Pectoral, with the caudal fin especially at risk (Treasurer et al., 2018). (Pelvic fin damage is covered in the later suction disc deformity section).
- The drivers for fin damage in lumpfish are unclear (Transport and Handling guidelines, <http://lusedata.no/wp-content/uploads/2012/05/Veileder-for-h%C3%A5ndtering-og-transport-av-rognkjeks-oppdatert-v%C3%A5r-2017.pdf>). However, we do have some clear indication that overt aggression (tail nipping) leads to caudal fin erosion in juvenile fish (Treasurer et al., 2018).
- Caudal fin damage may also emerge as a problem during maturation (Treasurer et al., 2018).
- Density may also be a risk factor for fin damage, as a consequence of potential increased territoriality amongst conspecifics (e.g. suggested in Jonassen et al., 2018b).
- Grading can be a good mitigation strategy for preventing fin damage in juvenile tank rearing before the fish are transferred to sea (Pattillo, undated).
- Active fin damage is also a potential route for opportunistic pathogens such as *Tenacibaculum* spp. (e.g. Jonassen et al., 2018b).
- With regard to health related issues, fin damage can be caused by *Pseudomonas anguilliseptica* (Scholz et al., 2018); *Gyrodactylus* sp. (Rimstad et al., 2017); Atypical *Aeromonas salmonicida* (Bornø and Gulla, 2017); *Pasteurella* spp. (Scholz et al., 2018; Ellul et al., 2019); *Scuticociliate* spp. (Scholz et al., 2018); *Trichodina* spp. (Scholz et al., 2018); *Tenacibaculum* spp. (Scholz et al., 2018); *Vibrio anguillarum* (Scholz et al., 2018); VHSv (Scholz et al., 2018).

Risk factor	Juvenile	Adult	Broodstock	Reference
Aggression	✓	✓		Treasurer et al., 2018
Diseases, stress etc.	✓	✓	✓	Scholz et al., 2018; Sällebrant, 2018
Density	✓		✓	Treasurer et al., 2018; Espmark et al., 2019

Mitigation strategy	Juvenile	Adult	Broodstock	Reference
Environmental enrichment (EE)	✓	✓	✓	Treasurer et al., 2018
Continuous feeding (to reduce aggression)	✓	?	?	Treasurer et al., 2018

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

Active and healed fin damage continued

Practical based knowledge

- Further potential risk factors for fin damage: feeding strategy and feed withdrawal?
- Fin damage has also been observed after transport (Jonassen et al., 2018a).
- Potential mitigation factors for fin damage: improved feed management.

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

Eye damage including cataracts

Eye damage is also a well established welfare threat in fish and can be due to trauma from e.g. handling (see Nilsson, Stien, Iversen et al., 2018). Cataracts (clouding of the lens) can also be a problem in lumpfish (Jonassen et al., 2017; Treasurer et al., 2018).



Science based knowledge

- It has been reported that cataracts can be somewhat unusual in the larvae and juvenile life-stages and more common in the later life-stages (Powell et al., 2018b).
- Potential risk factors and mitigation strategies for eye damage:
 - Risk factor: Poor nutrition, especially in bilateral cataracts (Jonassen et al., 2017).
 - Risk factors: Handling, density, infectious diseases in unilateral cataract formation (suggested by Jonassen et al., 2017).
 - Risk factor: High feeding frequency (4 or 7 days/week) significantly increased the prevalence of cataracts in comparison to 3 days/week (fish fed 2% bw/day on feeding days). A feeding regime that reduced the number of feeding days was used to reduce weekly ration – which was greater in fish fed daily > 4 days > 3 days/week, leading to 35% larger fish in groups fed daily vs 3 days/week (Imsland et al., 2019b).
 - Mitigation strategy: reduce the number of feeding days? (Imsland et al., 2019b).
 - Risk factors for exophthalmos: *Scuticociliate* spp. (Scholz et al., 2018); *Vibrio anguillarum* (Scholz et al., 2018); VHSv (Scholz et al., 2018); *Tetramicra brevifilum* (Scholz et al., 2018).
 - *Pasteurella* spp. can also be a risk factor for cataracts (Dawit, 2015).
 - Handling can be implicated in other forms of eye damage (e.g. Jonassen et al., 2017; Imsland et al., 2019b and references therein).
- *Risk factors in other species: environmental and nutritional factors are key to cataract formation.*

Risk factors	Juvenile	Adult	Broodstock	Reference
Cataracts: Rapid growth?	✓	✓	?	Imsland et al., (2019b)
Cataracts: Feeding regime?	✓	✓	?	Imsland et al., (2019b)
Cataracts: nutritional factors?	✓	✓	✓	Suggested by Jonassen et al., (2017)

Practical based knowledge

- Further potential risk factors for eye damage: abrasion or dessication during handling.
- Potential mitigation factors: gentle handling, knotless nets, limited air exposure, reducing the risk of potential drying of the eye.

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

Vertebral deformities

Vertebral deformities are a well established welfare indicator in fish and can impact upon welfare by e.g. reducing the effectiveness of foraging or swimming behaviour (e.g. Noble et al., 2018 and references therein). However, as far as the authors are aware, there is limited information on vertebral deformities in cleaner fish, e.g. in terms of their aetiology, driving factors, prevalence and severity.



Science based knowledge

Risk factors for vertebral deformities:

- Constant 10 °C egg incubation temperature is a clear risk for increasing the frequency of vertebral deformities in newly hatched larvae (Imsland et al., 2019c).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

Snout and mouth damage

Snout damage can be due to e.g. handling and contact with the sharp edges, hard surfaces or abrasion with the net (see e.g. Gismervik et al., 2018). Mouth damage is also a clear welfare threat as it may hinder feeding and the ingestion of food items (Branson and Turnbull, 2008).



Science based knowledge

Risk factors for snout damage and mouth haemorrhaging:

- Diseases etc: *Tenacibaculum spp.* (Scholz et al., 2018); *Vibrio anguillarum* (Scholz et al., 2018).
- Jaw damage and lesions around the mouth area have also been observed in both juvenile and broodstock lumpfish (Rey and Treasurer, personal communications cited in Treasurer et al., 2018).
- *In other species, it can be due to physical contact with the net, hard surfaces or sharp edges (e.g. Noble et al., 2012).*

Practical based knowledge

- Practical based experience suggests risk factors for snout and mouth damage include startle behaviours leading to collisions with e.g. the net or tank wall.

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

Opercular damage

The opercula have a role in, and contribute to, the buccal pump mechanism and can improve the effectiveness of respiration in fish. Any damage can reduce this effectiveness and may become a welfare challenge, especially if the fish e.g. have gill health problems or are subjected to hypoxic conditions (Ferguson and Speare, 2006).



Science based knowledge

- Opercular damage is a widely used welfare indicator in other species e.g. Atlantic salmon (Noble et al., 2018; RSPCA, 2018a) and is also used as an OWI in lumpfish (e.g. Pooley et al., 2019). However, as far as the authors are aware, there is limited information available on the risk factors that can contribute to opercular damage in lumpfish, or its severity.
- Risk factors for opercular damage in lumpfish:
 - Health related risk factors: *Vibrio anguillarum* can lead to haemorrhaging around the operculum in lumpfish (Marcos-López et al., 2013).
- Risk factors for opercular damage in other species:
 - Opercular damage may also be due to physical damage, poor nutrition or poor rearing conditions (e.g. Eriksen et al., 2007; Nilsson, Stien, Iversen, et al., 2018).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

Suction disc deformities

Lumpfish possess a ventral cartilaginous sucker/disc that is ca. 20% of the body length and is formed by modified pelvic fins. This disc helps the lumpfish attach themselves to substrates and reduces the risk of them being dislodged in e.g. high current conditions (see Powell et al., 2018a and references therein).



Science based knowledge

- Suction disc deformities can prevent or limit how well the fish attach themselves to the substrate.
- This may be problematic for lumpfish in high energy tidal or exposed farming conditions (Treasurer, 2018a).
- Suction disc deformities can be passively diagnosed as present/absent if the fish are having problems attaching themselves to the substrate (Treasurer et al., 2018).
- The severity of the deformities can be diagnosed during manual inspection of the fish - with a deformed suction disc having a gap or break in the margin of the disc (Treasurer et al., 2018).
- **As far as the authors are aware there is no concrete information on drivers or risk factors for suction disc deformity (see also Treasurer et al., 2018).**
- **The effects of suction disc deformities on e.g. survival are also not established (Treasurer, 2018a).**

Practical based knowledge

- It has been observed that small juveniles in poor nutritional condition can develop suction disc deformities (Kousoulaki et al., 2018).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

Gill beat rate

An elevated gill beat rate or ventilation frequency may not always be due to stress or indicate a welfare risk. However, it can indicate low dissolved oxygen saturations or gill problems (Nilsson, Stien, Iversen et al., 2018).



Science based knowledge

- Potentially valuable OWI in slow moving or static fish such as lumpfish (Treasurer et al., 2018).
- Can be a good indicator of hypoxia - If fish are exposed to hypoxic conditions they can respond by hyperventilating (Perry et al., 2009).
- Jørgensen et al., (2017) reported increased gill beat rate at a dissolved oxygen (DO) saturation of $\leq 80\%$.
 - Fish exposed to 55% and 69% DO increased their gill beat rate/min by 71% and 60% in comparison to fish held at 96% DO after 1 month exposure. Gill beat rate was also 11% and 20% greater in fish held at 55% and 69% DO in comparison to those held at 81%.
- Treasurer and Turnbull (2019) have reported that lumpfish of up to 70 g can tolerate 5 h exposure to freshwater (0 ppt) and a 10 day exposure to brackish water (15 ppt) without any discernable negative effects on their welfare, including gill beat rate.

Practical based knowledge

- Another potential risk factor for increased gill beat rate is AGD (Treasurer personal observation, reported in Treasurer et al., 2018).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

Emaciation state

Emaciation is a robust indicator of a welfare challenge in lumpfish (Nilsen et al., 2014; MarinHelse, 2018) and in other species.



Science based knowledge

- Emaciation in lumpfish can be caused by poor nutrition e.g. Kousoulaki et al., (2018) or health related risk factors such as *Pseudomonas anguilliseptica* (Scholz et al., 2018) and *Nucleospora cyclopteri* (Scholz et al., 2018).

Practical based knowledge

- A lumpfish in good condition is normally wider in the ventral buccal cavity region than the head. Emaciated fish become progressively thinner and the head becomes the widest part of the body (MarinHelse, 2018).
- Potential additional risk factors for emaciation can be i) underfeeding/poor feed management in the cage and/or ii) fish being worn out by being deployed on sea localities that are too exposed (MarinHelse, 2018).
- Dominance hierarchies can also lead to poorer competitors being excluded from feeding which can lead to emaciation (MarinHelse, 2018).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

GROUP BASED OWIs

Group based OWIs are also well established OWIs for numerous farmed species (Noble et al., 2018; RSPCA 2018a, b; Stien et al., 2013) including cleaner fish (Treasurer et al., 2018) and are also applicable at differing lifestages (Treasurer et al., 2018).



Key Group based OWIs covered in these Factsheets:

- Mortality
- Health status
- Appetite
- Growth
- Behaviour e.g. aggression, different types of swimming behaviour or attachment to substrate
- Blood in the water

Group based
OWIs



RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

Mortality rate

Mortality rate (especially changes in mortality rate) is a very widely used OWI. If mortality is high or begins to rise it is a clear indicator of a welfare problem. On the other hand, low mortalities do not automatically mean that welfare is good – fish can experience welfare problems that do not lead to mortality (e.g. Nilsson, Stien, Iversen et al., 2018).



Science based knowledge

- Mortality can be used as both a long and short-term OWI in numerous farmed species (e.g. Nilsson, Stien, Iversen et al., 2018; Treasurer et al., 2018).
 - Long term: The total accumulated mortality during a production cycle
 - Short term: Daily, weekly, monthly
- Short-term mortality such as an active increase in mortality rate can be used to identify ongoing welfare risks or potential problems on the farm. Long-term mortality can be used to retrospectively assess potential welfare or health problems in the rearing unit, farm, company or region (see e.g. Nilsson, Stien, Iversen et al., 2018).
- Mortality is benchmarked in a number of other farmed species e.g. Atlantic salmon (Soares et al., 2011; Stien et al., 2016) and this benchmarking, if carried out actively or in real time, can also be used to actively or retrospectively assess or evaluate potential welfare problems.
- **However, there is anecdotal evidence that the carcasses of lumpfish can rapidly decompose in the rearing unit (e.g. Nilsen et al., 2014) which is problematic for obtaining precise data on mortality rates and identifying the causes of mortality (Treasurer et al., 2018).**
- It has also been suggested that dead cleaner fish in sea cages may also be eaten by wild fish as they lay on the net floor (Nilsen et al., 2014).
- We need more information and knowledge on why the cleaner fish die. The cause of death is often multifactorial: e.g. environmental issues/stress, nutritional issues, suboptimal feeding strategies, infections and lack of protective vaccines etc. Another challenge with lumpfish is that multiple (bacterial) pathogens may be found in the same fish.
- Dead fish should be collected as fast as possible. If possible, potential causes of mortality should also be identified and stated and these can be classified according to e.g. the recently published Veileder i Dødfiskkategorisering (Guidance on classifying mortalities) handbook produced by MarinHelse AS (2018).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

Mortality rate continued

Science based knowledge

Risk factors for mortalities:

- Nilsen et al., (2014) carried out a mortality mapping study in 2013 that reported lumpfish mortalities in sea cages were due to: bacterial infections (75%), emaciation (9%), sores/fin erosion (1%), with 14% due to other causes (2% of mortalities were also old/rotten).
- Specific health related risk factors: *Aeromonas salmonicida* (Scholz et al., 2018); *Vibrio anguillarum* (Scholz et al., 2018); *Vibrio ordalli* (MarinHelse, 2018); *Pasteuralla* spp (Scholz et al., 2018; MarinHelse, 2018); *Neoparamoeba perurans* (Scholz et al., 2018); Scuticociliate spp. (Scholz et al., 2018); *Nucleospora cyclopteri* (Scholz et al., 2018); *Exophiala angulospora* (Saraiva et al., 2019); *Flaviviridae* spp. (Skoge et al., 2019).
- Both low temperatures (< 4 °C, Imsland et al., 2018a) and high temperatures (18 °C, Hvas et al., 2018) can also increase mortalities.

Practical based knowledge

- High mortalities after cage deployment can also be related to handling or due to chemical or mechanical de-licing practices (e.g. Kousoulaki et al., 2018).
- Mortalities may also be due to net cleaning, delicing baths or other operations (Rimstad et al., 2017; MarinHelse, 2018).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

Health status

Health has a major impact upon fish welfare and health status is a commonly used welfare indicator. In certain situations health problems can be diagnosed on the farm (OWIs) and other require samples from the fish to be sent to a laboratory for further diagnostics (LABWIs), see Nilsson, Stien, Iversen et al., (2018).



Science based knowledge

- The health status of lumpfish is regularly monitored by the farmer and internal or external fish health personnel. If a potential health problem is noticed and identified, the response time to the challenge can be much more rapid. A rapid response time is key as it has been previously reported that the majority of lumpfish mortalities can be related to health problems (Nilsen et al., 2014).
- Nilsson, Stien and Iversen et al., (2018) suggest detailed health plans are a good resource based WI. They also state *“While frequent treatments may indicate poor disease control and a welfare problem they can also indicate an effective monitoring and response to disease problems they therefore have to be considered in context”*.
- The impacts of infectious diseases on certain OWIs such as epidermal damage, eye damage, behaviour, appetite and mortality are addressed in each relevant OWI factsheet in this series.
- Numerous reviews and risk assessments also give a good overview of the overall health impacts (and welfare risks) posed by cleaner fish pathogens (e.g. Rimstad et al., 2017; Scholz et al., 2018) and will not be covered in these factsheets.

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

Appetite and growth rate



A drop or sudden loss of appetite, or a poor feeding response can be due to stress (Huntingford and Kadri, 2014). Good monitoring of appetite and the feeding response of lumpfish can help the farmer identify any potential welfare problems as soon as possible (Treasurer et al., 2018). The same applies to growth rate: if farmers notice a sudden change or drop in growth rate, it may be due to a welfare problem (e.g. Nilsson, Stien, Iversen et al., 2018). On the other hand, rapid growth is not necessarily an indicator for good welfare in lumpfish as feed with a high fat content can not only lead to rapid growth but can lead to more fat in the liver, which may have consequences for fish health (Gerd M. Berge, pers. comm).

Science based knowledge

Appetite:

- Well established OWI in numerous fish species (e.g. Huntingford and Kadri, 2014; Noble et al., 2018; Treasurer et al., 2018). Usually used as a qualitative OWI as quantifying appetite can be difficult due to variability in appetite and the feeding response on a potentially hourly or daily basis (Treasurer et al., 2018).
- However, a drop in or lack of appetite may not just be due to a potential problem. For example, it may be because fish have just eaten and are satiated. It may also be related to environmental factors, such as water temperatures that are too low (Treasurer et al., 2018) or the life stage of the fish e.g. appetite suppression as the fish mature (Davenport, 1985).
- A drop in appetite can be an indicator for potential health problems including *Aeromonas salmonicida* (Scholz et al., 2018); *Vibrio anguillarum* (Scholz et al., 2018); *Tenacibaculum* spp. (Scholz et al., 2018); *Tetramicra brevifilum* (Scholz et al., 2018).
- Long term appetite problems lead to emaciation (see earlier section of this factsheet).
- The presence of feed in the intestine is an indicator that the fish have recently eaten (although this is dependent on fish size and temperature). This check can be carried out during auditing of recently euthanised fish (e.g. Kolarevic, Stien et al., 2018) and its presence/absence is already monitored in vaccine control protocols (e.g. by PHARMAQ, as outlined in Haugland et al., 2018).
- Jørgensen et al., (2017) have reported reduced appetite in fish subjected to DO saturations $\leq 80\%$.

Growth and growth rate:

- Growth and growth rate are fundamentally connected with feeding, appetite and the nutritional status of the fish (Nilsson, Stien, Iversen et al., 2018) and can be a reflection of problems associated with these factors.
- Has been used as an OWI for lumpfish (Jørgensen et al., 2017).
- Requires good growth monitoring practices in order to be a robust, quantifiable OWI.
- As with appetite, poor growth may not just be linked to poor welfare *per se*, as longer term changes in growth rate may be linked to e.g. season or the life stage of the fish (Treasurer et al., 2018). To help identify whether poor growth is due to a welfare challenge, it should be coupled with other OWIs (Ellis et al., 2002)
- Size variation with the group may reflect feed access and can also be used as an OWI for lumpfish (Treasurer et al., 2018).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

Behaviour

Fish behaviour is a central OWI tool in the OWI toolbox (see Nilsson, Stien, Iversen et al., 2018). Potential behavioural OWIs suitable for lumpfish include aggression, different types of swimming behaviour and also tank distribution or attachment to the substrate (Treasurer et al., 2018).



Science based knowledge

General information regarding lumpfish swimming behaviour and attachment to the substrate:

- Lumpfish can be sedentary and sit and rest on the substrate or under shelters (Johannesen et al., 2018a) but they can also be pelagic, covering long distances in the wild (Davenport, 1985).
- It has been suggested that lumpfish can be classified as proactive or reactive (Johannesen et al., 2018a)
 - Proactive fish exhibit escape behaviours when exposed to a potentially threatening stimuli, reactive fish do not respond or freeze (Johannesen et al., 2018a).
- Lumpfish can also switch between 'sit and wait' or more active foraging in relation to feed abundance. For example, when food is plentiful they spend more time attached to the substrate but exhibit more active foraging behaviour when food is sparse (Killen et al., 2007).
- Swimming is rather restricted in lumpfish irrespective of life stage (Treasurer et al., 2018).
- Temperatures near or above their thermal threshold can lead to somewhat chaotic swimming, elevated swimming speeds, and increased breaking of the water surface with their head during swimming (Hvas et al., 2018).
- Lumpfish can be active foragers during start feeding (Brown et al., 1992).
- Juveniles have a somewhat restricted aerobic capacity and do need sufficient surface area to attach to substrates. If this surface area is not available, fish can resort to aggression. Juveniles become more pelagic as they grow, and can swim individually, in loose groups or school (Jonassen et al., 2018a).
- Treasurer et al., (2018) have suggested that a life stage specific "surface area index" for ensuring lumpfish have enough area for settlement would be very valuable.

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

Behaviour continued

Science based knowledge cont.

Aggression in the tank rearing phases:

- Aggression is common in juvenile lumpfish especially during the first 3 months after hatching (Treasurer et al., 2018) and cannibalism has also been reported (Brooker et al., 2018).
- Lumpfish can be territorial and can form feeding hierarchies. This may lead to the exclusion of poorer competitors to the tank walls or substrate. Potential lost feeding opportunities both for poorer competitors as well as more dominant fish (due to increased energy expenditure during dominant behaviours and increased swimming activity) can exacerbate potential size differences between individuals (Jonassen et al., 2018a).
- Aggression due to the formation of size hierarchies can be reduced by size grading (Jonassen et al., 2018a) and also improved feed management such as continuous feeding (Treasurer et al., 2018). However continuous feeding combined with environmental enrichment can have a potentially negative effect upon welfare if the feeding method and deployment of the shelter are not given due consideration (Johannesen et al., 2018b).
- Aggression has also been observed in broodstock during maturation (Treasurer et al., 2018).
- It has also been suggested that reduced light intensity can reduce aggression (Jonassen et al., 2018a).
- Aggression can be mitigated against using environmental enrichment (Treasurer et al., 2018).

Health impacts upon behaviour:

- Lethargy can be due to *Aeromonas salmonicida* (Scholz et al., 2018); *Tenacibaculum spp.* (Scholz et al., 2018); *Vibrio anguillarum* (Scholz et al., 2018); *Tetramicra brevifilum* (Scholz et al., 2018); *Trichodina spp.* (Scholz et al., 2018).
- Erratic behaviour near the surface can be due to *Nucleospora cyclopteri* (Scholz et al., 2018).

Behaviour during sea cage deployment:

- The duoculture of lumpfish with salmon can make the lumpfish more active, spending less time resting (Imsland et al., 2014; Powell et al., 2018b).
- Little overt hostile behaviour between the species has been observed (Imsland et al., 2014).
- Imsland and Reynolds, (2018) suggest cage held lumpfish can exhibit the following behaviours: i) resting, ii) hovering, iii) swimming along the net, iv) swimming amongst the salmon, v) salmon inspection behaviours, vi) salmon cleaning behaviours and vii) shoaling, amongst others.
- Active daytime foragers (can spend >50% of their time searching for food, Imsland et al., 2014) and are more restful at night (Imsland and Reynolds, 2018; Powell et al., 2018b).
- However, lumpfish generally spend a lot of time in shallower waters (can spend 80% of their time at depths < 10 m, Leclercq et al., 2018), which may be problematic in terms of their potential lice eating efficacy if the salmon swim deeper (e.g. Skiftesvik et al., 2018).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

Behaviour continued

Practical based knowledge

- Juvenile tank reared lumpfish like shade and will attach to any available substrate in shaded areas. Staff should be careful to reduce the risk of overly dense 'clumping' of the fish (e.g. Jonassen et al., 2018b).
- It has been suggested that bright tank colours may reduce lumpfish settlement and attachment. Juvenile lumpfish may avoid attaching to white tank bottoms which may in turn aid tank cleaning (see Jonassen et al., 2018b).
- Lumpfish subjected to feed withdrawal may become more aggressive. This can be mitigated against by keeping the fish in reduced light/total darkness during fasting before transport (e.g. Jonassen et al., 2018a).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

Blood in the water



Blood in the water has been suggested as a potential OWI for Atlantic salmon by Nilsson, Stien, Iversen et al., (2018) and may also be an OWI for lumpfish. It is usually due to damage to the skin or gills and “red water” is evidence that the fish is injured.

Science based knowledge

- This OWI is manually and qualitatively diagnosed.
- Can be clearly diagnosed if the fish are in light coloured closed containers (Nilsson, Stien, Iversen et al., 2018) or if the water outflow from a pipe or tank is monitored.
- Is a rapid indicator of an acute or ongoing welfare problem, but its cause or severity cannot be diagnosed without a more detailed investigation of the problem (Nilsson, Stien, Iversen et al., 2018).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

PHYSIOLOGICAL LABWIs and OWIs



Physiological LABWIs and OWIs are often used to document stress-related loads and challenges in numerous species (e.g. Noble et al., 2018) including cleaner fish (Treasurer et al., 2018).

Key Physiological LABWIs and OWIs covered in these Factsheets:

- Plasma cortisol
- Glucose
- Osmolality
- Magnesium
- Chloride

Physiological
LABWIs and
OWIs



RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

Plasma cortisol



Plasma cortisol is widely used as an indicator of the primary stress response in fish (Barton and Iwama, 1991). Elevated levels of plasma cortisol are widely accepted to be linked to negative experiences in fish, although its association with positive situations should not be overlooked (Ellis et al., 2012).

Science based knowledge

- Plasma cortisol levels can be assessed using i) enzyme-linked immunoassay (ELISA) or ii) radioimmunoassay (RIA) methods (Sopinka et al., 2016) and is therefore classified as a LABWI.
- The acute stress profile of lumpfish has a peak that is 4-6 times lower than the associated stress profile of ballan wrasse (Treasurer et al., 2018; Espmark et al., 2019) and other species such as salmonids (Hvas et al., 2018).
- Resting basal plasma cortisol levels in an unstressed lumpfish are < 20 nmol/l, whilst chronically stressed lumpfish often have cortisol levels well above 30 nmol/l (Sällebrant, 2018; Espmark et al., 2019).
- Jørgensen et al., (2017) suggest plasma cortisol levels in unstressed fish are < 10 ng/mL and levels in stressed fish are > 20 ng/mL. DO saturations of 55% and 69% led to plasma cortisol levels > 20 ng/mL, whilst DO saturation 81% and above were around 10 ng/mL and below.
- Small lumpfish (< 20g) seem to handle stress better than larger lumpfish (> 100g) (Sällebrant, 2018; Espmark et al., 2019)
- Exposing lumpfish to a daily stressor (lowering the water level, 264 kg/m³) will after 14 - 21 days lead to a chronic stress load that will adversely affect welfare (Sällebrant, 2018; Espmark et al., 2019).

Strengths and weaknesses of the LABWI

- If plasma cortisol levels are sampled before, during and after a routine or operation, they can give the user good, robust information on how that routine affects the fish (Barton, 2002).
- Can be difficult to interpret the samples (especially if limited or single samples are taken) and one should not interpret high levels of plasma cortisol as an indicator of reduced welfare without further information (Nilsson, Stien and Iversen et al., 2018).
- Analysis can be somewhat time consuming (taking at least 1-2 days).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

Glucose



Increased concentrations of plasma cortisol promote glycogenolysis, where tissue stores of glycogen are converted into glucose and discharged into the blood (Barton and Iwama, 1991).

Science based knowledge

- Elevated glucose levels have been widely used as a stress indicator in fish (Barton and Iwama, 1991) but as they can be impacted upon by various other factors such as feed ingredients, satiation levels etc., glucose levels not be benchmarked against a “standard level”, but measured e.g. before, during and after an operation (Nilsson, Stien, Iversen et al., 2018).
- As for cortisol, lumpfish do not show high levels of glucose in the blood during and after exposure to a stressor as compared to e.g. salmon (Treasurer et al., 2018).
- Neither acute nor chronic stress seem to affect glucose levels in lumpfish (Hvas et al., 2018; Sällebrant, 2018; Espmark et al., 2019).

Strengths and weaknesses of the OWI

- Easily accessible hand-held instruments are a validated and inexpensive tool for monitoring plasma glucose levels (Sopinka et al., 2016) and are both robust and easy to use out on the farm. Glucose is therefore classified as an OWI.
- It is difficult to interpret the samples (especially if limited or single samples are taken) and one should not interpret high levels of plasma glucose as an indicator of reduced welfare without further information, as levels can be affected by numerous other factors (Nilsson, Stien and Iversen et al., 2018).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

Osmolality

Deviations in plasma osmolality are elements of the the secondary stress response in fish (Veiseth et al., 2006). Nilsson, Stien, Iversen et al., (2018) defined osmolality as “the number of dissolved particles in liquid, and salinity represents the amount of dissolved salt in water. Freshwater has a salinity of 0 ‰ and an osmolality of 0-10 mOsm kg⁻¹, whilst seawater has a salinity of 33-35 ‰ and an osmolality of 1000 mOsm kg⁻¹.”



Science based knowledge

- According to the results of the RENSVEL project unstressed lumpfish have an osmolality that is around 350-360 mOsm / kg (Sällebrant, 2018; Espmark et al., 2019).
- Osmolality also appears to increase during both acute and chronic stress exposure and is most pronounced in small lumpfish (< 20g) (Sällebrant, 2018; Espmark et al., 2019).
- However, Hvas et al., (2018) reported no significant effect of acture stressor exposure on osmolality levels in 300 g lumpfish (unstressed lumpfish had an osmolality level of 374 ± 5, stressed fish exposed to an 8 minute chase protocol had levels of 369 ± 1 and 1-3 hours after stressor exposure levels were around 360 mOsm / kg, mean ± SEM).

Strengths and weaknesses of the LABWI

- Fluctuations in osmolality are a good way to assess the acute stress response (Sopinka et al., 2016).
- It is difficult to interpret the samples in relation chronic stress exposure without further information as osmolality levels can be infuenced by numerous other factors (Sopinka et al., 2016).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

Magnesium



Secondary stress responses cause changes to plasma and tissue ions, such as magnesium and chloride (Treasurer et al., 2018).

Science based knowledge

- Results from RENSVEL suggest an unstressed lumpfish has a plasma magnesium level < 1.5 mmol/L (Sällebrant, 2018; Espmark et al., 2019).
- Plasma magnesium levels also appear to increase during both acute and chronic stress exposure and are a good indicator of disturbed ion balance under stress. There is also a good correlation between levels of plasma cortisol and magnesium (Sällebrant, 2018; Espmark et al., 2019).

Strengths and weaknesses of the LABWI

- Fluctuations in plasma magnesium levels are a good way to assess the acute stress response (Sopinka et al., 2016; Espmark et al., 2019).
- However, it is difficult to interpret the samples in relation to chronic stress exposure without further information as plasma magnesium levels can be influenced by numerous other factors (Sopinka et al., 2016).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

Chloride



Secondary stress responses cause changes to plasma and tissue ions, such as magnesium and chloride (Treasurer et al., 2018).

Science based knowledge

- Results from RENSVEL suggest an unstressed lumpfish has a plasma chloride level that is ca. 150 mmol/L (Sällebrant, 2018).
- Plasma chloride levels also appear to increase during both acute and chronic stress exposure and are a good indicator of disturbed ion balance under stress (Sällebrant, 2018; Espmark et al., 2019).
- However, Hvas et al., (2018) reported plasma chloride levels significantly decreased in 300g lumpfish during and after exposure to a stressor. Unstressed lumpfish had a chloride level of 161 ± 2 , stressed fish exposed to an 8 minute chase protocol had significantly reduced levels of 155 ± 1 and 1-3 hours after stressor exposure chloride levels were again significantly reduced around 148 ± 1 , mmol/l (mean $\pm$ SEM). The authors suggested this decrease was due to active acid-base compensations (Evans et al., 2005).

Strengths and weaknesses of the LABWI

- Fluctuations in plasma chloride levels are a good way to assess the acute stress response (Sopinka et al., 2016; Espmark et al., 2019).
- However, it is difficult to interpret the samples in relation to chronic stress exposure without further information as plasma chloride levels can be influenced by numerous other factors (Sopinka et al., 2016).

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

REFERENCES

- Barton, B. A. (2002). Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology* 42, 517-525.
- Barton B. A., & Iwama, G. K. (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases* 1, 3-26.
- Bornø G., & Gulla S. (2017). Chapter 10: The health situation in cleaner fish. In: Hjeltnes, B., Walde, C., Bang Jensen, B., Haukas A. (Eds). *The Health Situation in Norwegian Aquaculture*. Norwegian Veterinary Institute 2017. 117-122.
- Boyce, D., Ang, K.P., & Prickett, R. (2018). Cunner and Lumpfish as cleaner fish species in Canada. In: *Cleaner fish biology and aquaculture applications*. Treasurer J. W. (ed.). 5M Publications. Sheffield. pp. 444-467.
- Branson, E. J., & Turnbull, T. (2008). Welfare and deformities in fish. In: *Fish welfare*. Branson, E. J. (ed) Blackwell, Oxford. pp. 202-216
- Bregnballe, J. (2010). A guide to recirculation aquaculture. Copenhagen, Denmark: Eurofish
- Brooker, A. J., Papadopoulos, A., Gutierrez, C., Rey, S., Davie, A., & Migaud, H. (2018). Sustainable production and use of cleaner fish for the biological control of sea lice: recent advances and current challenges. *Veterinary Record*, 183.
- Brown, J. A., Somerton, D. C., Methven, D. A., & Watkins, J. R. (1992). Recent advances in lumpfish *Cyclopterus lumpus* and ocean pout *Macrozoarces americanus* larviculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 23(4), 271-276.
- Davenport, J. (1985). Synopsis of biological data of the lumpsucker *Cyclopterus lumpus* (L. 1758). *FAO Fisheries synopsis No. 147*. (31 pp.).
- Dawit, B. G. (2015). Adaptive Humoral Immune Response in Lumpfish, *Cyclopterus lumpus* L (Master's thesis, The University of Bergen). 111pp.
- EFSA, (2008). Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare on a request from the European Commission on Animal welfare aspects of husbandry systems for farmed Atlantic salmon. *The EFSA Journal* 736, 1-31.
- Ellis, T., North, B., Scott, A. P., Bromage, N. R., Porter, M., & Gadd, D. (2002). The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. *Journal of Fish Biology* 61(3), 493-531.
- Ellis, T., Oidtmann, B., St-Hilaire, S., Turbull, J. F., North, B. P., MacIntyre, C. M., Nikolaidis, J., Hoyle, I., Kestin, S. C., & Knowles, T. G. (2008). Fin erosion in farmed fish. In: *Fish welfare*. Branson E. J. (ed.). Blackwell Publishing. pp. 121-149.
- Ellis, T., Yildiz, H. Y., López-Olmeda, J., Spedicato, M. T., Tort, L., Øverli, Ø., & Martins, C. I. (2012). Cortisol and finfish welfare. *Fish physiology and biochemistry*, 38(1), 163-188.
- Ellul, R. M., Walde, C., Haugland, G. T., Wergeland, H., & Rønneseth, A. (2019). Pathogenicity of *Pasteurella* sp. in lumpsuckers (*Cyclopterus lumpus* L.). *Journal of fish diseases*, 42(1), 35-46.
- Evans, D. H., Piermarini, P. M., & Choe, K. P. (2005). The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological reviews*, 85(1), 97-177.
- Eriksen, M. S., Espmark, Å., Braastad, B. O., Salte, R., & Bakken, M. (2007). Long-term effects of maternal cortisol exposure and mild hyperthermia during embryogeny on survival, growth and morphological anomalies in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* offspring. *Journal of Fish Biology* 70, 462-473.
- Espmark, Å. M., Noble, C., Kolarevic, J., Berge, G. M., Aas, G. H., Tuene, S., Iversen, M. H., Wergeland, H., Johansen, L. -H., Burgerhout, E., Gjerde, B., & Lein, I. (2019). Velferd hos rensefisk – operative velferdsindikatorer (OVI) – RENSVEL. Nofima report 12/2019. ISBN 978-82-8296-589-7.
- European Union Reference Laboratory for Fish Diseases (2016). Cleaner fish in Aquaculture: Health management and legislative issues. 35p. December 2016. <http://www.eurl-fish.eu/-/media/Sites/EURL-FISH/english/reports/Scientific-meeting-report-on-cleaner-fish-in-aquaculture.ashx?la=da&hash=A769E28EE3E7035F7DAB44C421659A69905A4328> accessed 26th March 2019.
- Ferguson, H. W., & Speare, D. J. (2006). Gills and Pseudobranchs. In: *Systemic Pathology of Fish: A Text and Atlas of Normal Tissues in Teleosts and their Responses in Disease*. Ferguson, H. W. (ed). Scotian Press, London. 25-63.
- Fivelstad, S., Schwarz, J., Strømsnes, H., & Olsen, A. B. (1995). Sublethal effects and safe levels of ammonia in seawater for Atlantic salmon postsmolts (*Salmo salar* L.). *Aquacultural Engineering* 14(3), 271-280.
- Gismervik, K., Turnbull, J. F., Nielsen, K. V., Iversen, M. H., Nilsson, J., Espmark, Å. M., Mejdell, C. M., Sæther, B.-S., Stien, L. H., Izquierdo-Gomez, D., Kolarevic, J., Midling, K. Ø., Ellingsen, K., & Noble, C. (2018). Welfare Indicators for farmed Atlantic salmon: Part C – fit for purpose OWIs for different routines and operations. In: Noble, C., Gismervik, K., Iversen, M. H., Kolarevic, J., Nilsson, J., Stien, L. H. & Turnbull, J. F. (Eds.) (2018). *Welfare Indicators for farmed Atlantic salmon: tools for assessing fish welfare*. 351pp. ISBN 978-82-8296-556-9. pp. 238-351.
- Haugland, G. T., Rønneseth, A., & Wergeland, H. I. (2018). Immunology and vaccinology of lumpfish and wrasse. In: *Cleaner fish biology and aquaculture applications*. Treasurer J. W. (ed.). 5M Publications. Sheffield. pp. 258-280.
- Huntingford, F. A., & Kadri, S. (2014). Defining, assessing and promoting the welfare of farmed fish. *Revue Scientifique et Technique-office international des Epizooties*, 33(1), 233-244.
- Hvas, M., Folkedal, O., Imsland, A., & Oppedal, F. (2018). Metabolic rates, swimming capabilities, thermal niche and stress response of the lumpfish, *Cyclopterus lumpus*. *Biology open*, 7(9), bio036079.
- Imsland, A. K., & Reynolds, P. (2018). Lumpfish deployment on salmon farms. In: *Cleaner fish biology and aquaculture applications*. Treasurer J. W. (ed.). 5M Publications. Sheffield. pp. 151-175.
- Imsland, A. K., Reynolds, P., Eliassen, G., Hangstad, T. A., Nytrø, A. V., Foss, A., Vikingstad, E., & Elvegård, T. A. (2014). Notes on the behaviour of lumpfish in sea pens with and without Atlantic salmon present. *Journal of ethology*, 32(2), 117-122.
- Imsland, A. K. D., Hanssen, A., Nytrø, A. V., Reynolds, P., Jonassen, T. M., Hangstad, T. A., Elvegård, T. A., Urskog, T. C., & Mikalsen, B. (2018a). It works! Lumpfish can significantly lower sea lice infestation in large-scale salmon farming. *Biology open*, 7(9), bio036301.
- Imsland, A. K., Jonassen, T. M., Hangstad, T. A., Stefansson, S. O., Elvegård, T. A., Lemmens, S. C., Urskog, T. C., Nytrø, A. V., & Reynolds, P. (2018b). The effect of continuous light and compressed photoperiods on growth and maturation in lumpfish *Cyclopterus lumpus*. *Aquaculture*, 485, 166-172.
- Imsland, A. K., Hangstad, T. A., Jonassen, T. M., Stefansson, S. O., Nilsen, T. O., Hovgaard, P., Elvegård, T. A., Lindberg, K. S., Mikalsen, B., Urskog, T. C., & Norberg, B. (2019a). The use of photoperiods to provide year round spawning in lumpfish *Cyclopterus lumpus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 228, 62-70.
- Imsland, A. K., Reynolds, P., Jonassen, T. M., Hangstad, T. A., Elvegård, T. A., Urskog, T. C., Hanssen, A., & Mikalsen, B. (2019b). Effects of different feeding frequencies on growth, cataract development and histopathology of lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.). *Aquaculture*, 501, 161-168.
- Imsland, A. K. D., Danielsen, M., Jonassen, T. M., Hangstad, T. A., & Falk-Petersen, I. B. (2019c). Effect of incubation temperature on eggs and larvae of lumpfish (*Cyclopterus lumpus*). *Aquaculture*, 498, 217-222.

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

- Jobling, M. (1997). Temperature and growth: modulation of growth rate via temperature change. In: Global Warming: Implications for Freshwater and Marine Fish. Wood C. M. and McDonald D. G. (eds.). Cambridge University Press, Cambridge, pp. 225–254.
- Johannesen, Á., Arge, R., & Eliassen, K. (2018a). Rearing, farm application, and behaviour of lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) in the Faroes. In: Cleaner fish biology and aquaculture applications. Treasurer J. W. (ed.). 5M Publications. Sheffield. pp. 429–443.
- Johannesen, A., Joensen, N. E., & Magnussen, E. (2018b). Shelters can negatively affect growth and welfare in lumpfish if feed is delivered continuously. *PeerJ*, 6, e4837.
- Jonassen, T., Hamadi, M., & Imsland, A. K. (2016). Kartlegging av katarakt hos rognkjeks i oppdrett. Aqua Kompetanse AS og Akvaplan-niva AS, Nyhetsbrev, 09.06.2016.
<https://www.fhf.no/prosjektdetaljer/?projectNumber=901152&fileurl=https%3a%2f%2ffhfno.sharepoint.com%2fsites%2fpdb%2fPublisertedokumenter%2f237763Nyhetsbrev%2c+Katarakt+hos+rognkjeks.pdf.PDF&filename=Popul%3a%a6rformidling%3a+Kartlegging+av+katarakt+hos+rognkjeks+i+op+pdrett>
- Jonassen, T., Hamadi, M., Remø, S. C., & Waagbø, R. (2017). An epidemiological study of cataracts in wild and farmed lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) and the relation to nutrition. *Journal of fish diseases*, 40(12), 1903–1914.
- Jonassen, T. M., Remen, M., Lekva, A., Árnason, T., & Steinarsson, A. (2018a). Transport of lumpfish and wrasse. In: Cleaner fish biology and aquaculture applications. Treasurer J. W. (ed.). 5M Publications. Sheffield. pp. 313–329.
- Jonassen, T. M., Lein, I., & Nytrø, A. V. (2018b). Hatchery management of lumpfish. In: Cleaner fish biology and aquaculture applications. Treasurer J. W. (ed.). 5M Publications. Sheffield. pp. 122–146.
- Jørgensen, E. H., Haatuft, A., Puvanendran, V., & Mortensen, A. (2017). Effects of reduced water exchange rate and oxygen saturation on growth and stress indicators of juvenile lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) in aquaculture. *Aquaculture*, 474, 26–33.
- Killen, S. S., Brown, J. A., & Gamperl, A. K. (2007). The effect of prey density on foraging mode selection in juvenile lumpfish: balancing food intake with the metabolic cost of foraging. *Journal of animal ecology*, 76(4), 814–825.
- Kolarevic, J., Stien, L. H., Espmark, Å. M., Izquierdo-Gomez, D., Sæther, B. S., Nilsson, J., Oppedal, F., Wright, D. W., Nielsen, K. V., Gismervik, K., Iversen, M. H., Turnbull, J. F., & Noble, C. (2018). Welfare Indicators for farmed Atlantic salmon: Part B—Fit for Purpose OWIs for different production systems. In: Noble, C., Gismervik, K., Iversen, M. H., Kolarevic, J., Nilsson, J., Stien, L. H. & Turnbull, J. F. (Eds.) (2018). Welfare Indicators for farmed Atlantic salmon: tools for assessing fish welfare. 351pp. ISBN 978-82-8296-556-9. pp. 146–237.
- Kousoulaki, K., Migaud, H., & Davie, A. (2018). Cleaner fish species nutrition and feeding practices. In: Cleaner fish biology and aquaculture applications. Treasurer J. W. (ed.). 5M Publications. Sheffield. pp. 179–196.
- Leclercq, E., Zerafa, B., Brooker, A. J., Davie, A., & Migaud, H. (2018). Application of passive-acoustic telemetry to explore the behaviour of ballan wrasse (*Labrus bergylta*) and lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) in commercial Scottish salmon sea-pens. *Aquaculture*, 495, 1–12.
- Marcos-López, M., Donald, K., Staggs, H., & McCarthy, U. (2013). Clinical *Vibrio anguillarum* infection in lumpsucker *Cyclopterus lumpus* in Scotland. *Veterinary Record*, 173(13), 319–319.
- MarinHelse (2018). Veileder i Dødfiskkategorisering. 101pp. Developed by MarinHelse AS, Tromsø. <https://www.marinhelse.no/produkter/veileder-dodfiskkategorisering/>
- Nilsen, A., Viljugrein, H., Røsæg, M. V., & Colquhoun, D. (2014). Rensefiskhelse – kartlegging av dødelighet og dødelighetsårsaker. Veterinærinstituttets rapportserie 12-2014, 84pp.
- Nilsson, J., Stien, L. H., Iversen, M. H., Kristiansen, T. S., Torgersen, T., Oppedal, F., Folkedal, O., Hvas, M., Gismervik, K., Ellingsen, K., Nielsen, K. V., Mejdell, C. M., Kolarevic, J., Izquierdo-Gomez, D., Sæther, B.-S., Espmark, Å. M., Midling, K. Ø., Roth, B., Turnbull, J. F., & Noble, C. (2018). Welfare Indicators for farmed Atlantic salmon—Part A. Knowledge and theoretical background. In: Noble, C., Gismervik, K., Iversen, M. H., Kolarevic, J., Nilsson, J., Stien, L. H. & Turnbull, J. F. (Eds.) (2018). Welfare Indicators for farmed Atlantic salmon: tools for assessing fish welfare. 351pp. ISBN 978-82-8296-556-9. pp. 10–145.
- Noble, C., Cañon Jones, H. A., Damsgård, B., Flood, M. J., Midling, K. Ø., Roque, A., Sæther, B. -S., & Cottee, S. Y. (2012). Injuries and deformities in fish: their potential impacts upon aquacultural production and welfare. *Fish physiology and biochemistry* 38(1), 61–83.
- Noble, C., Gismervik, K., Iversen, M. H., Kolarevic, J., Nilsson, J., Stien, L. H., & Turnbull, J. F. (Eds.) (2018). Welfare Indicators for farmed Atlantic salmon: tools for assessing fish welfare. 351pp. ISBN 978-82-8296-556-9
- Nytrø, A. V., Vikingstad, E., Foss, A., Hangstad, T. A., Reynolds, P., Eliassen, G., Elvegård, T. A., Falk-Petersen, I. B., & Imsland, A. K. (2014). The effect of temperature and fish size on growth of juvenile lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.). *Aquaculture*, 434, 296–302.
- Pattillo, C. (undated). PROJECT REPORT: The Effects of Fin Damage on the Condition of Juvenile Lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) in Hatcheries and Sea Cages. 5pp. https://www.masts.ac.uk/media/36325/sg422-project_report-final.pdf
- Perry, S. F., Jonz, M. G., & Gilmour, K. M. (2009). Oxygen sensing and the hypoxic ventilatory response. In: *Fish Physiology*. Vol. 27. Richards, I. J., Farrell, J., Brauner, C. (eds.). Elsevier, London UK. pp. 193–253.
- Pooley, C., Berwick, M., & de Leaniz, C. G. (2019). Chemical degumming increases larvae size and facilitates the commercial production of Lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) eggs. *bioRxiv*, 583641.
- Powell, A., Pooley, C., Scolamacchia, M., & Garcia de Leaniz, C. (2018a). Review of lumpfish biology. C In: Cleaner fish biology and aquaculture applications. Treasurer J. W. (ed.). 5M Publications. Sheffield. pp. 98–121.
- Powell, A., Treasurer, J. W., Pooley, C. L., Keay, A. J., Lloyd, R., Imsland, A. K., & Garcia de Leaniz, C. (2018b). Use of lumpfish for sea-lice control in salmon farming: challenges and opportunities. *Reviews in aquaculture*, 10(3), 683–702.
- Remen, M., & Jonassen, T. (2017). Utvikling av transport- og mottaksprosedyrer for rognkjeks basert på kartlegging av miljø og stress. Akvaplan-niva rapport nr. 7707-1, 71pp.
- Rimstad, E., Basic, D., Gulla, S., Hjeltne, B. & Mortensen, S. (2017). Risk assessment of fish health associated with the use of cleaner fish in aquaculture. Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare of the Norwegian Scientific Committee for Food and Environment. VKM report 2017:32, ISBN: 978-82-8259-289-5, ISSN: 2535-4019. Norwegian Scientific Committee for Food and Environment (VKM), Oslo, Norway.
- RSPCA (2018a). RSPCA welfare standards for farmed Atlantic salmon. <https://science.rspca.org.uk/sciencegroup/farmanimals/standards/salmon> (Accessed February 2019)
- RSPCA (2018b). RSPCA welfare standards for farmed rainbow trout. <https://science.rspca.org.uk/sciencegroup/farmanimals/standards/trout> (Accessed February 2019)

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH

- Sällebrant, J. B. (2018). Chronic allostatic overload on the hypothalamic-pituitary-interrenal axis of lumpfish (*Cyclopterus lumpus*). Effect of size. Msc in Bioscience, Faculty of Aquaculture and Bioscience, Nord University, 70pp.
- Saraiva, M., Beckmann, M. J., Pflaum, S., Pearson, M., Carcajona, D., Treasurer, J. W., & van West, P. (2019). *Exophiala angulospora* infection in hatchery-reared lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) broodstock. *Journal of fish diseases*, 42(3), 335-343.
- Scholz, F., Glosvik, H., & Marcos-López, M. (2018). Cleaner fish health. In: *Cleaner fish biology and aquaculture applications*. Treasurer J. W. (ed.). 5M Publications. Sheffield. pp. 221-257.
- Skiftesvik, A. B., Bjelland, R. M., Durif, C., Halvorsen, K. A. T., Sema, S., Fields, D., & Browman, H. (2017). Program rensefisk: Kunstig lys og rensefisk. Rapport fra havforskningen. 16/2017. 43pp.
- Skiftesvik, A. B., Bjelland, R. M., Durif, C., Moltumyr, L., Hjellum, R. B., & Halvorsen, K. A. T. (2018). Program rensefisk: Adferd og artssamspill i laksemerder. Rapport fra havforskningen 33-2018. ISSN 1893-4536 (online). 61pp.
- Skoge, R. H., Brattespe, J., Økland, A. L., Plarre, H., & Nylund, A. (2018). New virus of the family *Flaviviridae* detected in lumpfish (*Cyclopterus lumpus*). *Archives of virology*, 163(3), 679-685.
- Soares, S., Green, D. M., Turnbull, J. F., Crumlish, M., & Murray, A. G. (2011). A baseline method for benchmarking mortality losses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) production. *Aquaculture* 314, 7-12.
- Sopinka, N. M., Donaldson, M. R., O'Conner, C. M., Suski, C. D. & Cooke, S. J. (2016) Stress indicators in fish. In: *Biology of stress in fish*. Fish physiology volume 35. Schreck, C. B., Tort, L., Farrell, P. & Brauner, C. J. (eds.). Academic Press, 405-462.
- Stien, L. H., Bracke, M., Folkedal, O., Nilsson, J., Oppedal, F., Torgersen, T., Kittilsen, S., Midtlyng, P. J., Vindas, M. A., Øverli, Ø., & Kristiansen, T. S. (2013). Salmon Welfare Index Model (SWIM 1.0): a semantic model for overall welfare assessment of caged Atlantic salmon: review of the selected welfare indicators and model presentation. *Reviews in Aquaculture* 5, 33-57.
- Stien, L. H., Oppedal, F., & Kristiansen, T. S. (2016). Dødelighetsstatistikk for lakseproduksjon (eng: Mortality statistics for salmon production). In: *Risikovurdering norsk fiskeoppdrett 2016*. Svåsand, T., Karlsen, Ø., Kvamme, B. O., Stien, L. H., Taranger, G. L., Boxaspen, K.K. (eds.). Havforskningsinstituttet, Fisken og Havet, særnr; 2-2016, 129-134.
- Thorarensen, H., & Farrell, A. P. (2011). The biological requirements for post-smolt Atlantic salmon in closed-containment systems. *Aquaculture* 312(1), 1-14.
- Timmons, M. B., & Ebeling, J. M. (2007). *Recirculating Systems*. Northeastern Regional Aquaculture Center, Ithaca, NY.
- Treasurer, J., & Feledi, T. (2014). The Physical Condition and Welfare of Five Species of Wild-caught Wrasse Stocked under Aquaculture Conditions and when Stocked in Atlantic Salmon, *Salmo salar*, Production Cages. *Journal of the World Aquaculture Society*, 45(2), 213-219.
- Treasurer, J. W., Noble, C., Puvanendran, V., Planellas S. R., & Iversen, M. H. (2018). Cleaner fish welfare. In: *Cleaner fish biology and aquaculture applications*. Treasurer J. W. (ed.). 5M Publications. Sheffield. pp. 221-257.
- Treasurer, J. W. (2018a). Cleaner fish in aquaculture review and looking to the future. In: *Cleaner fish biology and aquaculture applications*. Treasurer J. W. (ed.). 5M Publications. Sheffield. pp. 483-495.
- Treasurer, J. W. (2018b). Appendix A3. Technical sheet - lumpfish (*Cyclopterus lumpus*). In: *Cleaner fish biology and aquaculture applications*. Treasurer J. W. (ed.). 5M Publications. Sheffield. pp. 500-501.
- Treasurer, J., & Turnbull, T. (2019). Tolerance of lumpfish, *Cyclopterus lumpus*, to freshwater bath treatment for amoebic gill disease, *Neoparamoeba perurans*, infection and efficacy of different treatment regimens. *Journal of the World Aquaculture Society*, 50(1), 42-53.
- Turnbull, J. F., Bell, A., Adams, C., Bron, J., & Huntingford, F. (2005). Stocking density and welfare of cage farmed Atlantic salmon: application of a multivariate analysis. *Aquaculture* 243(1), 121-132.
- Turnbull, J. F., North, B. P., Ellis, T., Adams, C. E., Bron, J., MacIntyre, C. M., & Huntingford, F. A. (2008). Stocking Density and the Welfare of Farmed Salmonids. In: *Fish Welfare*. Branson, E. J. (ed.). Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.
- Veiseth, E., Fjæra, S. O., Bjerkeng, B., & Skjervold, P. O. (2006). Accelerated recovery of Atlantic salmon (*Salmo salar*) from effects of crowding by swimming. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 144(3), 351-358.
- Wedemeyer, G. (1996). *Physiology of fish in intensive culture systems*. Springer Science & Business Media.

RENSVEL OWI FACTSHEET SERIES: LUMPFISH



