

Sluttrapport:

Toleranse for transportstress og miljøoverganger hos berggylt og rognkjeks



Akvaplan-niva AS Rapport: 9081 - 1

This page is intentionally left blank

Rapporttittel

Toleranse for transportstress og miljøoverganger hos berggylt og rognkjeks

Prosjektgruppe:

Thor Jonassen, Atle Foss, Mette Remen, Ellie Jane Watts, Thor Arne Hangstad

Akvaplan-niva rapport nr.

9081 - 1

Dato

12.03.2019

Antall sider

62

Distribusjon

Åpen

Oppdragsgiver

FHF

Oppdragsg. referanse

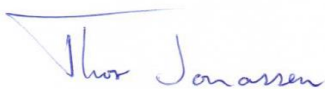
901426

Sammendrag

Fisk under transport blir ofte utsatt for plutselige overganger i miljøforhold fra kar på land til sjø. Prosjektet gir grunnlag for vurdering av risiko og tiltak forbundet med fisketransport og overføring av fisk til nytt miljø for å bedre fiskevelferd og overlevelse etter utsett i sjø. Både rognkjeks og oppdrettet berggylt ble fulgte en opp 4 transporter som er representative i forhold til vanlig praksis i næringen. Det ble tatt blodprøver for analysing av primær (kortisol) og sekundære (plasmaioner og pH) stressresponser. I tillegg ble fiskens slimceller undersøkt ved bruk av QuantiDoc-metoden som indikasjon på skinnhelse og barrierestyrken mot ytre miljø. Videre ble det i kontrollerte karforsøk med berggylt undersøkt responsen på akutte endringer i temperatur, salinitet og lysintensitet og for rognkjeks respons på akutte temperaturendringer som rognkjeks kan oppleve i forbindelse med transport og overføring til merd.

Prosjektleder

Thor Jonassen

**Kvalitetskontroll**

Albert Imsland



INNHOLDSFORTEGNELSE

Oppsummering.....	5
Bakgrunn.....	6
Introduksjon	7
Generelt om analysene i prosjektet	9
Referanser	10
DEL I: ROGNKJEKS: TRANSPORT OG OVERFØRING TIL MERD	12
Gjennomføring	12
Beskrivelse av transportene	12
Resultater og diskusjon	16
Skinnhelse	21
Oppsummering og koplinger til miljø og drift.....	25
Referanser	26
DEL II: BERGGYLT: TRANSPORT OG OVERFØRING TIL MERD	27
Gjennomføring	27
Beskrivelse av transportene	28
Resultater og diskusjon	31
pH og osmotisk stress	33
Skinnhelse	35
Sammenheng mellom primær stressrespons og skinnhelse	38
Konklusjoner.....	39
Referanser	40
DEL III: ROGNKJEKS: TOLERANSE FOR BRÅ TEMPERATUROVERGANGER.....	41
Bakgrunn.....	41
Materiale og metode.....	41
Resultater	43
Diskusjon	46
Konklusjoner og anbefalinger	48
Referanser	48
DEL IV: BERGGYLT: TOLERANSE FOR BRÅ MILJØOVERGANGER; LYS, TEMPERATUR OG SALINITET	50
Materiale og metode.....	50
Resultater	52
Diskusjon	56
Konklusjoner og anbefalinger	59
Referanser	59
VEDLEGG 1: BESKRIVELSE AV PRØVETAKING OG ANALYSEMETODER	61
Prøvetaking og analysering av plasmakortisol.....	61
Prøvetaking og analysering av pH, Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻ og Ca ²⁺	61
Prøvetaking og analyser av slimceller fra hud	61

Oppsummering

- For rognkjeks var det generelt en moderat økning i stress etter transport, og en reduksjon etter en uke i merd. Fisk med høyst stressnivå etter en uke i merd hadde høyest akkumulert dødelighet etter 3 mnd. Merder med høy dødelighet var også karakterisert med perioder med sterk strøm.
- Også for berggylt hadde forholdene på lokaliteten større betydning for overlevelse enn transportstresset, spesielt kombinasjonen sterk strøm og høye temperatur ga vært høy dødelighet. Kvaliteten på fisken med avstumpede finner kan ha medvirket til at fisken taklet disse miljøforholdene dårlig.
- For berggylt var det redusert tetthet av slimceller og barrierestatus (beskyttelse mot ytre miljø) i huden ved økende stressnivå etter overføring til merd.
- Testing av temperaturtoleransen hos rognkjeks i intervallet 4,2, - 14,2 °C viser at rognkjeks takler stress bedre ved høye temperaturer enn ved den laveste temperaturen, som kan bety at håndtering, transport og overføring av rognkjeks til nytt miljø er mer kritisk ved lave temperaturer.
- Berggylta reagerer på endringer i lysintensitet, og stresser ned raskere ved høy lysintensitet enn når lysintensiteten er lav.
- Berggylta er svært tolerant for redusert salinitet (brakkvann) og tåler godt et temperaturopp fra ca. 12 til 8-9 °C.

Bakgrunn

En har liten kunnskap om miljøtoleranse hos berggylt og rognkjeks spesielt i forbindelse med transport og overføring til merd. I tillegg har en mistanke om at økt dødelighet i sjø etter transport kan være relatert til miljømessige belastninger knyttet til selve transporten eller store miljösprang fra kar på land til laksemerder i sjø. For rensefisk som helhet oppgir Mattilsynet og fiskehelsetjenester at det fortsatt er store helse- og velferdsmessige utfordringer (Fiskehelserapporten 2018).

Tidligere studier fra kontrollerte simulerte transportforsøk med rognkjeks under forskjellige miljøbetingelser viste at vannkvaliteten holdt seg relativt stabil under transport, men at økt tetthet førte til økt stress tidlig i transporten og at stressnivået ble redusert med økende transporttid. Økt temperatur fra 8 til 12 °C påvirket ikke stressnivået, men større temperatursprang og temperaturoppgang ble ikke undersøkt. For berggylt finnes det generelt lite kunnskap på dette området til tross for at både produksjonen og transport forventes å øke. Det er derfor et stort behov for utvikling av kunnskap om transport- og miljøtoleranse også hos berggylt for å sikre fiskevelferd under transport og redusere risikoen for dødelighet etter utsett i merd.

Prosjektet ble gjennomført av Akvaplan-niva på oppdrag fra Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF) v/ Eirik Sigstadstø gjennom prosjektet "Toleranse for transportstress og miljøoverganger hos berggylt og rognkjeks" (prosjektnummer 901426). Styringsgruppen for prosjektet var Olav Breck (Marine Harvest), Kjetil Heggen (Lerøy Seafood) og Halvard Hovland (Havlandet Marin Yngel). Takk til Espen Grøtan og andre ansatte ved Marine Harvest Labrus.

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

Delmål:

1. Beskrive typiske transportforløp for berggylt på bil og brønnbåt, og vurdere risikoelementer basert på måling av fiskens stressrespons
2. Beskrive seineffekter av transport og miljøovergang for berggylt og rognkjeks etter overføring til merd
3. Kartlegge stressrespons på brå miljøendringer som temperatur, salinitet og lysintensitet hos berggylt i kontrollerte forsøk
4. Kartlegge stressrespons på brå temperatur-overganger hos rognkjeks i kontrollerte forsøk

Forventet nytteverdi: Håndtering og større miljøendringer som fisken utsettes for ifm. transport fra påvekstanlegg og overføring til sjø kan utgjøre betydelig stress med påfølgende økonomiske tap som følge av økt dødelighet, svekket motstandsevne mot sykdommer og redusert lusespising. Det er vanskelig å følge opp slike seineffekter av transport i merder i sjø. Data fra uttesting av miljøeffekter i kontrollerte karforsøk sammen med analyser fra forskjellige transportbetingelser i felt vil gi mer kunnskap om forskjellige transportforhold og seineffekter på fiskevelferd i sjø. Bedre dokumentasjon på hvordan transport påvirker stress og kvalitet på rensefisk kan utnyttes i forbedringsprosesser hos transportør med bedre regulering og tilpasning av fisketransporten.

Datagrunnlaget fra prosjektet vil gi oppdretter bedre forutsetninger for å vurdere risikoelementer rundt transport og gjøre tiltak som kan redusere risiko og bedre fiskevelferd og overlevelse etter utsett i merd med laks.

Introduksjon

Typiske problemstillinger ved transport er at fisken ofte blir utsatt for plutselige forandringer/overganger i miljøforhold når fisken flyttes fra kar på land til sjø. For å vurdere risikoen for den enkelte fisketransporten og eventuelt gjøre tiltak for å gjøre overgangen til sjø mest mulig skånsom er en avhengig av kunnskap om fiskens respons på de forskjellige miljøparametrene den utsettes for. En har også behov for mer kunnskap om hvordan stressnivået fisken har etter transport påvirker tilpasning og overlevelse etter overføring til merd.

Temperatur: Rensefisken utsettes for en økning eller reduksjon i temperatur avhengig av når på året den settes ut. Det kan være fordelaktig mhp. god kontroll med lakselusa å sette rensefisken ut tidlig på våren. Fisken utsettes da for et betydelig temperaturopp, som den kan få problemer med å takle. Det er observert at berggyllt som utsettes for en temperaturreduksjonen på mer enn ca. 3 °C blir liggende tilsynelatende bevisstløs i bunnen av karet eller merden, og blir ikke aktiv før temperaturen øker igjen. Overganger fra lav til høyere temperatur synes rensefisken å takle bedre. For rognkjeks har en fra forsøk indikasjoner på at en temperaturøkninger fra 8 til 12 °C er uproblematisk, men fysiologisk respons og stress ved større temperaturøkninger eller plutselige temperaturopp vet en lite om. For å skaffe mer kunnskap om det miljømessige "vinduet" en har for utsett av rensefisk, samt beskrive behovet for å legge til rette for akklimatisering før transport er det viktig å avklare temperaturtoleransen for berggyllt og rognkjeks, samt hvordan temperatur spiller inn på restituering etter en stressbelastning.

Salinitet: Både rognkjeks og berggyllt kan oppleve salinitetsoverganger i forbindelse med utsett på ferskvannspåvirkede lokaliteter eller der en bruker ferskvann i behandling mot lus. Rognkjeks har i forsøk vist god toleranse for lav salinitet, og salinitet er ikke pekt på som en utfordring ved overføring til merd. Berggyllt utsettes for lav salinitet i behandling mot AGD, men ved en mer gradvis tilvenning og ved høyere temperatur enn det den utsettes for i forbindelse med utsett i sjø spesielt tidlig på våren. En har erfaring med økt dødelighet etter transport av berggyllt med brønnbåt hvor en mistenker at redusert salinitet kan ha spilt inn. Kunnskap om salinitetstoleranse hos berggyllt er viktig for å vurdere behovet for akklimatisering før utsett eller avgrensning av hva slags forhold berggyllt kan settes ut under.

Lysintensitet: Erfaring med berggyllt viser at den er svært følsom for lys, og en typisk stressreaksjon er at den klumper seg sammen. Den oppdrettes derfor ved lav lysintensitet. Ved utsett om våren utsettes den derfor for en kraftig og plutselig økning i lysintensitet. Sammenklumping av fisk etter overføring til brønnbåt har i flere tilfeller vært forbundet med stor dødelighet, og en mistenker at eksponering til sterkt sollys kan være medvirkende årsak. Det er vanlig at brønnbåter har åpne luker under både opplasting og transport. Det er derfor behov for mer kunnskap om lysintensitet som stressfaktor under transport.

Håndtering og transportmetode: Rapporter fra oppfølging av rognkjeks under transport har identifisert selve håndteringen av fisken, spesielt ved omlasting fra bil til sekundærtransport, som en stor stressfaktor. Berggyllt virker enda mer følsom for stress og reagerer kraftigere enn rognkjeks atferdsmessige ved at fisken klumper seg sammen og trekker nedover i vannmassene. Dette kan by på problemer f.eks. i brønnbåt hvor en kan finne berggyllt presset sammen rundt avløpsriseten, og i merd hvor temperaturen på dypet spesielt om våren kan være lavere enn den ser ut til å tåle (blir inaktiv/paralysert). Det er heller ikke uvanlig at større partier av berggyllt

levert med brønnbåt blir samlet i en enkelt brønn og derfra bli fordelt på flere merder. Dette vil for en del av fisken bety lengre eksponering for håndteringsstress ifm. pumping osv. og større akkumulering av stress. Hvordan berggylt akkumulerer stress og hvordan den nedregulerer (akklimatiserer seg) i etterkant av forskjellige stressituasjoner vet en ikke. Oppfølging av transporter i felt med miljømålinger, filming av adferd og måling av fysiologisk respons på fisken kan gi bedre kunnskap om atferdsmessig respons på forskjellige stressfaktorer og gi mulighet for bedre tilpasning av transportmetoder for berggylt.

Overføring og akklimatisering til merd: Tidligere undersøkelser av transport av rognkjeks fant at stressnivået var på sitt høyeste like før fisken ble overført til merd etter sekundærtransporten. En fikk ikke data på videre utvikling av stress i merd og andre fiskehelseindikatorer som kunne si noe om den videre skjebnen etter utsett på grunn av høyt uregistrert svinn og problemer med å få gode registreringer på dødelighet. Man er derfor avhengig av å finne andre mål på seinvirkninger i sjø (sekundære og tertiære stressrespons), samt gode metoder for uttak av fisk for prøvetaking. Før man har kunnskap om en endelige responsen på transportforholdene etter utsett i merd, den akkumulerte effekten av transport- og håndteringsstresset, kan man heller ikke beskrive en optimal fiskeleveranse og forutse resultatet av et utsett.

Prosjektet består av fire deler:

- 1) For rognkjeks fulgte en opp 4 transporter (2 på bil og 2 i brønnbåt) som er representative i forhold til vanlig praksis i næringen. Det ble tatt blodprøver av 6 fisk før transport (ustresset fisk), etter transport (fra transportkar like før overføring til merd) samt etter en uke i merd for analysing av primær (kortisol) og sekundære (plasmaioner og pH) stressrespons. I tillegg ble fiskens slimceller undersøkt ved bruk av QuantiDoc-metoden som indikasjon på skinnhelse og barrierestyrken mot ytre miljø (tertiær stressrespons). Dette blir gjort på 5 fisk før transport (upåvirket fisk) og 5 fisk ca. en uke etter overføring til merd.
- 2) Samme type undersøkelser som ovenfor ble gjort på oppdrettet berggylt i forbindelse med to båttransporter og to biltransporter med innlagt omlasting til sekundærtransport med båt (hhv. brønnbåt og transportkar på arbeidsbåt) til merd. Også her ble forandringer i skinnhelse undersøkt ved hjelp av QuantiDoc-metoden.
- 3) I kontrollerte karforsøk ble responsen på akutte endringer i temperatur, salinitet og lysintensitet undersøkt hos oppdrettet berggylt.
- 4) I kontrollerte karforsøk respons på akutte temperaturendringer som rognkjeks kan oppleve i forbindelse med transport og overføring til merd undersøkt.

Denne sluttrapporten består derfor av fire deler:

- I. Rognkjeks: Transport og overføring til merd
- II. Berggylt: Transport og overføring til merd
- III. Rognkjeks: Toleranse for brå temperaturovergang
- IV. Berggylt: Toleranse for brå miljøoverganger; lys, temperatur og salinitet

Generelt om analysene i prosjektet

I prosjektet er det brukt et sett av analyser i forsøk på å beskrive fiskens respons på de forskjellige fasene av en transport og overgangen til nytt miljø. I både oppfølgingen av transportene i felt og overgangen til merd, samt i de kontrollerte forsøkene med testing av respons på brå miljøoverganger ble det tatt blodprøver for måling av plasmakortisol som mål på akutt stress, plasmaionene Na^+ , Cl^- , K^+ og Ca^{2+} som mål på osmotisk stress og fiskens evne til å regulere salt-vannbalansen under stress og miljøendringer, og pH som indikasjon på fiskens metabolske aktivitet.

Fra alle transportene ble det i tillegg tatt skinnprøver før transport og en uke etter overføring til med for å analysere slimcellestatus, basert på Quantidoc-metoden (Pittmann m.fl. 2013), som mål på fiskens robusthet eller barrierestatus mot ytre miljø og infeksjoner. På rognkjeks ble det i tillegg gjort morfometriske analyser av en nyoppdaget celletype i huden, Q-celler, som også ble tolket som en indikator på robusthet.

Kortisol

Selv om stressresponsen i utgangspunktet er en adaptiv respons som skal hjelpe dyret med å re-etablere sin likevekt i møte med en stressor (Barton m.fl. 2002), vil hyppig eksponering for en sterk stressor (f.eks. håndtering eller miljøendring) ha en kostnad i akvakultursammenheng (Barton og Iwama 1991). Det endelige resultatet av stress, den tertiære stressresponsen, oppstår ved overbelastning eller kronisk stress og kan blant annet føre til redusert immunforsvar, redusert evne til ioneregulering og redusert appetitt (Wendelaar Bonga 2011, Remen m.fl. 2012). Det finnes ikke kunnskap om kortisolmetabolisme (produksjon og nedbrytning) eller kortisolreseptortetthet hos rognkjeks og berggylt, og det er foreløpig begrenset kunnskap om sammenhengen mellom målte kortisolnivå i plasma og sekundære/tertiære stressresponser.

Osmotisk stress

Kortisol inngår i fiskens ioneregulering (osmoregulering) og energiomsetningen, og endringer i ionebalansen er en typisk sekundær stressrespons (Veiseth m.fl. 2006). Kraftige stressrespons vil generelt øke permeabiliteten i gjellene og redusere kapasiteten for osmoregulering. Dette vil føre til økt ionekonsentrasjonen (dehydrering) hos fisk i sjøvann (Arends m.fl. 1999) som over lengre tid vil forårsake dødelighet.

Variasjonen i plasmaionene analysert i dette prosjektet vil gi et bilde på hvordan fiskens saltbalanse påvirkes og er blant de viktigste miljøfaktorene for fisk. Fiskens ionebalanse reguleres gjennom aktiv regulering av vann og saltioner via bl.a. nyrer, tarm og gjeller (McCormick & Saunders 1987).

Na^+ , Cl^- , K^+ og Ca^{2+} som ble målt i dette prosjektet reguleres primært over gjellene (Marshall 2002). I sjøvann pumpes Cl^- aktivt ut over gjellenes kloridceller hjulpet av enzymet Na^+ , K^+ -ATPase (Silva m.fl. 1977), og Na^+ -ionene følger passivt med denne Cl^- -transporten. Na^+ , K^+ -ATPase-aktiviteten oppreguleres bl.a. av kortisol (Madsen m.fl. 1995, Mancera & McCormick 1999). K^+ -ioner resirkuleres for det meste over den basolaterale membranen (siden av gjelleepitelet som vender innover i gjellefilamentet og utveksler ioner med blodet), men en liten mengde skilles ut passivt. Ca^{2+} blir tatt aktivt opp over gjeller og tarm hjulpet av enzymet Ca^{2+} -ATPase (Flik m.fl. 1995, 1997), og mekanismen er lik i sjøvann og ferskvann. I tillegg er det en utveksling mellom Na^+ og Ca^{2+} over den basolaterale membranen i gjelleepitelet (Verbost m.fl. 1997).

pH

Regulering av pH hos fisk (syre-base regulering) er tett koplet til ekskresjon av CO_2 . Gjennom regulering av likevekten mellom bikarbonat (HCO_3^-) og H^+ reguleres den direkte utskillelse av

CO₂ og vann (Perry & Gilmour 2006). Hos fisk er denne reguleringen direkte koplet til osmoregulering ved at utvekslingen av (HCO₃⁻) og H⁺ over gjellene er koplet til Na⁺ og Cl⁻. Laks vil ved kraftig stress og utmattelse få redusert pH, sannsynligvis påvirket av økt CO₂ i blodet. Tilsvarende vil skje ved hyperoksi der respirasjonsraten går ned og CO₂ akkumuleres i blodet på grunn av redusert utlufting over gjellene. En slik situasjon vil vanligvis kompenseres med økt opptak av bikarbonat (HCO₃⁻) som bufrer blodet slik at pH øker igjen og større andel CO₂ kan diffundere ut over gjellene. Gjennom koplingen med CO₂ som påvirkes av bl.a. fiskens aktivitet (metabolisme) og respirasjonsrate er pH et mål på sekundær stressrespons.

Skinnehelse

Skinnet og slimlaget utgjør fiskens barriere mot ytre miljø og førstelinjeforsvaret mot infeksjoner, og responderer på endringer i miljøet. Kvantitative analyser av areal (µm²) og tetthet (% dekning av huden) av slimceller i hud, samt barrierestyrke i huden som funksjon av areal og tetthet av slimceller er brukt som mål på skinnhelse (analysert av QuantiDoc®). Metoden er dokumentert som relevant mål på velferd og helse hos laks (Pittman m.fl. 2013), hvor tetthet og barrierestyrke er positivt korrelert med økende fiskevelferd og helse (robusthet overfor ytre miljø). Spesielt interessant for rognkjeks er de nyoppdagete cellene kalt Q-celler (identifisert av Karin Pittman, universitetet i Bergen), som er svært framtreddende i huden og viser en klar respons på stress og miljøendringer, spesielt i forhold til tettheten av Q-celler (Jonassen m.fl., upubliserte data).

Referanser

- Arends, R.J., Mancera, J.M., Munoz, J.L., Wendelaar Bonga, S.E., Flik, G. (1999). The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement. *Journal of Endocrinology*, 163, 149–157.
- Barton, B. A. (2002). Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and comparative biology*, 42(3), 517–525.
- 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.
- 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.
- Flik G, Verboost PM, Wendelaar Bonga SE. 1995. Calcium transport processes in fishes. In: Wood CM, Shuttleworth TJ, editors. Cellular and molecular approaches to fish ionic regulation. *Fish physiology*. New York: Academic Press. Vol 14, p 317–342.
- Flik, G, Kaneko T, Greco AM, Li J, Fenwick JC. 1997. Sodiumdependent ion transporters in trout gills. *Fish Physiol Biochem* 17:385–396.
- Gilmour, K.M., Perry, S.F. (2009). Carbonic anhydrase and acid–base regulation in fish. *Journal of Experimental Biology* 212, 1647–1661.
- Madsen SS, Jensen MK, Nohr J, Kristiansen K. 1995. Expression of Na⁺,K⁺-ATPase in the brown trout *Salmo trutta*: in vivo modulation by hormones and seawater. *Am J Physiol* 269:R1339–R1345.
- Mancera JM, McCormick SD. 1999. Influence of cortisol, growth hormone, insulin-like growth factor I and 3,3',5,5'-tetraiodo-L-thyronine on hypo-osmoregulatory ability in the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*. *Fish Physiol Biochem* 21:25–33.

- Marshall, W.S. (2002). Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} and Zn^{2+} Transport by Fish Gills: Retrospective Review and Prospective Synthesis. *Journal of Experimental Zoology* 293, 264–283.
- Perry, S.F., Gilmour, K.M. (2006). Acid-base balance and CO_2 excretion in fish: unanswered questions and emerging models. *Respir Physiol Neurobiol.* 154(1-2): 199-215.
- Remen M., Oppedal F., Torgersen T., Imsland A. K. & Olsen R. E. (2012). Effects of cyclic environmental hypoxia on physiology and feed intake of post-smolt Atlantic salmon: initial responses and acclimation. *Aquaculture*, 326, 148-155.
- Silva, P. Stoff, J., Field, M., Fine, L., Forrest, J.N., Epstein, F.H. (1977). Mechanism of active chloride secretion by shark rectal gland: role of Na-K-ATPase in chloride transport. *Renal Physiology*, doi.org/10.1152/ajprenal.1977.233.4.F298.
- 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* 144B, 351-358.
- Verboost PM, Bryson SE, Wendelaar Bonga SE, Marshall WS. (1997). Na^+ -dependent Ca^{2+} uptake in isolated opercular epithelium of *Fundulus heteroclitus*. *J Comp Physiol* 167B:205–212.
- Wendelaar Bonga S.E. (2011) Hormonal responses to stress. In: Encyclopedia of Fish Physiology (ed. A. Farrell). Academic Press, San Diego, pp. 1515-1523.
- Wood, C.M. & Jackson, E.B. (1980). Blood acid-base regulation during environmental hyperoxia in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Respiration Physiology*, 42(3), 351-372.

Del I: Rognkjeks: Transport og overføring til merd

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

Gjennomføring

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

Uttak av fisk fra kar eller tanker på bil og båt skjedde direkte med håv og fisken ble avlivet med overdose bedøvelse (Finquel, 200 mg/l) før prøvetaking. Det tok ca. 15-45 sekunder fra fisken ble tatt ut til den var død. I merd skjedde uttak av fisk med håv fra skjul plassert ved merdkant.

To-veis nøstet ANOVA med grupper nøstet i tidspunkt ble brukt til å undersøke forskjeller mellom tidspunkt uavhengig av gruppe. En-veis ANOVA ble benyttet for å undersøke om det var forskjeller mellom transportgruppene på de enkelte prøvetakingstidspunktene. Signifikante ANOVA ble etterfulgt av Student Newman-Keuls test (SNK) for å identifisere hvilke grupper som var forskjellige. Dersom annet ikke er oppgitt inngikk seks blodprøveanalyser per gruppe per måletidspunkt (n=6) og fem skinnprøver per gruppe per måletidspunkt (n=5). Regresjonsanalyser ble foretatt for å identifisere graden av kausal sammenheng mellom blodparametere og skinnhelse. Signifikansnivå (α) på 0,05 ble brukt i alle analysene.

Beskrivelse av transportene

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

Transport 1 (T1):

Direkte transport fra yngelanlegg med bil til merd (14 timer). Bil ble tatt med ferge ut til anlegg. Opplasting på kveld, utsett i merd tidlig morgen (lys). Det var liten temperaturendring fra start til slutt (fra 7,0 °C i kar til 7,5 °C i merd ved levering) av transporten. God kvalitet på fisken, ingen observerte lyter. Yngel fra samme opphav som T2.

Lokaliteten er værutsatt med sterke vindgenererte strømmer målt opptil 70 cm/s. Erfart korte perioder med slike forhold i løpet av høsten (3-4 timer med 60-70 m/s). Lav dødelighet på rognkjeks frem til 5. oktober (0,1 %), økende til 14 % ved utgangen av desember. Strøm/værforhold kan ha påvirket dette. Laksen er G18-generasjon, utslaktes ut våren 2019. Lusesituasjonen 2018 normal, behandling to merder i november. 3 stk. gardiner fra Norse Aqua i hver merd. Fôring av rognkjeks med tørrfôr (Atlantic Gold, 2 mm) med Aquality luftdrevne matere på 2m og 8-13 m dyp. Agnposer med Symbio-fôr til leppefisk + frosne kubber i kanner som rognkjeks også spiser fra.

Transport 2 (T2):

Direkte transport fra yngelanlegg med bil til merd (10 timer). Bil med ferge ut til anlegg. Yngel fra samme opphav som T1. Opplasting på kveld, utsett i merd tidlig morgen (lys). Liten reduksjon i temperatur fra start til slutt (fra 7,0 °C i kar til 5,7 °C i merd ved levering). God kvalitet på fisken, ingen observerte lyter, god appetitt og god kontroll med lus frem til første behandling i august. Slapp fellesavlusning i mai pga. rensefisken holdt lusetallene lave. Ingen dødelighet første uken etter utsett. Akkumulert dødelighet etter 3 mnd. var 34 %. Noe av fisken var avmagret og en del hadde sår og finneslitasje som ble forbundet med gnaging mot notvegg ved kraftig strøm og fra spyling av not. Sårutvikling ble spesielt sett i sammenheng med spyling av not. Lokaliteten beskrives som værhard med tung sjø og kraftig strøm (målt opptil 60 cm/s).

Det ble praktisert kun håndføring av rensefisken. Hver merd har 10 stk. skjul av typen «Happy-fish» med stivere substrat som forventes spesielt tilpasset rognkjeks på strømutsatte lokaliteter (gir letter feste ved kraftig strøm og observerer effekt ved at rognkjeks i mindre grad blir dradd mot opp mot notveggen i perioder med kraftig strøm). I tillegg har merdene vanlig «Kina-tare» beregnet for leppefisken.

Det ble satt ut et nytt parti rognkjeks i november/desember som ble betegnet som mindre vellykket med tanke på overlevelse, appetitt og trivsel, som knyttes til hyppig håndtering pga. avlusning av laks. Rognkjeks i desember ble satt ut ved høye lusetall og like før avlusning. Dødelighetstallene ble antatt underrapportert pga. problemer med registrering fra brønnbåt i forbindelse med avlusning av laks samt urapporterte tall fra slaktelinjen for laks. Det var villfanget leppefisk i tillegg til rognkjeks i merdene, med total innblanding på 15 – 25 % (måltall 15% faktisk innblanding, men inkludert supplering for dødelighet ble akkumulert innblandingsprosent beregnet til ca. 25 %).

Transport 3 (T3):

Direkte transport fra yngelanlegg med hurtiggående spesialbygd brønnbåt for rensefisk til merd (6 timer). Yngel fra samme opphav som T4. Tid for opplasting 3,5 time. Transport på dagtid (overskyet). Lys på dekk og i brønn. Liten temperaturforskjell fra start til slutt (fra 8,2 °C i kar til 8,7 °C i merd ved levering). God kvalitet på fisken, ingen observerte lyter. Lokaliteten er spesielt strømutsat. Dødelighet 0,5 % etter en uke i sjø. Merdene satt opp med 3 stk. gardinskjul og 1 trekkspillskjul for rensefisk. Spesielt trekkspillskjulet som var av stivere materiale var beregnet for rognkjeks. Automatføring av tørrfôr. Dødeligheten i slutten av februar (ca. 2,5 mnd. etter utsett) var akkumulert til 45 %. Hoveddelen (5000 fisk) av den rapporterte dødeligheten var knyttet opp mot perioder med sterk strøm og spyling av not, og fisken var preget av sårskader. Det var en gradvis nedgang i temperatur fra 8,7 °C ved utsett i desember til 5,9 °C i slutten av februar (nabolokaliteten til T4).

Transport 4 (T4):

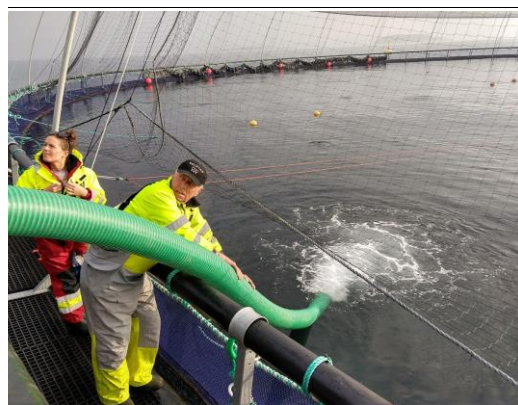
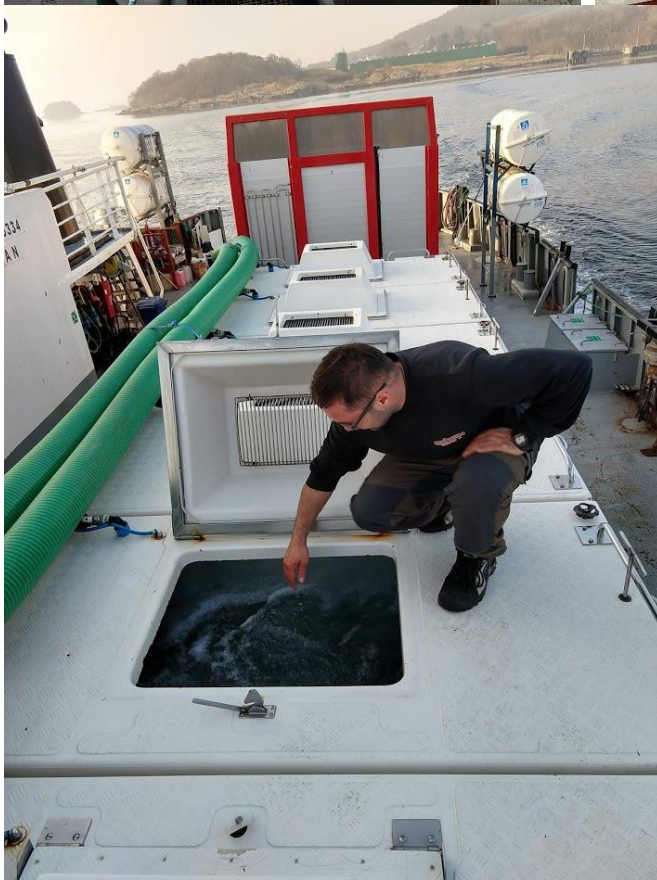
Direkte transport fra yngelanlegg med hurtiggående spesialbygd brønnbåt for rensefisk til merd (5 timer). Yngel fra samme opphav som T3. Tid for opplasting 1 time. Transport i mørke, opplasting av fisk på kveld (19:30), overføring til med natt (00:30). Lys på dekk og i brønn. Liten temperaturforskjell fra start til slutt (fra 8,2 °C i kar til 8,5 °C i merd ved levering). God kvalitet på fisken, ingen observerte lyter. Normalt gode strømforhold på lokaliteten. Dødelighet 0,5 % etter en uke i sjø. Merdene satt opp med 3 stk. gardinskjul og 2 trekkspillskjul for rensefisk. spesielt trekkspillskjulet som var av stivere materiale var beregnet for rognkjeks. Automatføring av tørrfôr. Dødeligheten i slutten av februar (ca. 2,5 mnd. etter utsett) var 11 %. Dødeligheten økte i starten av februar og det meste av dødfisken hadde sår. Det var en gradvis nedgang i temperatur fra 8,7 °C ved utsett i desember til 5,9 °C i slutten av februar (nabolokaliteten til T3).

Tabell 1. Transportforhold for fire forskjellige transporter av rognkjeks.

Transportbetingelser, rognkjeks	T1, 17/4	T2, 19/4	T3, 6/12	T4, 6/12
Transportmetode	Bil	Bil	Brønnbåt	Brønnbåt
Transporttid (timer)	14	10	6	5
Fiskestørrelse (g)	30	31	40	38
Sultperiode (dager)	1,5	1,5	1,5	1,5
Antall fisk transportert	27 000	21 000	48 000	52 500
Antall fiskekar/brønner	12	12	3	3
Karstørrelse (m3)	2	2	3 stk (4, 6 og 13 m3)	3 stk (4, 6 og 13 m3)
Fisketetthet under transport (m3)	34	27	92	88
Vannkvalitet under transport				
O2-start	120	120	103	89
O2-slutt	104	107	108	98
pH-start	8,12	8,1	7,4	7,33
pH-slutt	7,43	7,36	7,66	7,75
temp °C start	7	7	8,2	8,2
temp °C slutt	7,2	7,1	8,7	8,5
Forhold i merd etter overføring				
temp i merd ved levering (°C)	7,5	5,7	8,7	8,5
Merdstørrelse	160 m	200 m	200 m	160 m
Antall laks	176 100	125 000	199 000	199 000
Generasjon laks	18G, 82 g	17G	18G	18G
Blanding av leppefisk og rognkjeks?	ja	ja	ja	ja
% innblanding rensefisk totalt	14	15	11,5	13
Antall rognkjeks	13 500	10 500	14 100	14 200
% innblanding rognkjeks	7,7	8,4	7,1	7,2
% dødelighet etter 7 dager	0	0	0,5	0,5
% dødelighet etter ca. 3 mnd	2,6 %	34 %	45 %	11 %
% dødelighet etter 7 mnd	18 %	40 %	-	-
temp etter utsett	økende fra 7,5 til 17,4 °C i august	økende fra 7 til 17 °C i august, 8 °C i desember	første uken: 9-7, avtagende utover vinteren til 5,9 (26/2)	første uken: 9-7, avtagende utover vinteren til 5,9 (26/2)



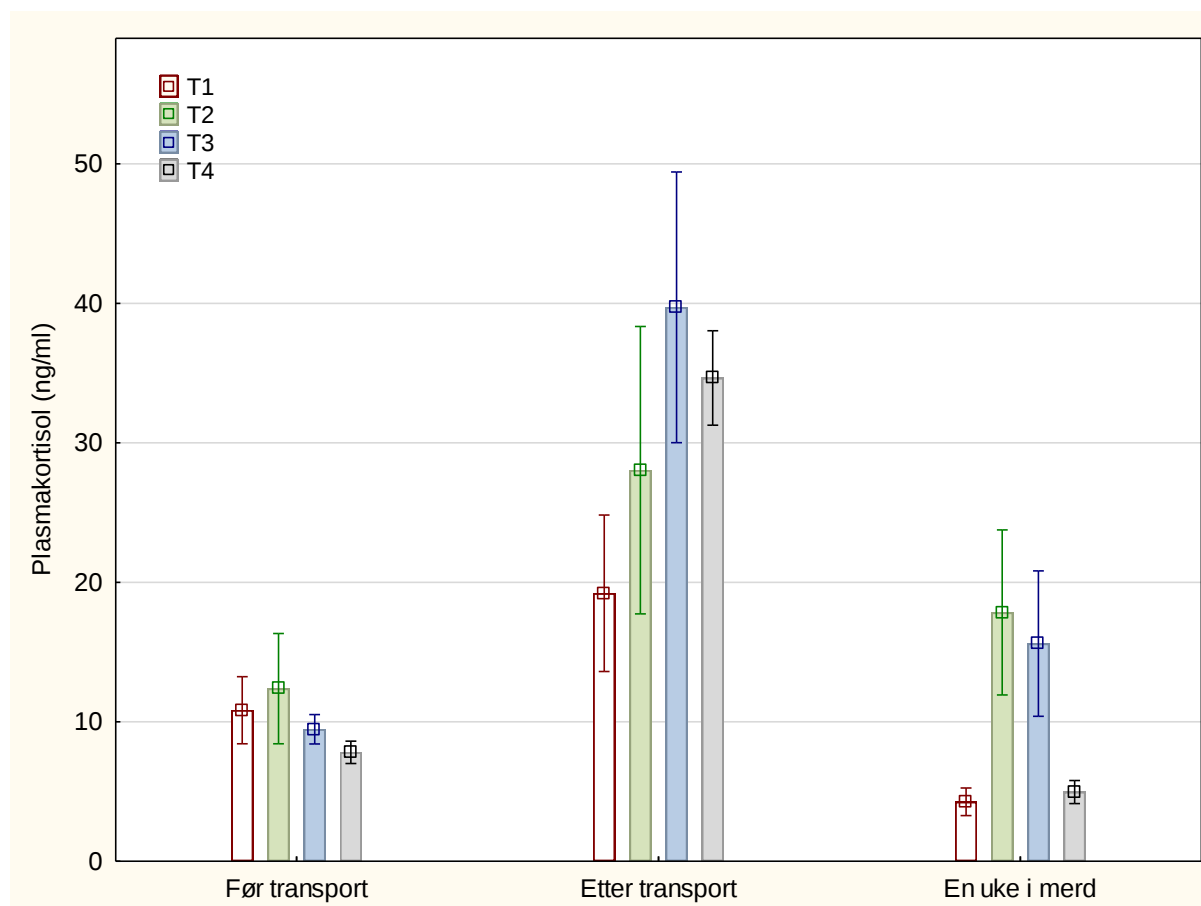
Første trinn i fisketransporten, overføring fra kar til brønnbåt: nedtapping av kar (trenging) og transport av fisk i rør fra kar til brønnbåt via fisketeller.



Levering av rensefisk med bil.

Resultater og diskusjon

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



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

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

Det gjennomsnittlige stressnivået etter primærtransport er kun halvparten av gjennomsnittlig nivå fra 15 kommersielle transporter av rognkjeks rapportert i et tidligere prosjekt og en tredjedel av nivåer målt etter sekundærtransport hvor fisken ble omlasting fra bil til båt (Remen m.fl. 2017). Dette tyder på at transportmetodene og prosedyrene for håndtering av fisk i forbindelse med transport har blitt mer skånsomme og tilpasset arten.

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

Båttransportene var av kortere varighet enn biltransportene (Tabell 1). T1 hadde lengst transporttid av alle gruppene og lavest stressnivå etter transport. Både på laks (Iversen m.fl. 2005) og rognkjeks (Remen & Jonassen 2017) er det tidligere vist at fiskens mulighet til å stresse ned etter en håndtering og miljøovergang, f.eks. opplasting til transport, øker med transporttiden og gjør fisken bedre i stand til å møte nye stressorer etter overføring til merd.

Selv om stressnivåene gjennom transporten og etter utsett var relativt lave, var det forhøyede nivåer i T2 og T3 sammenlignet med utgangsnivåene før transport, som tyder på kronisk stress. Kronisk stress reduserer bl.a. fiskens motstandsevne mot sykdommer og evne til å motstå additivt stress (Wendelaar Bonga 1997), og det er tidligere vist at transportstress påvirker overlevelsen hos atlantisk laks (Finstad m.fl. 2003) og coho laks (Schreck m.fl. 1989).

Plasmakortisol målt etter utsett i merd treffer bra som prediktor for den høye dødeligheten som kommer senere i T2 og T3 (ca. 3 mnd. i sjø, Tabell 1), men ikke med dødelighet etter 1 uke, som var lav for alle gruppene. Lokalitet som "confounding" (forvirrende) effekt gjør det vanskelig å si om utviklingen etter utsett i merd er en lokalitetseffekt eller er påvirket av forhold i yngelfasen.

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

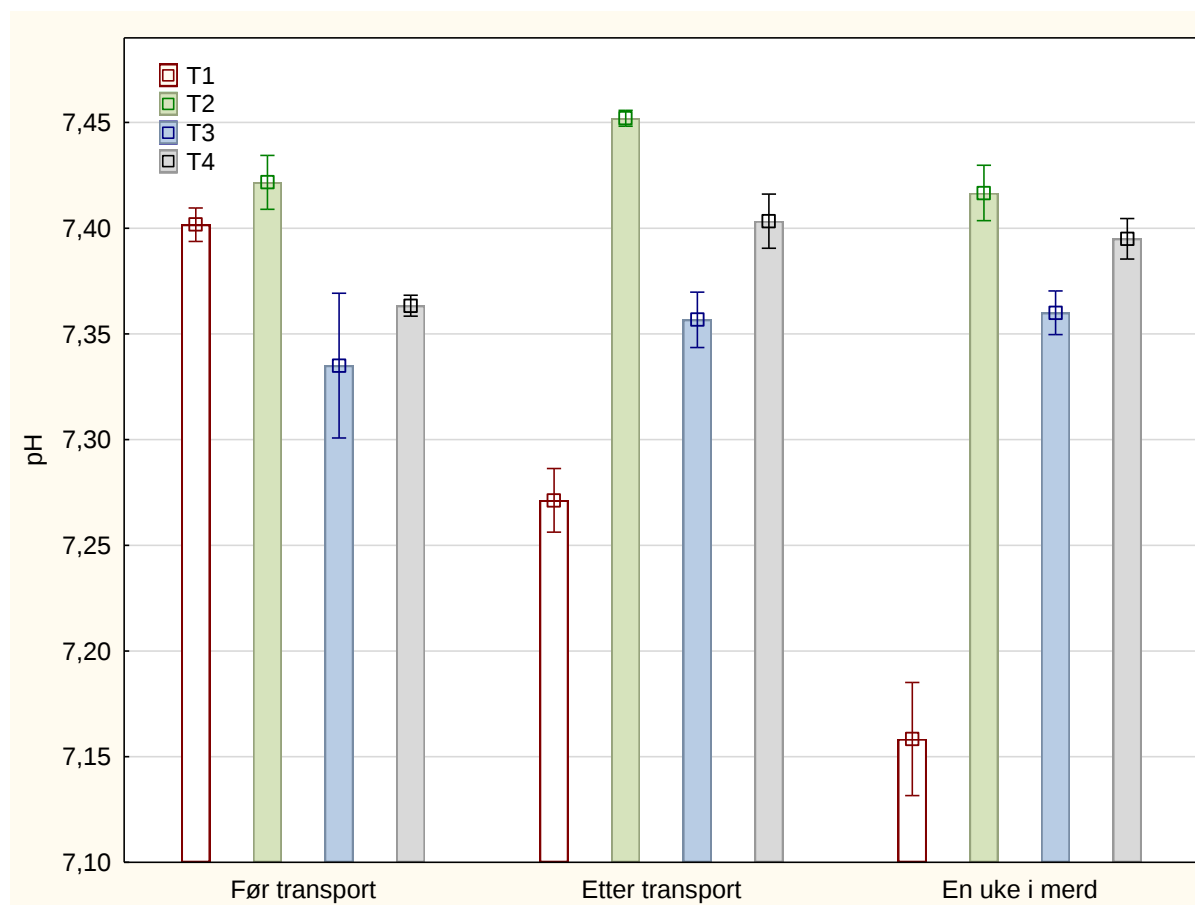
Det var ingen entydig endringer i pH gjennom transportforløpet og etter utsett (Figur 2), med unntak av T1, og indikerer generelt gode transportforhold og liten aktivitetsøkning etter utsett.

Under biltransportene var miljøforholdene primært styrt gjennom god lufting av vannet (samt regulering av oksygen) som reduserer CO₂ konsentrasjonen og stabiliserer oksygenmetningen, mens båttransportene hadde god vannutskifting. Dette var reflektert i målingene av oksygenmetning og pH under transportene (Tabell 1). Tidligere undersøkelser av transporter av rognkjeks hvor et større sett av miljøparametere ble analysert (Remen & Jonassen 2017), konkluderte også med at miljøforholdene under transport på bil og båt generelt var gode, og hadde relativt liten innvirkning på transportstresset og velferd under transport.

Lokaliteten T1 ble satt ut på betegnes som spesielt strømutsett. Redusert pH kan for T1 være indikasjon på økt svømmeaktivitet som øker forbrenningen og dermed konsentrasjonen CO₂ i blodet som fisken kompenserer for gjennom regulering av syre-base likevekten som styrer utskillelsen av CO₂ over gjellene, dvs. redusert pH gir økt CO₂ -utlufting (Perry & Gilmour 2006). Høy oksygenmetning i transportvannet ville også redusert pH i blodet (Fivelstad & Binde 1994), siden fisken styrer respirasjonsraten i forhold til oksygen, og ved høy oksygenmetning vil respirasjonsraten reduseres og dermed redusere utskillelsen av CO₂.

Dataene står likevel i kontrast til tidligere analyser av pH i blodplasma til rognkjeks hvor både nivåene før transport (pH=7,5) og etter transport (pH=8,1) var betydelig høyere (Remen og Jonassen 2017). Det ble da spekulert i om høy pH skyldtes overkompensering gjennom økt

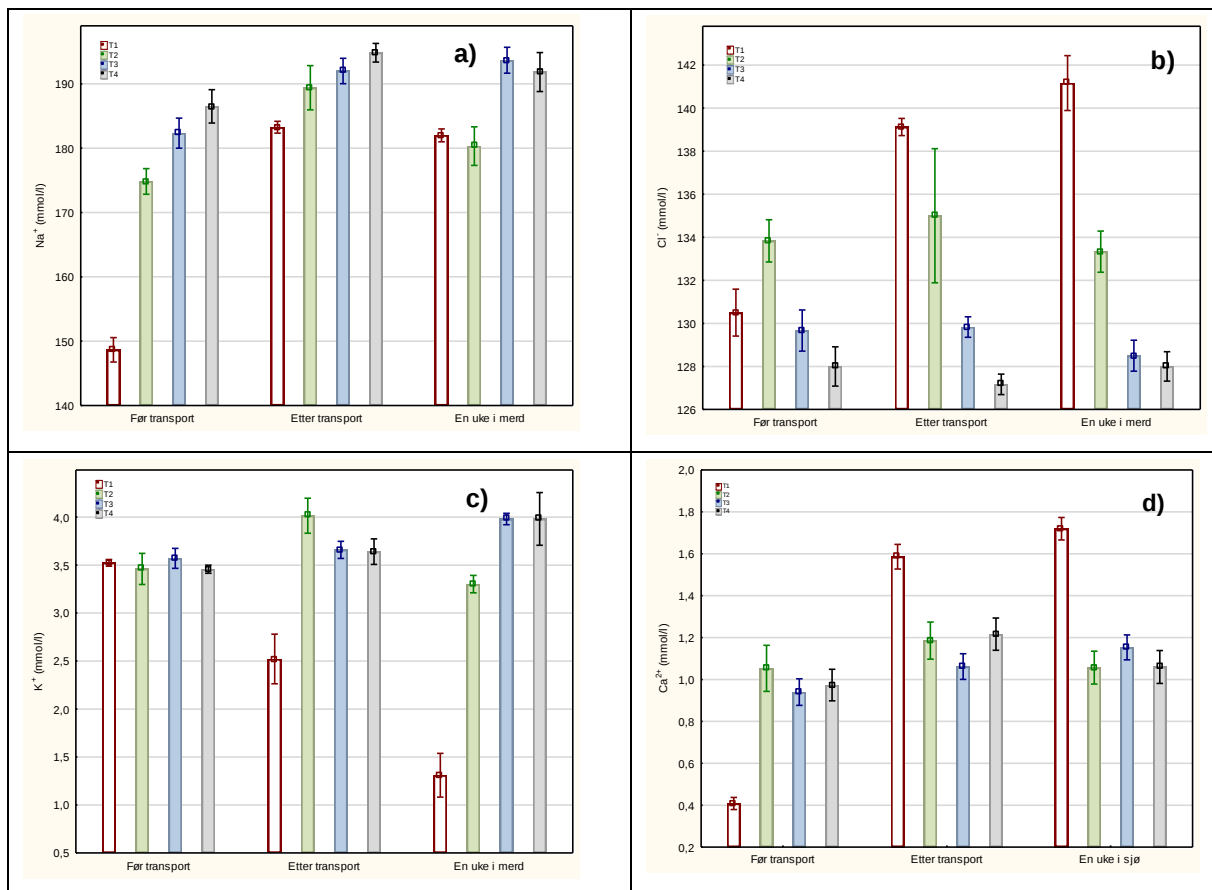
opptak av bikarbonat (HCO_3^-) som reaksjon (bufring) på høye CO_2 i blodet. Forskjellen kan skyldes at stressnivået var betydelig høyere under de tidligere undersøkte transportene.



Figur 2. Utvikling i pH på forskjellige stadier under transport for fire transporter av rognkjeks. Vertikale linjer på søylene viser standard feil (SEM).

Sammen med en rekke andre fysiologiske endringer er endringer i forhold til osmoregulering og ione-sammensetning en veldokumentert sekundær stressrespons hos fisk, som igjen kan føre til tertiære stressresponser som redusert vekst, svømmekapasitet, sykdomsmotstand, spiseaktivitet og endret adferd (Wendelaar Bonga 1997; Barton 2002).

Økt osmotisk stress gjennom transportforløpet for rognkjeks er indikert med en signifikant økt konsentrasjonen av Na^+ -ioner i plasma etter transport for alle gruppene slått sammen sammenlignet med før transport ($p < 0,001$), og kun en liten reduksjon etter en uke i merd (Figur 3a). Det er en tilsvarende, men mindre entydig trend for Cl^- (Figur 3b), hvor T1 peker seg ut med en signifikant økning etter transport og etter overføring til merd. K^+ viste ingen systematisk utvikling gjennom transportforløpet samlet sett (Figur 3c), bortsett fra for T1 som fikk en klar reduksjon etter transport og i merd.



Figur 3. Plasma- Na^+ (a) Cl^- (b), K^+ (c) og Ca^{2+} (d) fra rognkjeks på forskjellige stadier under transport og 7-10 dager etter utsett i merd. Vertikale linjer på søylene indikerer standard feil (SEM).

Hvorfor fisken i T1 responderer annerledes enn de andre gruppene med hensyn på utviklingen i pH og plasmaioner er usikkert, men en hypotese kan være at det er en effekt av høyere svømmeaktivitet som respons på sterk strøm på lokaliteten kombinert med utilstrekkelig feste i rensefisk-skjulene. Hos fisk er reguleringen av pH direkte koplet til osmoregulering ved at utvekslingen av (HCO_3^-) og H^+ over gjellene er koplet til Na^+ og Cl^- , og forklarer samvariasjonen i disse parameterne i T1 (Perry & Gilmour 2006).

Utviklingen i Ca^{2+} -konsentrasjonen viste en lignende utvikling som for Na^+ , med en signifikant økning etter transport for alle gruppene under ett ($p < 0,05$) og en liten endring etter overføring til merd.

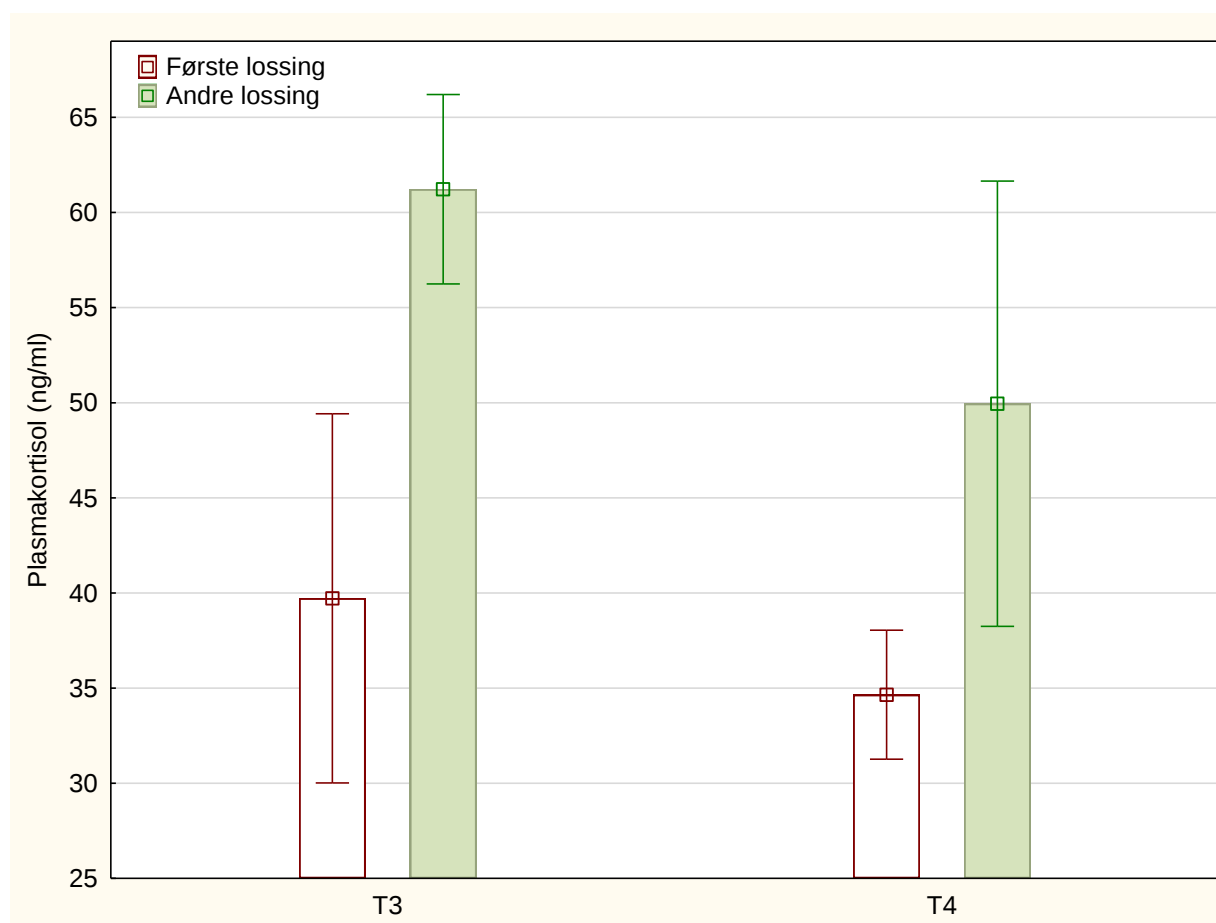
Osmotisk stress er tidligere målt under transport av rognkjeks som osmolalitet (mengde oppløste partikler per kg væske) i blodplasma, og viste signifikant høyere verdier etter sekundærtransport sammenlignet med før transport og etter primærtransport (Remen & Jonassen 2017). Fravær av slike klare trender i denne undersøkelsen kan skyldes det generelt lavere stressnivået på fisken.

Selv om man ser en økning i plasmaioner utover i transportforløpet, spesielt for Na^+ og Cl^- , som indikerer økt osmotisk belastning, er nivåene av plasmaionene i rognkjeks jevnt over lavere enn hos annen marin fisk, og på nivå med normalverdier for laks i sjøvann (Tabell 2).

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

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

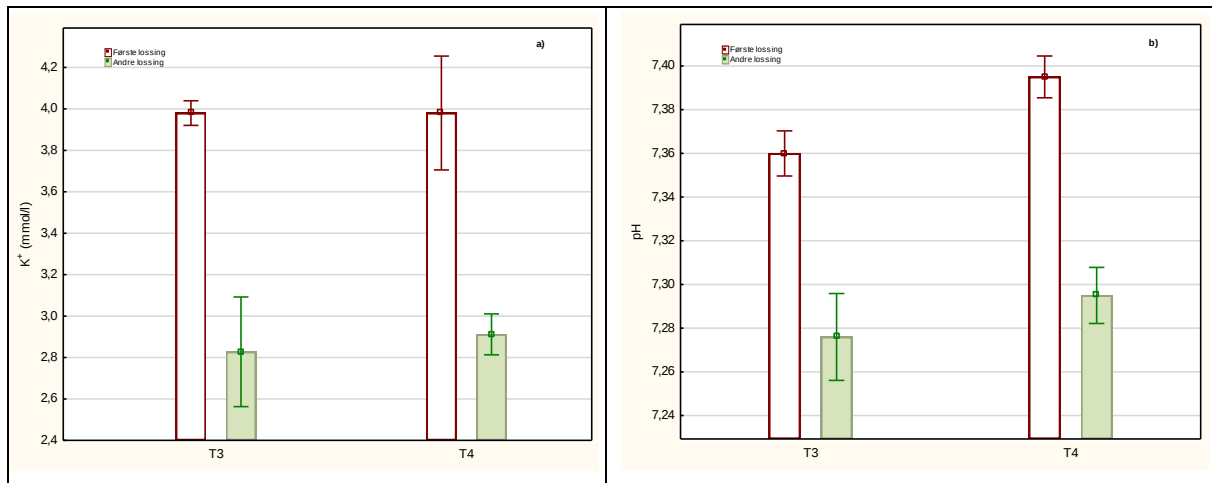
Ved levering av fisk med brønnbåt blir det ofte overført fisk fra samme brønn til flere merder. Dette var tilfelle for transport T3 og T4. Her ble det tatt blodprøver av fisk like før levering til første merd og deretter like før levering til neste merd fra same brønn for å måle om lossing over lengre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



Figur 4. Stressutvikling hos rognkjeks gjennom to fortløpende lossinger fra samme brønn under to forskjellige brønnbåttransporter (T3 og T4). Vertikale linjer på søylene indikerer standard feil (SEM).

For begge gruppene økte gjennomsnittlig plasmakortisol signifikant fra første til andre levering (Figur 4, $p < 0,05$), og det var en signifikant reduksjon i K^+ og pH for begge gruppene mellom første og andre levering (Figur 5, $p < 0,05$). For Cl^- og Na^+ var det ingen systematisk utvikling eller forskjeller mellom gruppene.

T3 ble lastet og losset på dagtid (start kl. 08:30, overskyet), mens T4 ble lastet og losset i mørke (start kl. 19:30). Transporttidene var like, men tiden for opplastingen av T3 var lengre enn T4 (hhv 3,5 og 1 time).



Figur 5. Utvikling i K^+ -ioner (a) og pH (b) i plasma hos rognkjeks gjennom to fortløpende lossinger fra samme brønn under to forskjellige brønnbåttransporter (T3 og T4). Vertikale linjer på søylene indikerer standard feil (SEM).

Skinnhelse

Skinnet og slimlaget utgjør fiskens barriere mot ytre miljø og førstelinjeforsvaret mot infeksjoner, og responderer på endringer i miljøet. Kvantitative analyser av areal (μm^2) og tetthet (% dekning av huden) av slimceller i hud, samt barrierestyrke i huden som funksjon av areal og tetthet av slimceller er brukt som mål på skinnhelse (analysert av QuantiDoc®). Metoden er dokumentert som relevant mål på velferd og helse hos laks, hvor tetthet og barrierestyrke er positivt korrelert med økende fiskevelferd og helse (robusthet overfor ytre miljø).

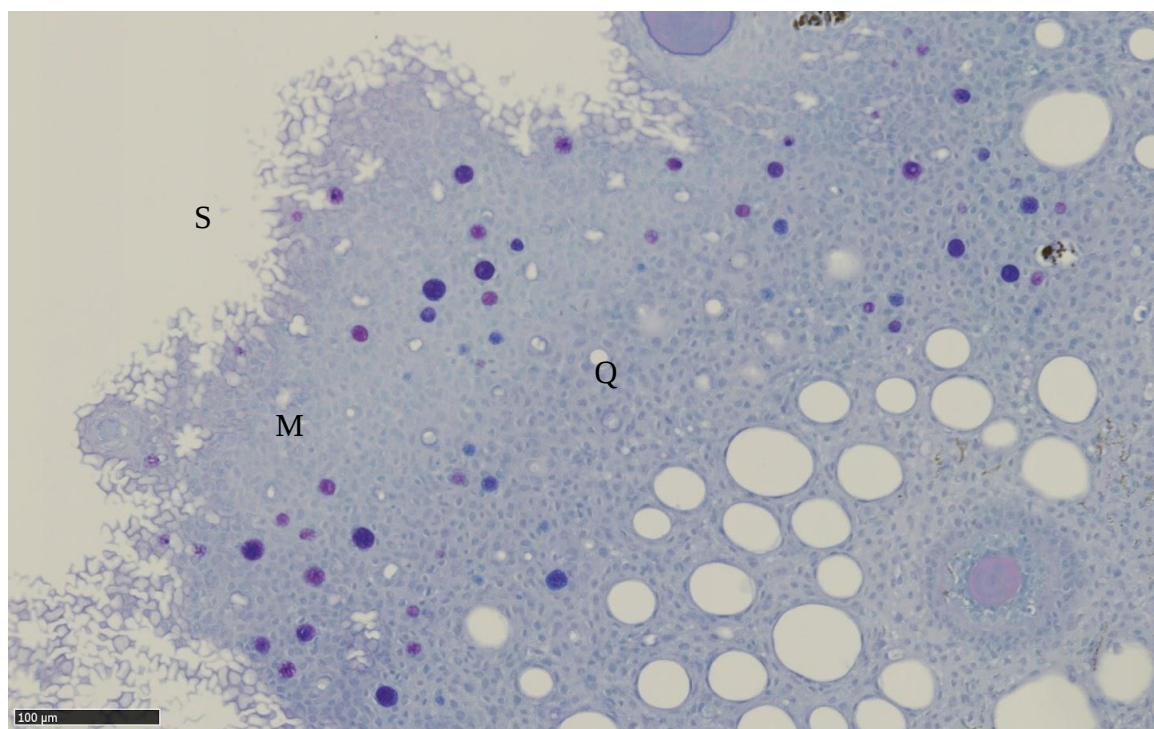


Uttak av skinnprøver fra rognkjeks for slimcelleanalyse.

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

Rognkjeksens hudoverflate er også uvanlig, karakterisert med en frynsete overflate som gir en forøket spesifikk overflate sammenlignet med hud- og slimceller som gjerne er mer avrundede.

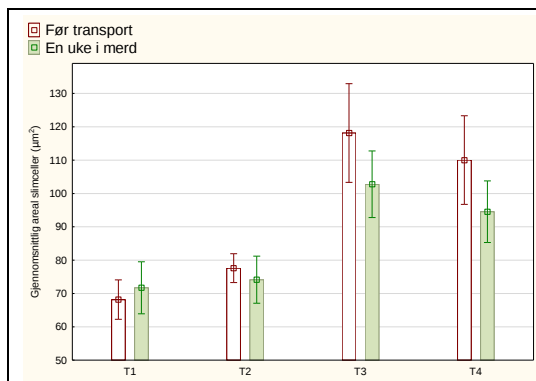
Utviklingen av både slimceller og Q-celler er i dette prosjektet analysert på fisk før transport og etter en uke i sjø som indikator på respons på stress og miljøendringer (Bilde 1).



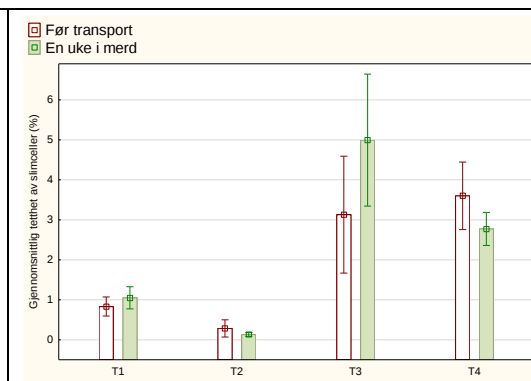
Bilde 1. Tverrsnitt av hud hos rognkjeks med slimceller (små celler, farget mørkeblå, M) og Q-celler (store celler, farget hvit-lyseblå) samt frynsete overflate celler (S).

For slimceller i huden var gjennomsnittlig celleareal (Figur 6), tetthet (Figur 7) og barrierestyrke (Figur 8) høyer for gruppene T3 og T4 sammenlignet med T1 og T2 både før og etter transport. Det var ingen systematisk endring i disse parameterne etter utsett i merd. Nivåforskjellene mellom gruppene kan skyldes fiskebakgrunn eller anleggsspesifikke forskjeller, men det er også spekulert i om sesong kan spille inn (Pittman m.fl., 2013).

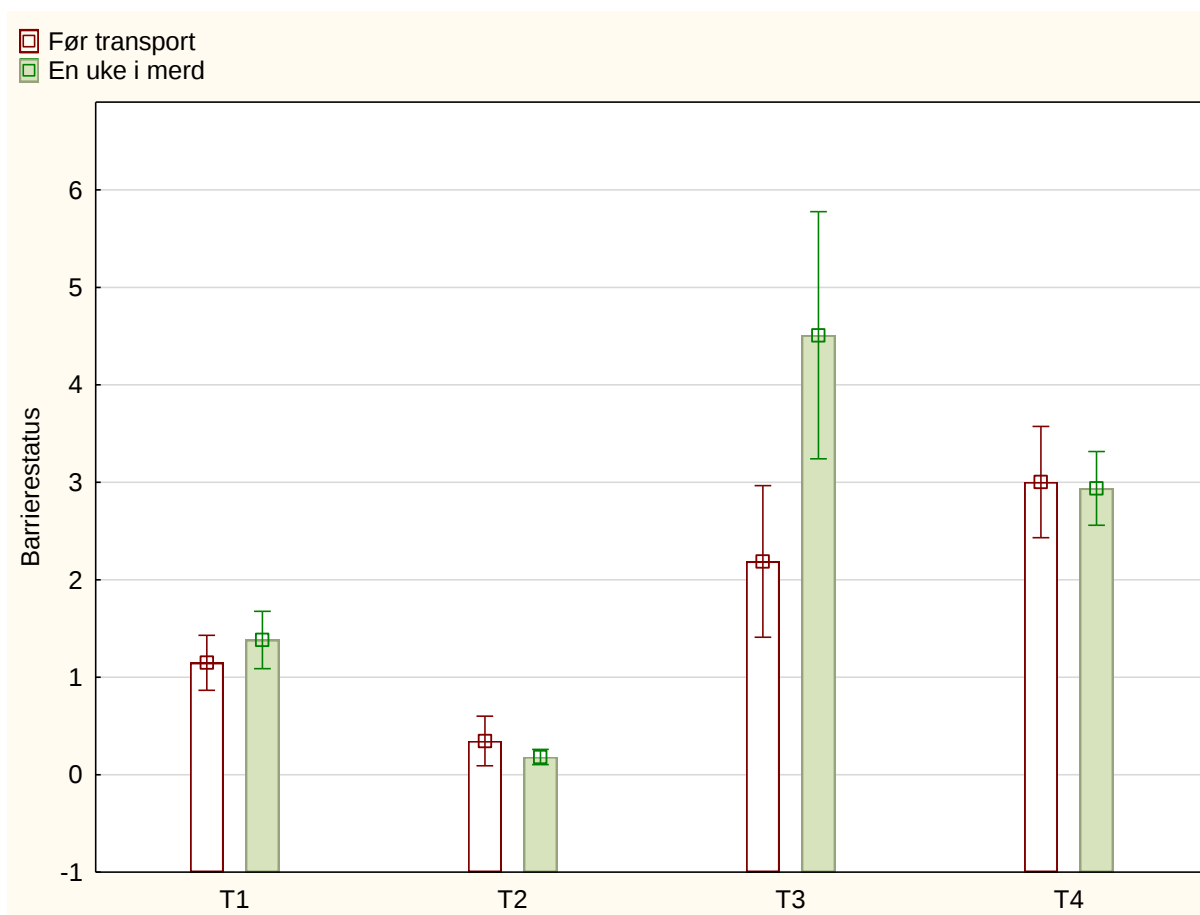
Fisk fra T1 og T2 ble transportert med bil fra samme anlegg og ble satt ut samtidig (1 dag mellomrom) på våren, mens T3 og T4 ble satt ut i desember og transportert med samme båt fra samme anlegg og satt ut samtidig (10 timers mellomrom) i samme fjord (Tabell 1).



Figur 6. Gjennomsnittlig areal (μm^2) av slimceller i hud hos rognkjeks fra fire forskjellige transportere. Vertikale linjer på søylene indikerer standard feil (SEM).



Figur 7. Gjennomsnittlig tetthet (%) av slimceller i hud hos rognkjeks fra fire forskjellige transportere. Vertikale linjer på søylene indikerer standard feil (SEM).



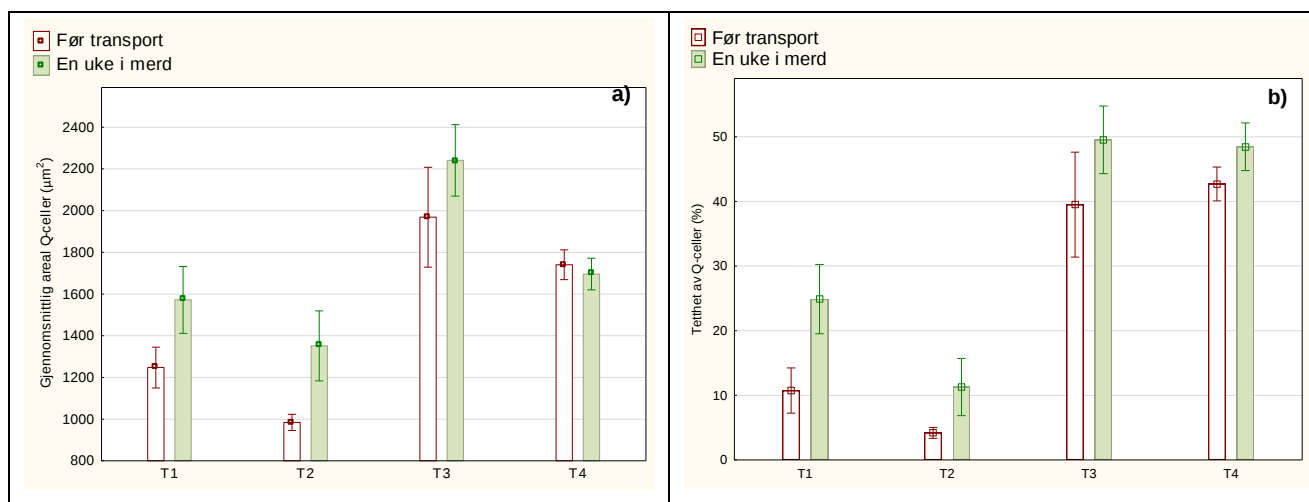
Figur 8. Barrierestatus i hud hos rognkjeks fra fire forskjellige transportere. Vertikale linjer på søylene indikerer standard feil (SEM).

Som for slimceller var det også for Q-celler nivåforskjeller mellom gruppene T1/T2 og T3/T4 i gjennomsnittlig celleareal og tetthet (Figur 9), som kan være relatert til fiskebakgrunn eller sesong.

For Q-celler var det derimot en mer systematisk endring etter utsett i merd, hvor tettheten av Q-cellene generelt økte etter utsett i merd (Figur 9b, $p < 0,05$). Utvikling i arealet av Q-cellene

(Figur 9a) økte også etter overføring til merd, men kun for gruppene med samme opphav satt ut om våren (T1 og T2, $p < 0,05$).

Dette indikerer at morfometriske analyser av utviklingen i Q-celler hos rognkjeks kan være en nyttig responsvariabel i forhold til miljø, men at den er svært kontekstspesifikk. Bl.a. fiskens bakgrunn (miljø, genetikk, ernæring osv.) vil sannsynligvis påvirke miljøresponsen.



Figur 9. Gjennomsnittlig areal av Q-celler (a) og tetthet av Q-celler (b) i hud hos rognkjeks fra fire forskjellige transporter. Vertikale linjer på søylene indikerer standard feil (SEM).

Det ble gjort regresjonsanalyser for å se på sammenhengen mellom skinnhelse og variasjon i plasmakortisol, pH og plasmaioner (Tabell 3). Plasmakortisol og pH viste ingen samvariasjon med noen av målene på skinnhelse.

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

Et intakt slimlag fungerer som en fysisk barriere som i sjøvann reduserer dehydrering og bidrar til å opprettholde osmotisk balanse. Hos laks er det for eksempel vist at innblanding av 20% sjøvann under smoltifisering ga redusert antall slimceller, redusert tykkelse på epiteliet og redusert slimkvalitet, og medførte økt infeksjon med *Moritella viscosa* etter overføring til sjø (Segner m.fl., 2012).

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

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

Sammenlignet med primære stressparametere som kortisol, som fanger opp et øyeblikksbilde, er helse- og velferdsbaserte parametere som f.eks. kvantitative mål på skinnhelse mer robuste siden de akkumulerer negative effekter av stressfaktorer over tid. Slike parametere er også mer direkte relatert til fiskens forsvarsmekanismer (sekundære stressresponser), som indikatorer på immunforsvar og barrierestyrke i forhold til ytre miljø. På den måten er de gode indikatorer på funksjonsforstyrrelser og redusert fiskevelferd (Segner m.fl., 2012), men trenger videre uttesting på rognkjeks for å kunne tolkes i forhold til respons på spesifikke miljø- og stressfaktorer.

Oppsummering og koplinger til miljø og drift

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

Likevel var det nivåer av plasmakortisol for to av transportgruppene (T2 og T3) en uke etter utsett i sjø som indikerte kronisk stress, og det var en betydelig høyere dødelighet i disse gruppene (T2 og T3) 3 mnd. etter utsett. Selv om transportstresset vil være en del av et additivt stress, peker likevel tilbakemeldingene fra oppdrettere i større grad mot operasjonelle forhold (spyling av nøter) og spesielle miljøsituasjoner i merden (kraftig strøm) som primære årsakssammenhenger til den observerte dødeligheten enn mot transportbetingelsene og fiskekvalitet. Dødfisken var også preget av sårskader i perioden(e) med høy dødelighet.

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

Selv om rognkjeks har god toleranse for relativt høye temperaturer og regulerer stress effektivt ved 14 °C, har temperatur betydning både isolert sett og en forsterket betydning spesielt ved høye strømhastighet siden energiforbruket for svømming øker med økende temperatur, og vil kunne gi kronisk stress, avmagring og taperfisk, eventuelt utmattet fisk som ender i notveggen og pådrar seg sårskader som åpner for infeksjoner og alvorlig osmotisk stress pga. vanntap gjennom huden. Forekomst av taperfisk var spesielt rapportert i grupper med høy dødelighet sommerstid på strømssterke lokaliteter (spesielt gruppe T2).

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

I tillegg viste tilbakemeldingene fra oppdretter at bruk av rognkjeks (og sannsynligvis rensefisk generelt) i kombinasjon med andre tiltak (behandling) mot lus dårlig lar seg kombinere og medfører uakseptabel fiskevelferd. Et eksempel var der rognkjeks ble satt ut ved høye lusetall i forsøk på å dempe den videre utviklingen, men hvor det endte opp med avlusning kort tid etter. Strategien bør derfor være å unngå utsett av rensefisk og heller starte utfisking av rensefisk i

perioder hvor lusepresset øker og sannsynligheten for at avlusninger må gjennomføres øker, og heller prioritere tidlig utsett av rensefisk når lusetallene er stabilt lave.

Referanser

- Aas, G.H. (2018). Velferd for rensefisk i merd. Foredrag fra Marin Samlingsarena 15. mai 2018.
- Barton, B.A. (2002) Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integr. Comp. Biol.*, 42: 517–525
- Finstad B., Iversen M., Sandodden R. (2003) Stress-reducing methods for releases of Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts in Norway. *Aquaculture* 222, 203–214.
- Fivelstad, S., Binde, M. (1994). Effects of reduced waterflow in softwater on Atlantic salmon smolts *Salmo salar* L. while maintaining oxygen at constant level by oxygenation of the inlet water. *Aquacult. Eng.* 13, 211–238.
- 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, 1–9, bio036079. doi:10.1242/bio.036079
- Iversen, M., Finstad, B., McCinley, 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.
- Schreck, C.B., Solazzi, M.F., Johnson, S.L., Nickelson, T.E. (1989) Transportation stress affects performance of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Aquaculture* 82(1–4), 15–20.
- Perry, S.F., Gilmour, K.M. (2006). Acid-base balance and CO₂ excretion in fish: unanswered questions and emerging models. *Respir Physiol Neurobiol.* 154(1–2): 199–215.
- Pittman, K., Pittman, A., Karlson, S., Cieplinska, T., Sourd, P., Redmond, K., Ravnøy, B., Sweetman, E. (2013) Body site matters: an evaluation and application of a novel histological methodology on the quantification of mucous cells in the skin of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of fish diseases*, 36(2): 115–127.
- Remen, M., Jonassen, T.M. (2017) Utvikling av transport- og mottaksprosedyrer for rognkjeks basert på kartlegging av miljø og stress. Akvaplan-niva Rapport nr. 7707-1, 71 sider.
- Segner, H., Sundh, H., Buchmann, K., Douxfils, J., Sundell, K. S., Mathieu, C., Ruane, N., Jutfelt, F., Toften, H. & Vaughan, L. (2012) Health of farmed fish: its relation to fish welfare and its utility as welfare indicator. *Fish physiology and biochemistry*, 38(1): 85–105.
- Wendelaar Bonga, S.E. (1997) The stress response in fish, *Physiol Rev.*, 77: 591–630.

Del II: Berggylt: Transport og overføring til merd

Dette er det første studiet som viser responsen hos oppdrettet berggylt på transportbetingelser og miljøendringer etter overføring til merd, med mål om å skaffe bedre forståelse for hvilke forhold som påvirker fiskevelferd og overlevelse i merd. I tillegg til primær stressrespons (kortisol) og osmotisk stress ble nye metoder for vurdering av slimcellestatus (Veribarr®, fra Quantidoc AS) benyttet som mål på endringer i toleranse overfor miljøendringer. Prosjektet ble gjennomført av Akvaplan-niva og finansiert gjennom FHF-prosjekt 901426.

Gjennomføring

Prosjektet fulgte opp fire transporter av berggylt, hvor det ble tatt blodprøver før og etter transport og etter 7-10 dager i merd for å måle effekter av transportstress. Hudprøver for måling av slimcellestatus ble tatt før transport og etter 7-10 dager i merd.

De to første transportene gikk med brønnbåt (T1 og T2) og de to siste med bil og videre sekundærtransport med brønnbåt (T3) eller transportkar på arbeidsbåt (T4). Fisk fra de to første transportene hadde samme bakgrunn, T3 hadde bakgrunn fra RAS og T4 var fra samme anlegg som T1 og T2, men en seinere generasjon. Det var generelt et betydelig innslag av finneerosjon og avstumpet hale i alle gruppene, og spesielt for fisk i de tre først transportgruppene. Spesielt lokalitetene hvor T2 og T3 ble satt ut var betegnet som strømsterke, og temperaturen var spesielt høy på lokaliteten for T2.

Før prøvetaking ble all fisk avlivet v.h.a. en overdose bedøvelse (Finquel, 200 mg/l). Det tok 20-40 sekunder fra fisken ble tatt ut til den var død. I merd skjedde uttak av fisk fra T1 med håv i nærheten av skjul plassert ved merdkant og fisken var bedøvd innen ca. 45 sek. I T2 ble fisk tatt fra liftup etter ca. 2 min. pumpetid og fisken var død etter ytterligere ca. 10 sek. For T3 ble et rensefisk-skjul trukket inn til merdkanten i løpet av 1-2 minutter like før prøvetaking, og fisk håvet direkte over i bedøvelse og avlivet innen ca. 10 sek. I dette prøveuttaket hadde all fisk utspilt tarm gjennom gattet, som tyder på utspilt svømmeblære som følge av trykkforandringer ved oppheising av skjulet. For T4 ble berggylta fisket opp med teiner i fra bunnen av noten (30 m) og fra midten ved skjulet (ca. 10-15 m). Det ble brukt reker som agn. Teinene ble satt dagen før og ble dratt forsiktig opp i løpet av 3-4 minutter påfølgende dag og lagt direkte i en stampe hvor den ble avlivet. Metode for prøvetaking og analysering er gitt i vedlegg 1.

To-veis nøstet ANOVA med grupper nøstet i tidspunkt ble brukt til å undersøke forskjeller mellom tidspunkt uavhengig av gruppe. En-veis ANOVA ble benyttet for å undersøke om det var forskjeller mellom transportgruppene på de enkelte prøvetakingstidspunktene. Signifikante ANOVA ble etterfulgt av Student Newman-Keuls test (SNK) for å identifisere hvilke grupper som var forskjellige. Dersom annet ikke er oppgitt inngikk seks blodprøveanalyser per gruppe per måletidspunkt (n=6) og fem skinnprøver per gruppe per måletidspunkt (n=5). Regresjonsanalyser ble foretatt for å identifisere graden av kausal sammenheng mellom blodparametere og skinnhelse. Signifikansnivå (α) på 0,05 ble brukt i alle analysene.

Beskrivelse av transportene

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

Transport 1 (T1): Direktetransport fra yngelanlegg til merd med liten hurtiggående spesialbygd brønnbåt for rensefisk (brønnvolum 23 m³). Transporttid 15 timer. 2 °C temperaturøkning fra start (12,5 °C i kar) til slutt (14,5 °C i merd). Akkumulert dødelighet i sjø var 13% etter 10 dager og 37,7% etter 3 mnd. Temperatur i perioden økende fra 14,5 til 17,7 °C. Berggylta klarte seg godt gjennom sommeren og høsten. Bortsett fra de først tre månedene etter utsett var det lav dødelighet. Lokaliteten slapp lettere unna luseproblemer enn vanlig med kun to avlusninger av to merder og fire merder uten avlusning. Dette tilskrives utsett av berggylt til rett tid i forhold til økende lusepress og at fisken var aktiv gjennom hele sommeren og høsten. Fisken hadde ved levering stor grad av finneerosjon hvor brystfinner og haler på en god del av individene var fullstendig borte. Dette ble etter en tid helet, men finnene forble avstumpet. Lokaliteten er relativt beskyttet og strømsvak. Kondisjonen til berggylta var bra gjennom sommeren og høsten. Merdene har leppefiskskjul med to fôrspredere over hvert skjul.

Transport 2 (T2): Direktetransport fra yngelanlegg til merd med brønnbåten på 90 m³. Transporttid 32 timer. 3, 7 °C temperaturøkning fra start (12,5 °C i kar) til slutt (16,2 °C i merd). Fisk av opphav fra samme gruppe og anlegg som T1, men forskjellig kar. Det var stor grad av finneerosjon hvor brystfinner og haler på en god del av individene var fullstendig borte. Akkumulert dødelighet i sjø var 17% etter 9 dager og 64,6% etter 3 mnd. Temperatur i perioden økende fra 16,2 til 21 °C. Høye temperaturer hele sommeren helt ned til 50-60 meter, som medførte at berggylta ikke unngikk de høye temperaturene selv om den trakk på dypere vann. Fisk observert via kamera var slapp og hadde liten appetitt, og ble ofte observert presset mot notveggen. Lokaliteten er spesielt strømutsett. All fisk fra denne gruppen gikk ut i løpet av sommeren, og det ble supplert med noe vill leppefisk. Totalt ble det gjennomført fem avlusninger med varmtvann på lokaliteten, mot normalt null.

Transport 3 (T3): Transport fra yngelanlegg med bil (8 timer) via sekundærtransport med brønnbåt (omlastingen til brønnbåt tok ca. 1 time og videre transport i båt 15 timer), total transporttid 24 timer. Liten temperaturendring fra start til slutt (11,5 °C i kar, 11,6 °C ved levering i merd). Akkumulert dødelighet i sjø 1,3% etter 7 dager og 5,8% etter 1 mnd. og 15,11 % ved utslakting av merden etter 2 mnd. Temperatur i perioden avtakende fra 11,6 til 9,8 °C. Lokaliteten ble slaktet ut uke 3 i 2019, og hadde ingen lusebehandlinger siden utsett av berggylt 10. okt. Akkumulert dødelighet på berggylten fram til slakting var 15,11% 12. desember. Fra utsett til slakting var temperaturen jevnt synkende fra 11,6 til 9,8 °C. Lokaliteten ligger åpent til mot havet og er utsatt for perioder med sterk strøm og bølger.

Fisken var oppdrettet i RAS-anlegg, men gikk på gjennomstrømning fra start temperaturakklimering 9 dager før levering. Kvalitetsvurdering av 60 fisk før levering viste relativt stor størrelsesspredning (ca. 30-100 g), lite deformiteter på kjeve og gjeller, men høyt antall fisk med sparsom eller moderat forandringer på brystfinner (58 fisk) eller halefinne (45 fisk). Fiskegruppen utgjorde restpartiet (minstesortering/hale) av 2017 generasjonen.

Transport 4 (T4): Transport fra yngelanlegg med bil (10 timer) via sekundærtransport i 6 stk. 1 m³ transportkar på båt (ca. 1 time omlastning og videre transport på ca. 10 minutter), totalt transporttid ca. 11 timer. Liten temperaturendring fra start til slutt (12,5 °C i kar, 12,4 °C ved levering i merd). Det meste av berggylta hadde avstumpede finner og haler ved levering. Lokaliteten er dyp med moderate strømforhold, men spesielt en episode med sterk nordlig vind ga forhøyet dødelighet. Det var en spesielt god lusesituasjon for denne generasjonen og ingen avlusning på lokaliteten, mens nabolokalitetene hadde store luseproblemer. Akkumulert

dødelighet på berggylt 1,2% etter 7 dager, 4,4% etter 1 mnd. og ca. 20% etter 4 mnd. Avtakende temperatur fra 12,4 til 7,5 °C i perioden.



Uttak av berggylt fra kar vir via fleksislange til brønnbåt.

Tabell 1. Transportforhold for fire forskjellige transporter av berggylt.

Transport oppdrettet berggylt	T1, 28. mai	T2, 29. mai	T3, 10. oktober	T4, 17. oktober
Transportmetode	Spesialbygd brønnbåt	Liten brønnbåt	Bil via liten brønnbåt	Bil via transportkar båt
Transporttid, primærtransport	15 timer (brønnbåt)	32 timer (brønnbåt)	8 timer (bil)	10 timer (bil)
Transporttid, sekundærtransport	-	-	16 timer (brønnbåt)	10 min (transportkar) + 1 time omlasting
Fiskestørrelse (g)	91	70	50	52
Sultperiode (dager)	2	2	2	2
Antall fisk transportert	10 000	34 330	11 519	17 500
Antall fiskekar bil	-	-	9	11
Antall brønner/fiskekar båt	3 stk (4, 6 og 13 m3)	3	3	
Brønnstørrelse bil			2	2
Størrelse brønnbåt	23	90	90	6 stk kar à 1m3
Fisketetthet uder biltransport (kg/m3)	-	-	32	41
Fisketetthet under båttransport (kg/m3)	40	9	6	152
Vannkvalitet under transport				
O2-start	113		Bil: 100, Båt: 100	
O2-slutt	117	102-116	Bil: 105, Båt: 127	101 - 124
pH-start	7,7	-	Bil: ?, Båt: 8,8	
pH-slutt	7,8	-	Bil: ?, Båt: 9,1	7,1 - 7,7
temp °C start	12,5	12,5	Kar: 11,5, Bil: 11,6 Båt: 11,9	12,2
temp °C slutt	15	16,9	Bil: 10, Båt: 11,6	12,7 - 14,5
Forhold i merd etter overføring				
temp i merd ved levering (°C)	14,5	16,2	11,6	12,4
Merdstørrelse	160 m	160 m	157	157
Antall laks	150 000	164 000	169 000	
Blanding av leppefisk og rognkjeks?	ja	ja	Ja	Ja
% innblanding rensefisk totalt (%)		5,50	9,2	10,2
Antall oppdrettet berggylt	3 300	3 400	3 613	
% innblanding oppdrettet berggylt	2,2	0,74	2,1	2,6
% innblanding rognkjeks		1,20	0,5 (usikkert antall)	7,6
% dødelighet etter 7-10 dager	13 %	19 %	1,3	1,16
% dødelighet etter utsett	3 mnd: 37,7%	3 mnd: 64,6%	mnd: 5,76%, 2 mnd 15,11 %	1 mnd: 4,37%, 4 mnd: 20%
temp i perioden med dødelighet	14,5 - 17,7 °C (mai-aug)	16,2 - 21 °C (mai-aug)	11,6 - 9,8	12,4 - 7,5 (okt-jan)



Overføring av rensefisk fra brønnbåt til merd.

Gjennomsnittstall fra kvalitetsvurdering av 50-100 fisk før levering er gitt i Tabell 2. Fisken ble vurdert for brystfinne og halefinneerosjon på en skala fra 0 til 3 hvor 0 = ingen forandring, 1 = sparsom forandring (25-50 %), 2 = moderat forandring (50-75 %) og 3 = uttalt forandring (75-100 %). Prosenttallet oppgitt er i forhold til hvor stor del av brystfinne eller halefinne som er erodert bort. Gjellelokk og kjeve ble også undersøkt, men her var det ingen eller svært få forandringer. Spesielt T1, T2 og T3 fremhever seg med svært store hale- og finneskader på tilnærmet all fisk.

Tabell 2. Gjennomsnittlig kvalitetsscore for rognkjeks i de fire transportgruppene før transport.

Transport nr	Brystfinner	Halefinne	n
T1	2,00	2,23	50
T2	2,16	2,42	50
T3	1,88	2,54	60
T4	1,48	1,00	100

Resultater og diskusjon

De laveste stressnivåene var registrert i T2 og T4 før transport (hhv. 11,4 ng/ml ($\pm 5,9$) og 6,8 ng/ml ($\pm 1,3$)) og ligger på nivå (T4) eller noe høyere (T2) enn hvilenivåer (pre stress nivåer) observert tidligere på berggylt (RENSVEL, Espmark m.fl. 2017), mens de høye stressnivåene etter primær- og sekundærtransportene for T3 og T4 ligger over tre ganger høyere enn de høysete nivåene fra RENSVEL, men på samme nivå som var målt en time etter stress påført berggylt gjennom 20 minutters nedtapping i kar (Iversen 2015). Verdier av plasmakortisol på nivå med T2 etter 10 dager i merd (598 ng/ml (± 357)) er ikke tidligere rapportert på berggylt.

De fire gruppene viste alle forskjellig forløp; T1 hadde en signifikant reduksjon i plasmakortisol etter transport og videre etter utsett i merd ($p < 0,05$), mens T2 hadde en økning ($p < 0,001$). For T3 var det ingen signifikant endring, og for T4 var det en signifikant økning etter primær- og sekundærtransporten ($p < 0,001$), og deretter en nedgang etter utsett i merd.

De relativt store variasjonene i stressforløpet mellom de forskjellige transportgruppene (Figur 1) kan ikke bare tilskrives transportmetode, siden T1 og T2 hadde samme bakgrunn og relativt lik transportmetode og utsettingstidspunkt, men forskjellig utvikling etter utsett i merd. Fraværet av en generell økning av stress gjennom transporten for alle gruppene står i motsetning til det som tidligere er vist ved transport av f.eks. rognkjeks (Remen & Jonassen 2017), og tyder på at andre faktorer har overskygget effekten av forholdene direkte knyttet til transport. Eksempler på slike faktorer kan være stressnivå før transport, miljø- og lokalitetsforhold, samt prøvetakingsmetode.

Forøket plasmakortisol i T1 og T3 før transport indikerer at fisken var stresset i utgangspunktet, enten i forbindelse med selve prøvetakingen, eller forberedelsen av karet for transport. F.eks. ble prøvene fra T1 tatt etter at vannivået i oppdrettskaret som fisken ble levert fra var senket. Tidligere forsøk har indikert at berggylt lett blir stresset av forstyrrelser rundt karet (f.eks. trafikk av folk). For gruppe T4 fikk en mulighet til å undersøke effekt av trenging (forsiktig reduksjon av vannstanden i karet før pumping til transporttanker), og stressnivået på uforstyrret fisk før trenging og fisk under trenging ble sammenlignet. Uforstyrret fisk hadde gjennomsnittlig plasmakortisol på 6,8 ng/ml ($\pm 1,31$) og var signifikant lavere enn hos sammentrengt fisk med 128,4 ng/ml ($\pm 58,26$, $p < 0,01$).

T1 og T2 ble transportert med båt direkte til merd, mens T3 og T4 først gikk med bil og deretter ble lastet om til hhv. brønnbåt og kar på båt for sekundærtransport til merd. Primærtransport med bil (T3 og T4) ga et signifikant høyere stressnivå ($p < 0,01$) sammenlignet med brønnbåttransport (T1 og T2). Forskjeller i transporttid kan ha spilt inn, og gitt fisken bedre tid til å stresse ned ved lengre transporttid, som vist for laks (Iversen m.fl. 2005) og rognkjeks (Remen & Jonassen 2017). Forskjellene kan også være knyttet til størrelse, siden større fisk var transportert med båt enn med bil. Men det er også mulig at spesielle forhold med båttransport har vært gunstig for nedstressing under transport. Fisketetthet peker seg ikke ut (relativt like mellom T1, T3 og T4), men dersom berggylt er spesielt følsom for vannkvalitet (noe en vet lite om) kan bedre vannkvalitet (utover de parameterne som er målt) som følge av kontinuerlig vannutskifting under transport med brønnbåt ha virket positivt. Transportforholdene det her er referert til er oppgitt i Tabell 1.

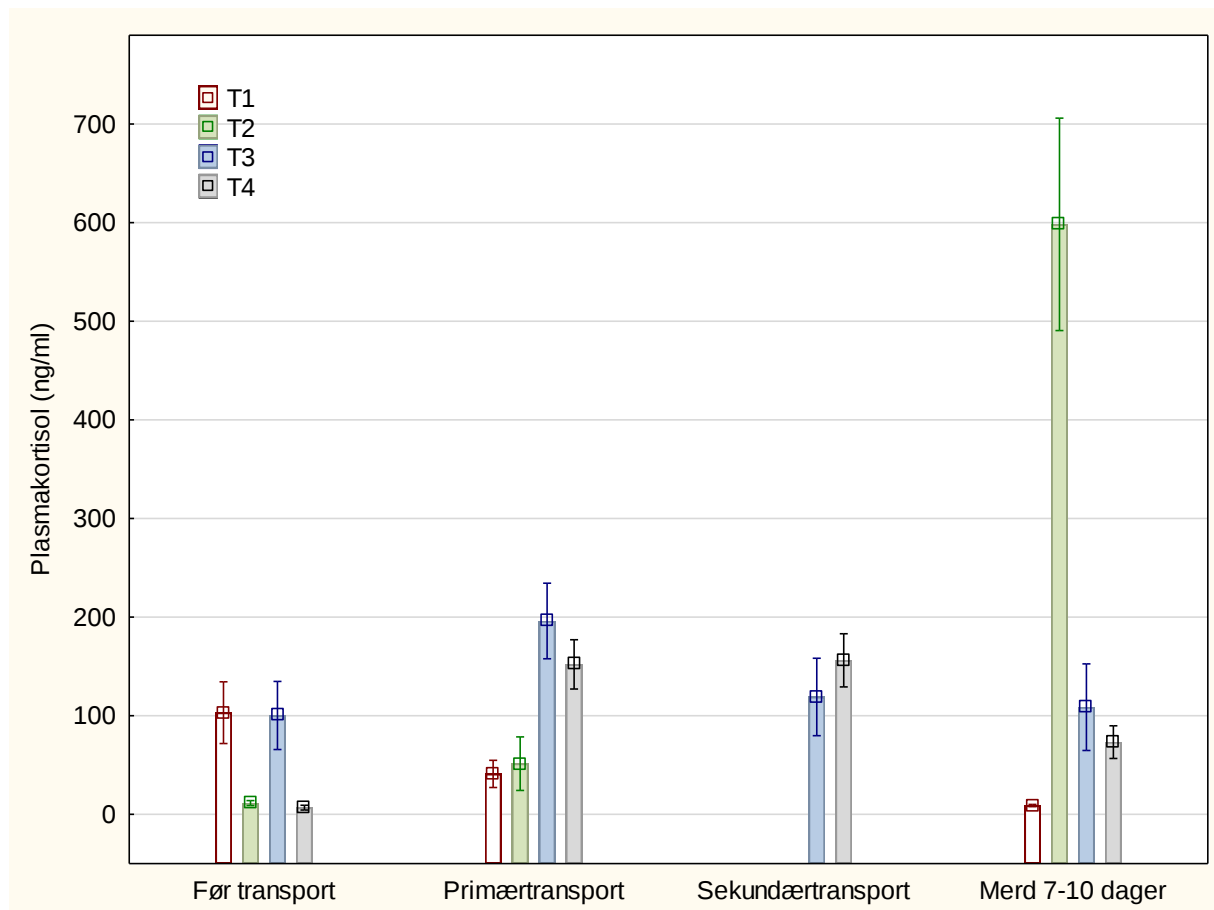
Omlasting fra bil og videre transport i brønnbåt (T3) eller i transportkar på båt (T4) ga ingen videre økning i stress, slik en tidligere har sett under sekundærtransport av rognkjeks. For T3 var det endog en antydning til redusert stress etter sekundærtransporten, som kan ha sammenheng med at fisken fikk god tid til å stresse ned under den 16 timer lange sekundærtransporten i brønnbåt under gode miljøforhold (Tabell 1).

T1 hadde lavest stressnivå av alle gruppene etter 7-10 dager i merd, mens de andre gruppene hadde forhøyede nivåer, som var spesielt dramatisk for T2 (Figur 1). T2 hadde også klart høyere dødelighet enn alle andre grupper, også T1 med relativt lik bakgrunn, etter både 7-10 dager og 3 mnd. i merd (Tabell). På samme måte som tidligere vist på rognkjeks treffer dermed plasmakortisol målt etter utsett i merd bra som prediktor for videre utvikling i dødelighet, med positiv korrelasjon mellom plasmakortisol målt i merd etter utsett og økt dødelighet.

De mest iøynefallende forskjellene mellom disse relativt sammenlignbare gruppene (T1 og T2) er likevel ikke transportforholdene, men miljøforholdene på lokalitetene, hvor høy temperatur og sterk strøm i T2 kan ha vært spesielt stressende for fisken.

Fisken i T2 hadde avstumpede brystfinner og halefinner i omtrent samme grad som i gruppe T1 (fisken var fra samme produksjonsgruppe), som gjerne er spesielt problematisk under de vanskelige strømforholdene.

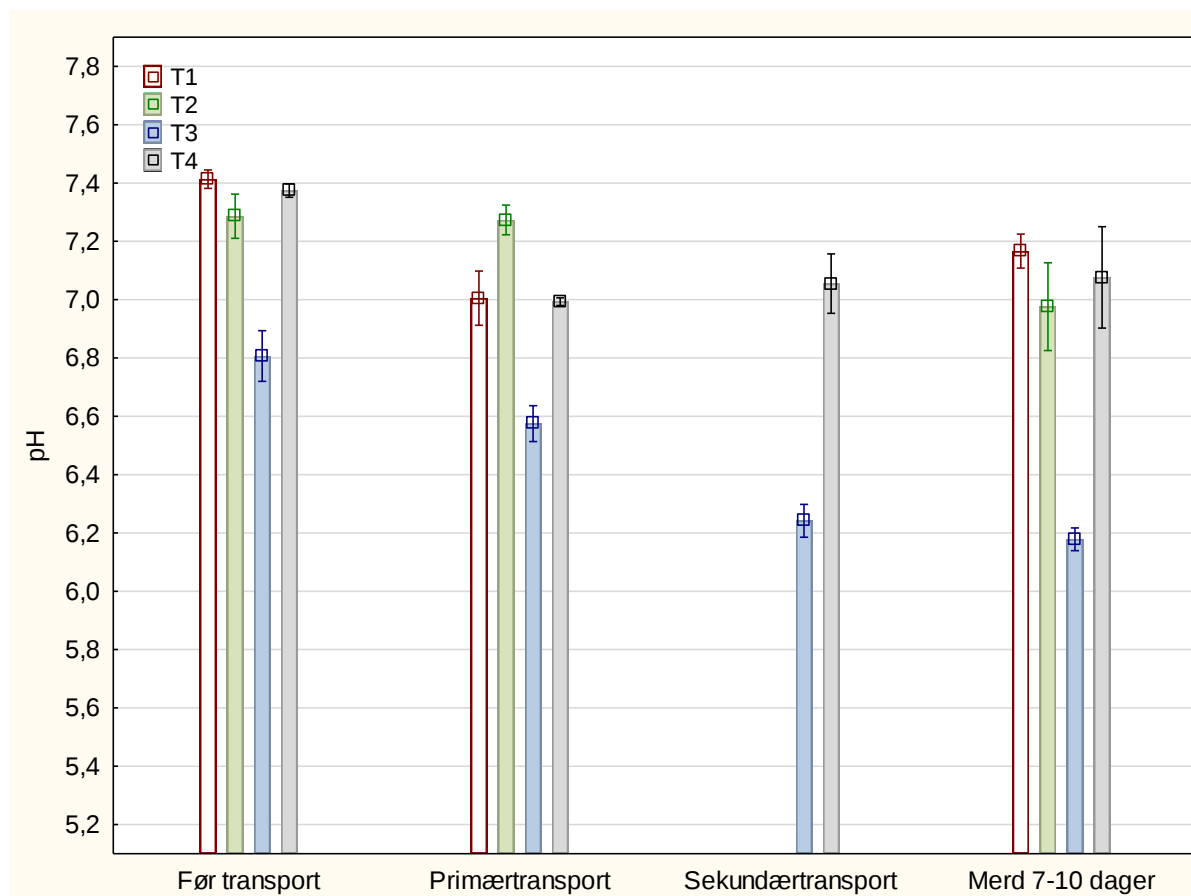
Et annet viktig forhold som kan ha spilt inn er prøvetakingsmetoden hvor uttaket av berggylt i T2 skjedde fra dødfiskhåven, mens prøver fra de andre gruppene ble tatt fra skjulet. Det var kun her fisk var å få tak i på det tidspunktet. Ulikt uttakssted og metode kan ha medført uttak av fisk av ulik kvalitet eller fysiologisk status. Uansett metode er det vanskelig å få representative prøver fra merd, og adferd og plassering i merd kan gjenspeile forskjellig stress eller fysiologisk tilstand på fisk (Kane m.fl. 2004).



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

pH og osmotisk stress

Kortisol har en viktig rolle i reguleringen av energiomsetningen (aktivitet) og saltbalansen hos fisk. Endringer i pH og ione-sammensetningen i blodplasma er derfor typiske sekundære stressresponser. Kraftig stress vil vanligvis (gjennom bl.a. økt permeabilitet over gjeller og tarm og økt respirasjonsrate) gi økt ionenivå hos fisk i sjøvann (dehydrering/osmotisk stress), og redusert pH påvirket av økt CO_2 i blodet som følge av økt aktivitet. Variasjonen i pH og et sett med ioner som inngår i fiskens aktive osmoregulering (Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{2+}) ble derfor analysert fra blodplasma for å kartlegge sekundære stressresponser.



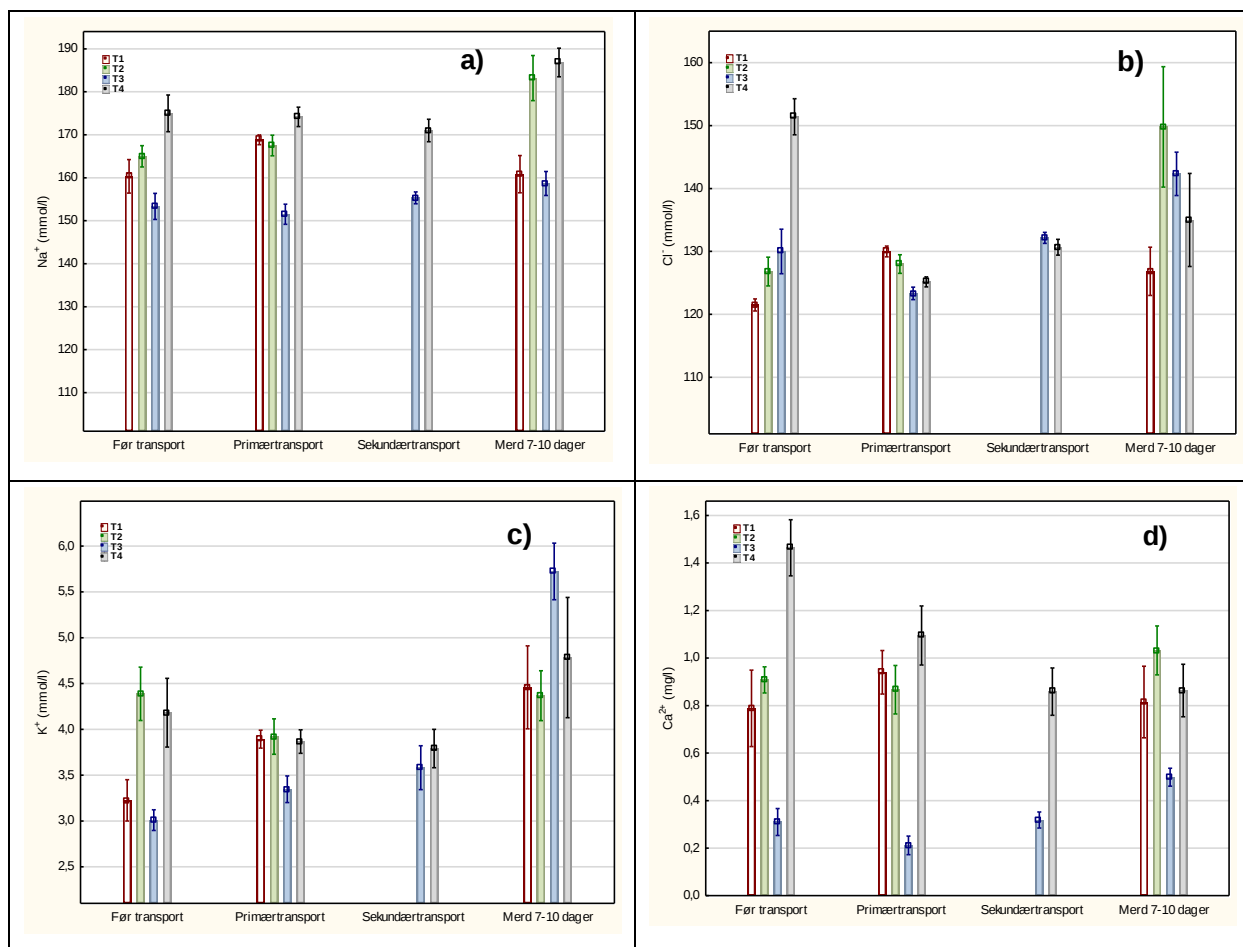
Figur 2. Plasma pH hos oppdrettet berggyllt på forskjellige stadier under transport og 7-10 dager etter utsett i merd. Vertikale linjer på søylene indikerer standard feil (SEM).

Alle gruppene fikk redusert pH etter utsett i sjø sammenlignet med før transport ($p < 0,001$ samlet sett for alle gruppene slått sammen), og tyder på økt aktivitet etter utsett i merd. T3 (fisk med bakgrunn fra RAS-anlegg) hadde de klart laveste pH-verdiene ved alle måletidspunktene (Figur 2). Mellom de andre gruppene var endringen mer moderat. For pH var det ingen sammenheng med stressrespons og overlevelse etter utsett i merd.

Generelt for alle gruppene, kun bortsett fra T4 hvor Cl^- er mer varierende, får fisken en økning plasmaioner (Na^+ , Cl^- og K^+) etter overføring fra kar til merd (Figur 3a, b og c). Dette antyder en generell risiko for økt osmotisk belastning (økt sekundært stress) etter overføring til merd. Nivåene er likevel ikke å anse som kritiske eller spesielt belastende vurdert opp mot normale verdier for annen marin fisk og laks (oppsummert i Noble m.fl. 2018). Den generelle trenden for Ca^{2+} viseringen liten eller ingen endring etter utsett i merd.

Variasjonen i dødelighet i merd etter 7-10 dager hadde sannsynligvis ingen sammenheng med ione-status i fisken (osmoregulering) på det tidspunktet. I den seinere dødelighetsutviklingen 2-4 mnd. etter utsett i merd (Tabell 1), kan osmotisk stress forbundet med den økte forekomsten av sårskader som gir økt lekkasje fra huden, vært medvirkende årsak til dødeligheten.

Fisk fra T3 som var oppdrettet i RAS-anlegg, pekte seg ut med høyest K^+ -konsentrasjoner og lavest Ca^{2+} -konsentrasjoner 7 dager etter utsett i merd sammenlignet med de andre gruppene. Sammen med den spesielle utviklingen i pH kommentert ovenfor, viser dette et behov for å se nærmere på om fisk fra RAS-miljø tilpasser seg miljøet i sjø annerledes.



Figur 3. Konsentrasjoner av Na⁺ (a), Cl⁻ (b), K⁺ (c) og Ca²⁺ (d) målt i blodplasma fra oppdrettet berggylt på forskjellige stadier under transport og 7-10 dager etter utsett i merd. Vertikale linjer på søylene indikerer standard feil (SEM).

Skinnehelse

Fiskens skinn og slimlag er den viktigste barrieren mot det ytre miljø, og utgjør bl.a. førstelinjeforsvaret mot infeksjoner (Elliot 2011). Slimcellene inneholder bl.a. hydrolytiske enzymer og uspesifikke antistoffer som virker mot bakterier, sopp, virus og parasitter. Metoder for kvantifisering av slimceller fra hud kan benyttes i kartlegging av stress og miljøresponser (Vatsos m.fl. 2010, Pittman m.fl. 2013).

I denne undersøkelsen av berggylt ble hudprøver på ca. 1 x 2 cm tatt fra høyre side like over sidelinjen og bak brystfinnen (Bilde 2) før transport og i merd 7-10 dager etter transport. Hudskader var tilstede med både avstumpet hale og finneslitasje. Variasjon i antallet og tettheten av slimceller kan ha sammenheng med avstand til og alvorligheten av de eksisterende hudskadene (Jensen m.fl. 2015, <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10695-015-0105-2>).

Bilde 2. Berggyllt fra T1 før transport etter blodprøvetaking og uttak av skinnprøve.

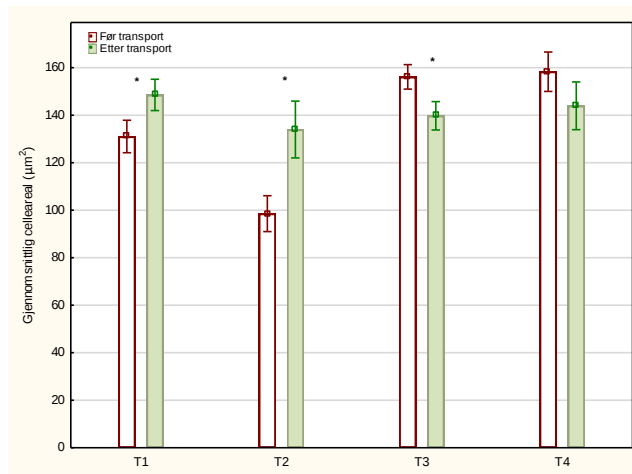


Det er vist at en rekke miljøfaktorer påvirker morfologien og strukturen til slimcellene i huden, og at endringer i slimcellestatus kan indikere stress. En kvantitativ analyse av slimcellestatus (Quantidoc) basert på måling av størrelse (areal) og tetthet av slimceller (som % av epitelets totale overflate) gir et mål på barrierestyrke, som gir indikasjoner på om huden er i en hviletilstand eller i responderende modus overfor stress, infeksjoner og miljøendringer. Typisk funksjonell respons på en infeksjon eller miljøendring hos laks er at få og store slimceller erstattes av flere og mindre celler.

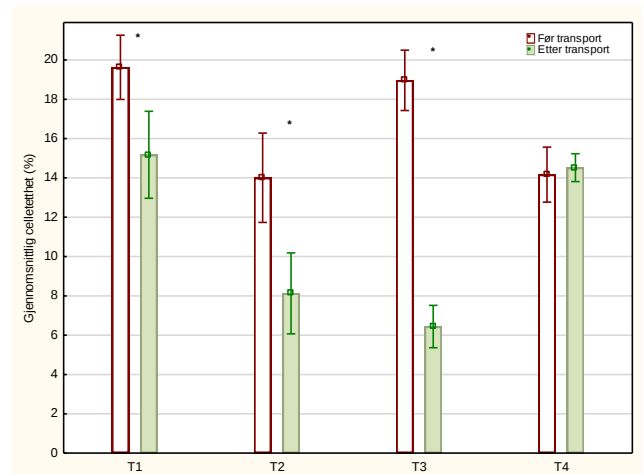
Denne kvantitative analysen av cellestatus er den eneste statistiske robuste og objektive metode for kvantifisering av størrelse, tetthet og dynamikken til slimceller, og er derfor et viktig verktøy for overvåking og forbedring av fiskehelse og velferd. Metoden er tidligere dokumentert på laks, seabass, yellowtail, ørret, rognkjeks og ulke, men er ikke tidligere brukt på berggyllt.

Prøvene fra berggyllt i kar før transport viste relativt stor variasjon i celleareal mellom gruppene, men ingen forskjell i cellestørrelse etter 7-10 dager i merd (Figur 4). For T1 og T2 medførte en overgang fra kar til merd en økning i cellestørrelse, og for T3 og T4 en reduksjon, som var signifikant kun for T3 (som hadde bakgrunn fra RAS-anlegg).

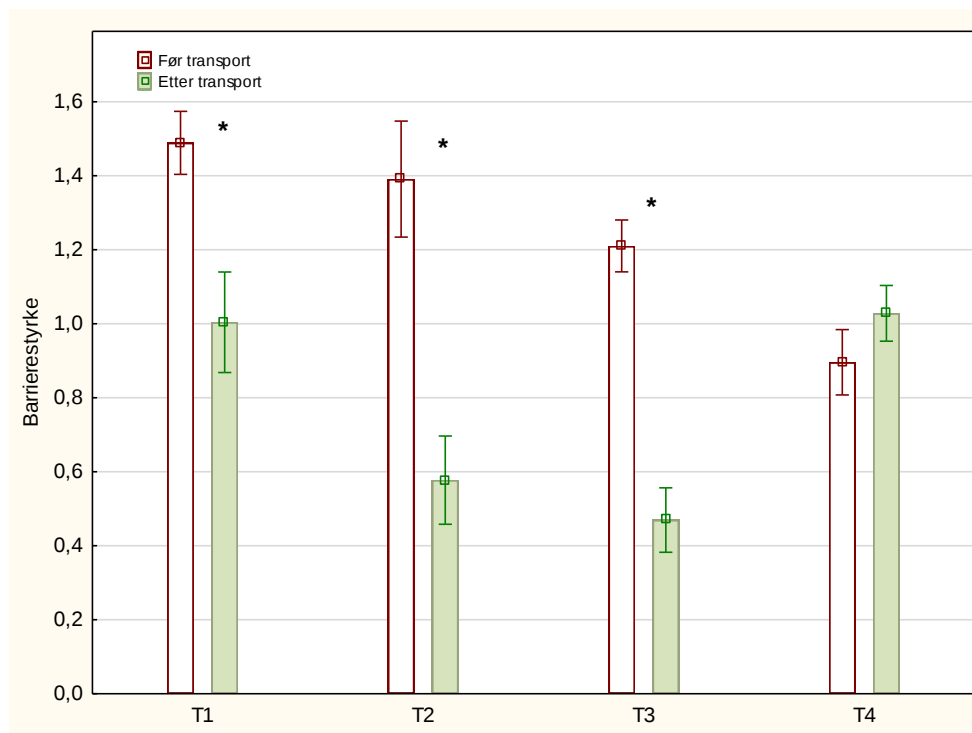
For alle gruppene bortsett fra T4 var det en reduksjon i tettheten av slimceller (Figur 5) og barrierestyrken i huden etter overføring fra kar til merd (Figur 6). For T4 var det ingen endring. Respons på skinnhelse hos berggyllt er ikke testet systematisk i forhold til varierende miljø og stress, men endringen fra kar til merd i tre av gruppene tyder på at skinnhelse er en interessant parameter for måling av endringer i robusthet og førstelinjeforsvaret hos berggyllt. Slik effekt på størrelse og tetthet av slimceller er vist som respons på en rekke miljøfaktorer hos fisk tidligere, f.eks. pH, salinitet, oksygen og nitrat (oppsummert i Nobel m.fl. 2018) ved miljøendringer. Videre er det tidligere vist at laks produsert ved 4 °C hadde lavere slimcelletetthet enn laks produsert ved 16 °C (Jensen mfl. 2015). Det er derfor mulig at temperaturendringer ved overføring fra kar til merd har vært medvirkende årsak til endringen i celletetthet og barrierestyrke på berggyllt etter transport.



Figur 4. Gjennomsnittlig areal (μm^2) av slimceller i hud hos oppdrettet berggyllt fra fire forskjellige transportere. Vertikale linjer på søylene indikerer standard feil (SEM). Signifikant forskjell innad i gruppene (en-veis ANOVA, $p < 0,05$) er indikert med *.



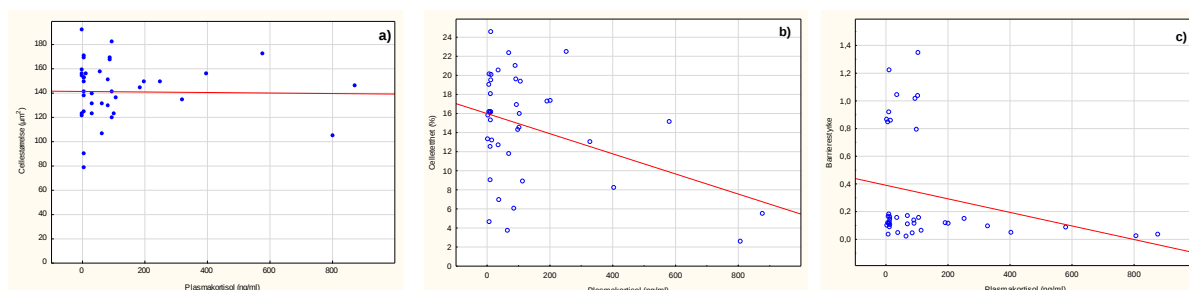
Figur 5. Gjennomsnittlig tetthet (%) av slimceller i hud hos oppdrettet berggyllt fra fire forskjellige transportere. Vertikale linjer på søylene indikerer standard feil (SEM). Signifikant forskjell innad i gruppene (en-veis ANOVA, $p < 0,05$) er indikert med *.



Figur 6. Barriestatus i hud hos ioppdrettet berggyllt fra fire forskjellige transportere. Vertikale linjer på søylene indikerer standard feil (SEM). Signifikant forskjell innad i gruppene (en-veis ANOVA, $p < 0,05$) er indikert med *.

Sammenheng mellom primær stressrespons og skinnhelse

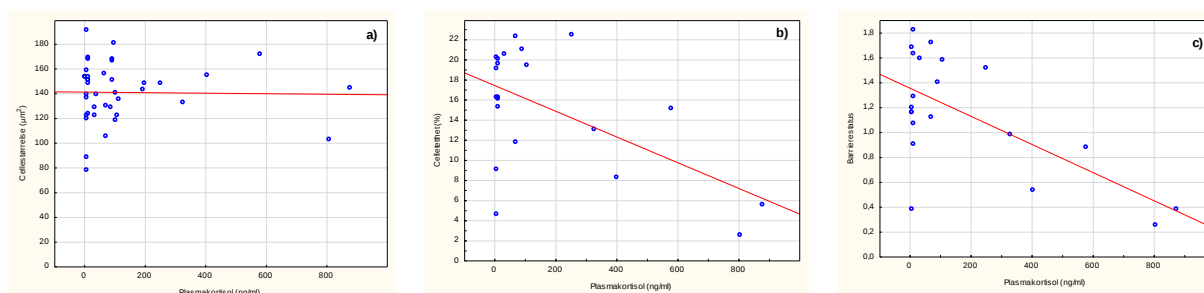
Regresjonsanalyser basert på all prøvene ($n = 40$) viste en negativ sammenheng mellom plasmakortisol og celletetthet (Figur 7b, $b = -0,39$, $R^2 = 0,15$, $p < 0,05$), men ingen sammenheng mellom plasmakortisol og cellestørrelse (Figur 7a, $b = -0,02$, $R^2 = 0,00$, $p = 0,9$) eller plasmakortisol og barrierestyrke (Figur 7c $b = -0,25$, $R^2 = 0,06$, $p = 0,12$).



Figur 7. Forholdet mellom plasmakortisol og skinnhelse hos oppdrettet berggyllt for sammenslåtte data fra gruppene T1-T4.

Tilsvarende regresjonsanalyser basert på sammenslåtte data ($n=21$) fra kun T1 og T2 (fisk av samme opphav, alder og utsettingstidspunkt) viste ingen sammenheng mellom plasmakortisol og cellestørrelse (Figur 8a, $b = 0,14$, $R^2 = 0,02$, $p = 0,55$), men det var et signifikant negativt lineært forhold mellom plasmakortisol og celletetthet (Figur 8b, $b = -0,57$, $R^2 = 0,33$, $p < 0,01$) og plasmakortisol og barrierestyrke (Figur 8c, $b = -0,65$, $R^2 = 0,42$, $p < 0,01$).

Potensialet for bruk av slim som biomarkør for stress hos fisk har blitt beskrevet som lovende, bl.a. basert på evalueringer på oppdrettsfisken meagre (*Argyrosomus regius*) eksponert for bl.a. håndteringsstress, hvor statistiske analyser viste en positiv relasjon mellom plasmakortisol og stressmarkører i slim (Fernández-Alaci m.fl. 2019).



Figur 8. Forholdet mellom plasmakortisol og skinnhelse hos oppdrettet berggyllt for sammenslåtte data fra gruppene T1 og T2.

Sammenhengen mellom slimcellestatus og plasmaioner (Tabell 3) viser en negativ korrelasjon mellom celletetthet og Cl^- og K^+ . Dette indikerer økt osmotisk stress ved redusert tetthet av slimceller. Det er en positiv korrelasjon mellom celletetthet og pH.

Tabell 3. Regresjonskoeffisient (R) og p-verdier (p) fra regresjonsanalyser mellom slimcellestatus og blodfysiologi (analyser av kortisol, pH og ioner fra plasma) hos oppdrettet berggylt.

Berggylt n=40	Kort			pH			Na+			Cl-			K+		
	b	R ²	p	b	R ²	p	b	R ²	p	b	R ²	p	b	R ²	p
Areal slimceller	-0,02	0,00	0,90	-0,1	0	0,54	0,19	0,04	0,23	0,31	0,1	< 0,05	-0,16	0,03	0,32
Celletetthet slimceller	-0,39	0,15	< 0,05	0,35	0,12	< 0,05	-0,13	0,02	0,42	-0,34	0,12	< 0,05	-0,43	0,18	< 0,01
Barrierestatus slimceller	-0,25	0,06	0,12	0,16	0,03	0,31	0,5	0,25	< 0,01	0,22	0,05	0,18	0,16	0,03	0,31

Slimcellestatus hos berggylt viser et potensiale som verktøy i overvåking og dokumentasjon av robusthet og sykdomsresistens som respons på stress og miljøendringer hos berggylt, og som styringsverktøy i forhold til forbedring av fiskevelferd. Det er behov for å verifisere dette i kontrollerte studier med fisk under ulike stress- og miljøforhold.

Konklusjoner

Forholdene på lokaliteten og drift har sannsynligvis større betydning for overlevelse etter utsett i merd enn stressbelastningen forbundet med selve transporten. Miljømessig ser strøm og temperatur ut til å ha stor betydning, og spesielt i kombinasjonen sterk strøm og høye temperaturer. Av driftsmessige forhold som påvirker negativt er håndtering i forbindelse med avlusning av laks og spyling av nøter som øker risikoen for sårskader på rensefisk.

Lokaliteten med spesiell høy temperatur og sterk strøm ga svært høy stressbelastning og dødelighet. Kritisk vurdering av miljøforholdene når en velger lokalitet og tidspunkt for utsett vil sannsynligvis ha stor betydning for overlevelse og fiskevelferd i merd.

Berggylta er følsom for stress påført i kar i forbindelse med klargjøring for transport, som kan være knyttet til nedtapping av kar og trenging. Transporter under gode forhold med lang nok varighet kan bidra til å redusere dette utgangsstresset. Gunstige forhold for berggylt for nedstressing under transport ser ut til å være enklest å oppnå i brønnbåt med åpen sirkulasjon.

Det ser ikke ut som sekundærtransport (flytting fra bil til båt for videre transport til merd) gir additivt stress på samme måte som hos rognkjeks, men bør likevel unngås for å redusere potensielle risikoer forbundet med ekstra håndtering av fisken og omlasting.

Analyser av pH og plasmaioner indikerer generelt økt aktivitet og osmotisk belastning for berggylt etter utsett i sjø, men ikke på nivåer vurdert som kronisk belastende.

Prøvetaking i merd er utfordrende med tanke på å få et best mulig bilde på velferden, spesielt for å fange opp variasjonen mellom aktiv fisk og miljøtilpasset fisk og kronisk mistilpasset fisk (taperfisk). Forskjeller i adferd og plassering i merd mellom fisk av ulik kvalitet krever et mer selektivt uttak av fisk fra forskjellige steder i merden for å dekke mest mulig av variasjonen i fiskepopulasjonen.

Analyser av slimcellestatus er et lovende verktøy, og viste systematiske endringer ved overføring av fisk fra kar til merd, samt en direkte sammenheng med stress.

Det er behov for utvikling av gode metoder for måling av fiskens robusthet og respons på stress og miljøforhold for dokumentasjon og styring mot bedre fiskevelferd, spesielt i merd hvor slike utfordringer er store. Metodene kan med fordel inkludere analyser av slimcellestatus som mål

på utvikling av barrierestatus, men må verifiseres i flere studier med berggylt under ulike miljøforhold for å gi bedre grunnlag for tolking.

Referanser

- Elliott, D.G. (2011). THE SKIN. The Many Functions of Fish Integument. In: Farrell AP (Editor) *Encyclopedia of Fish Physiology*. Academic Press, San Diego, side 471-475
- Espmark, Å.M., Berge, B., Kolarevic, J., Aas, G.H., Lein, I. (2017). Velferd hos rensefisk – operative velferdsindikatorer (2015 – 2018), FHF Havbrukssamling Bergen 11.10.2016.
- Fernández-Alaci, L., Sanahuja, I., Ordóñez-Grande, B., Sánchez-Nuño, S., Herrera, M., Ibarz, A. (2019). Skin mucus metabolites and cortisol in meagre fed acute stress-attenuating diets: Correlations between plasma and mucus. *Aquaculture*, (499), 185-194.
- Iversen, M. (2016). Effekten av akutt stress på berggylt og rognkjeks. Presentasjon, FHF-Rensefiskkonferanse, Gardermoen, 8-9 februar 2016.
- Iversen, M., Finstad, B., McCinley, 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.
- Jensen, J., Wahli, T., McGurk, C., Eriksen, T.B., Obach, A., Waagbø, R., Handler, A., Tafalla, C. (2015). Effect of temperature and diet on wound healing in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) *Fish Physiology and Biochemistry* 41 (6), 1527-1543.
- Kane, A.S., Salierno, J.D., Gipson, G.T., Molteno, T.C.A., Hunter, C. (2004). A video-based movement analysis system to quantify behavioral stress responses of fish. *Water Research*, 38(18), 3993-4001.
- Noble, C., Nilsson, J., Stien, L. H., Iversen, M. H., Kolarevic, J. & Gismervik, K. (2018). Velferdsindikatorer for oppdrettslaks: Hvordan vurdere og dokumentere fiskevelferd. 328pp. ISBN 978-82-8296-531-6.
- Pittman, K., Pittman, A., Karlson, S., Cieplinska, T., Sourd, P., Redmond, K., Ravnøy, B., Sweetman, E. (2013). Body site matters: an evaluation and application of a novel histological methodology on the quantification of mucous cells in the skin of Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* 36, 115-127
- Remen, M., Jonassen, T.M. (2017) Utvikling av transport- og mottaksprosedyrer for rognkjeks basert på kartlegging av miljø og stress. Akvaplan-niva Rapport nr. 7707-1, 71 sider.
- Vatsos, I.N., Kotzamanis, Y., Henry, M., Angelidis, P., Alexis, M. (2010). Monitoring stress in fish by applying image analysis to their skin mucous cells. *European Journal of Histochemistry* 54,107-111

Del III: Rognkjeks: Toleranse for brå temperaturoverganger

Bakgrunn

Forhold knyttet til transport eller miljøovergangen fisk opplever ved overføring fra kar på land til den settes ut i laksemerder i sjø har vært pekt på som mulige forklaringer på varierende overlevelse på rensefisk etter utsett i merd.

Rognkjeksen settes ut store deler av året, og opplever ofte en brå økning eller reduksjon i temperatur sammenliknet med temperaturen i oppdrettskar. Det kan være fordelaktig mht. god kontroll med lakselusa å sette rognkjeks ut tidlig på våren. Fisken utsettes da for et betydelig temperaturopp. Tilsvarende vil fisken kunne oppleve brå temperaturøkninger ved utsett seint om høsten. For rognkjeks har man fra tidligere forsøk funnet indikasjoner på at en temperaturøkning fra 8 til 12 °C er uproblematisk (Remen og Jonassen 2017), men fysiologisk respons og stress ved større temperaturøkninger eller plutselige temperaturopp er interessant å undersøke nærmere.

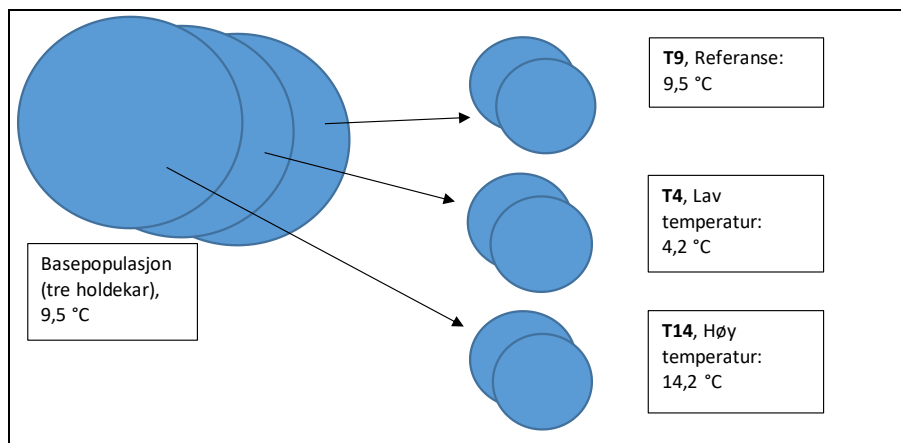
Kontrollerte forsøk i kar ble derfor gjennomført ved Akvaplan-niva sitt Forsknings- og Innovasjonsstasjonen avd. Kraknes (FISK) i Tromsø for å skaffe mer kunnskap om stressrespons ved temperatursprang hos rognkjeks, og om hvordan temperaturen spiller inn ved restituering etter en stressbelastning.

Frisk fisk responderer på forskjellige typer stress (stressfaktorer) bl.a. gjennom oppregulering av stresshormonet kortisol, som mobiliserer en rekke fysiologiske og atferdsmessige responser som hjelper fisken til å takle trusler eller miljøendringer. Plasmakortisol fra blodprøver av rognkjeks flyttet fra en akklimatiseringstemperatur på 9,5 °C til høyere, lavere eller lik temperatur ble derfor analysert for å sammenligne stressrespons i forhold til brå temperaturoverganger. Sekundære stressresponser som endringer i plasmaioner (Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{2+}) og plasma-pH ble også målt.

Materiale og metode

Forsøksfisken ble klekket og startfôret ved forskningsstasjonen FISK i januar 2018 og overført til tre oppdrettskar (holdekar) à 1,5 m³ den 16. august 2018 for akklimatisering. Ved forsøksstart 3. september 2018 ble fisken overført direkte fra holdekarene på 9,5 °C til forsøkskarene. Overføringen skjedde med 60 min mellomrom mellom hver forsøksgruppe og slik at fisk fra hvert av de tre holdekarene gikk til respektive forsøksgrupper for å minimalisere forskjeller i stress mellom gruppene påført i forbindelse med overføring av fisken.

Følgende tre forsøksgrupper ble satt opp (Figur 1): T9 (referansegruppe, stabilt 9,5 °C, overført kl. 10:00), T4 (overgang fra 9,5 °C til 4,2 °C, overført kl. 11:00); T14 (overgang fra ca. 9,5 °C til 14,2 °C, overført kl. 12:00).



Figur 1. Forsøksoppsett med to parallelle forsøkskar per temperaturgruppe.

Hver temperaturgruppe var representert med to parallelle kar à 110 L og 40 fisk à 46,6g ($\pm 4,3$ g) i hvert kar, totalt 80 fisk per gruppe (Bilde 1). Vannutskiftingen i karene var ca. 80 liter per time. Fisken var sultet en dag før forsøksstart.

Overføring av fisk skjedde ved håving over i bøtter, og fisken ble båret over til forsøkskarene. Dette utgjorde totalt en håndteringstid på ca. 2 minutter før overføring til forsøkskarene. Fisken var akklimatisert til en lysintensitet på $3,3 \mu\text{mol m}^{-2}\text{S}^{-1}$ i oppdrettskarene og fikk en økning i lysintensitet til $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{S}^{-1}$ etter overføring til forsøkskarene.



Oversikt over forsøksfasilitetene.

Forsøket varte i 72 timer med prøvetaking av 6 fisk fra hver gruppe (3 fra hver parallell) etter 1, 8, 24 og 72 timer. 0-prøver (referanse fra ubehandlet fisk) fra 6 fisk ble tatt fra oppdrettskarene (2 fra hvert av de tre karene) på 9,5 °C like før forsøksstart. Gruppene ble overført med 60 min mellomrom og prøvetakingstidspunktene var tilsvarende forskjøvet for at tidspunkt for prøvetaking (antall timer etter overføring) skulle bli likt mellom gruppene.



Blodprøvetaking fra hjerte (t.v), uttak av skinnprøver (nederst).

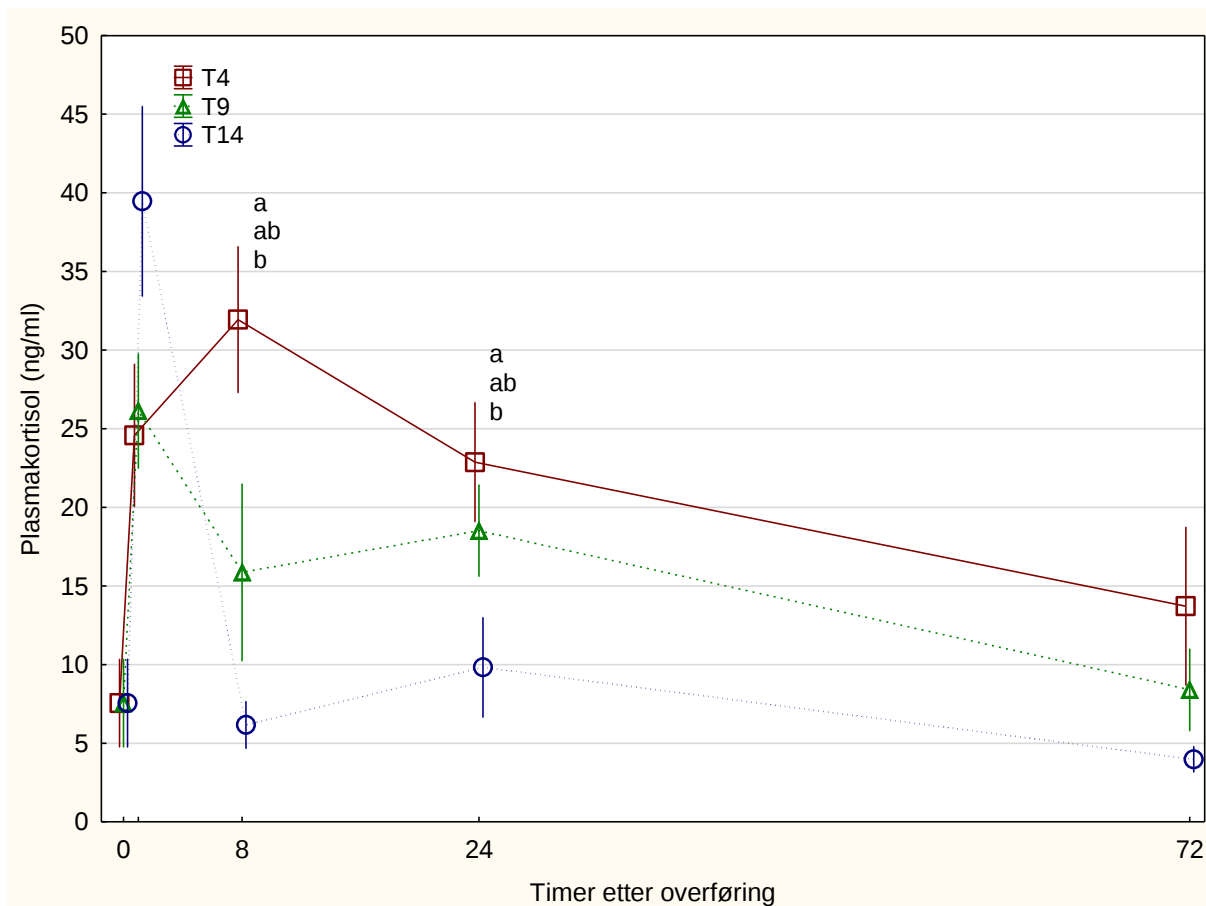
Ved blodprøvetaking ble fisken håvet over i en bøtte med bedøvelse (Metomidat, 15 mg/l) hvor fisken mistet likevekten og ble livløs innen 10 sekunder. Blodprøvene ble tatt innen 2-3 minutter og deretter sentrifugert. Blodplasma ble overført til prøverør og oppbevart ved -80 °C inntil de ble analysert. Etter blodprøvetaking ble fisken avlivet med overdose bedøvelse (Finquel, 200 mg/l). Analysemetoden er nærmere beskrevet i vedlegg 1.

En tre-veis nøstet ANOVA med replikater nøstet i gruppe og gruppe nøstet i tidspunkt ble benyttet for å teste forskjeller mellom tidspunkt uavhengig av gruppe. En-veis ANOVA ble benyttet for å undersøke om det var forskjeller mellom behandlingsgruppene på de enkelte prøvetakingstidspunktene. Signifikante ANOVA ble etterfulgt av Student Newman-Keuls test (SNK) for å identifisere hvilke grupper som var forskjellige. Dersom annet ikke er oppgitt inngikk seks blodprøveanalyser per gruppe per måletidspunkt ($n=6$). Signifikansnivå (α) på 0,05 ble brukt i alle analysene.

Resultater

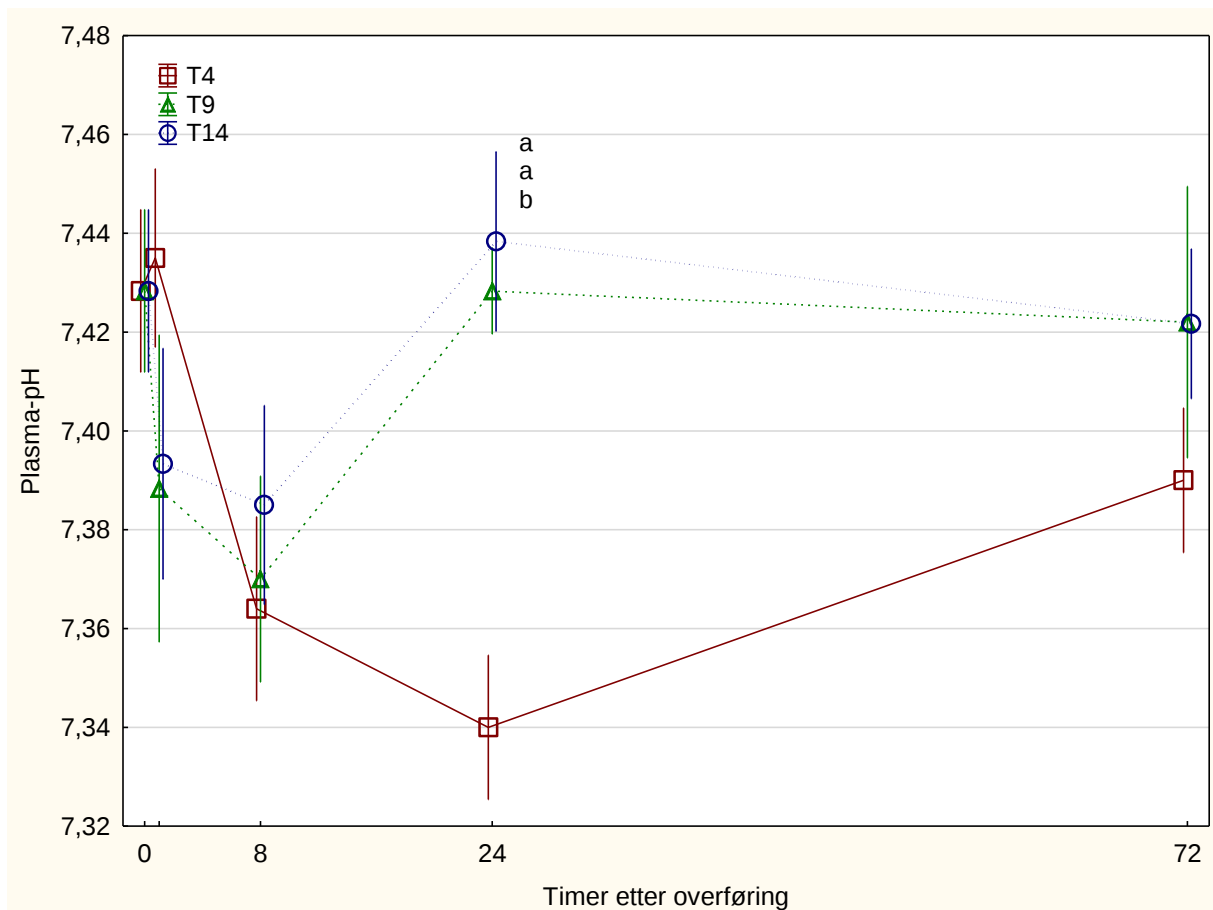
Analyser av uforstyrret rognkjeks før forsøksstart akklimatisert til 9,5 °C viste gjennomsnittlige kortisolverdier på 7,5 ng/ml. Overføringen fra oppdrettskarene til forsøkskarene ga en klar stressrespons for alle temperaturgruppene allerede etter 1 time, og på de to høyeste temperaturene (T9 og T14) var plasmakortisol regulert tilbake til utgangsnivået for ustresst fisk allerede etter 8 timer (Figur 1, $p<0,05$).

For T4 kom toppen i stressnivået etter 8 timer og akklimatiseringen var med gradvis sammenlignet med T9 og T14. Etter 8 og 24 timer hadde T4 signifikant høyere stressnivå sammenlignet med T14. Ved forsøksslutt var det ingen forskjell mellom gruppene (Figur 1).



Figur 1. Variasjon i plasmakortisol hos rognkjeks etter flytting til kar med forskjellige temperaturer (**T4**: fra 9,5 til 4,2 °C, **T9**: fra 9,5 til 9,5 °C, **T14**: fra 9,5 til 14,2 °C). Punktene er gjennomsnitt av 6 fisk, vertikale linjer indikerer standard feil rundt gjennomsnittet (SEM). Forskjeller mellom gruppene på de enkelte måle-tidspunktene er indikert med bokstaver hvor rekkefølge indikerer rangering av gruppene (SNK, $p < 0,05$).

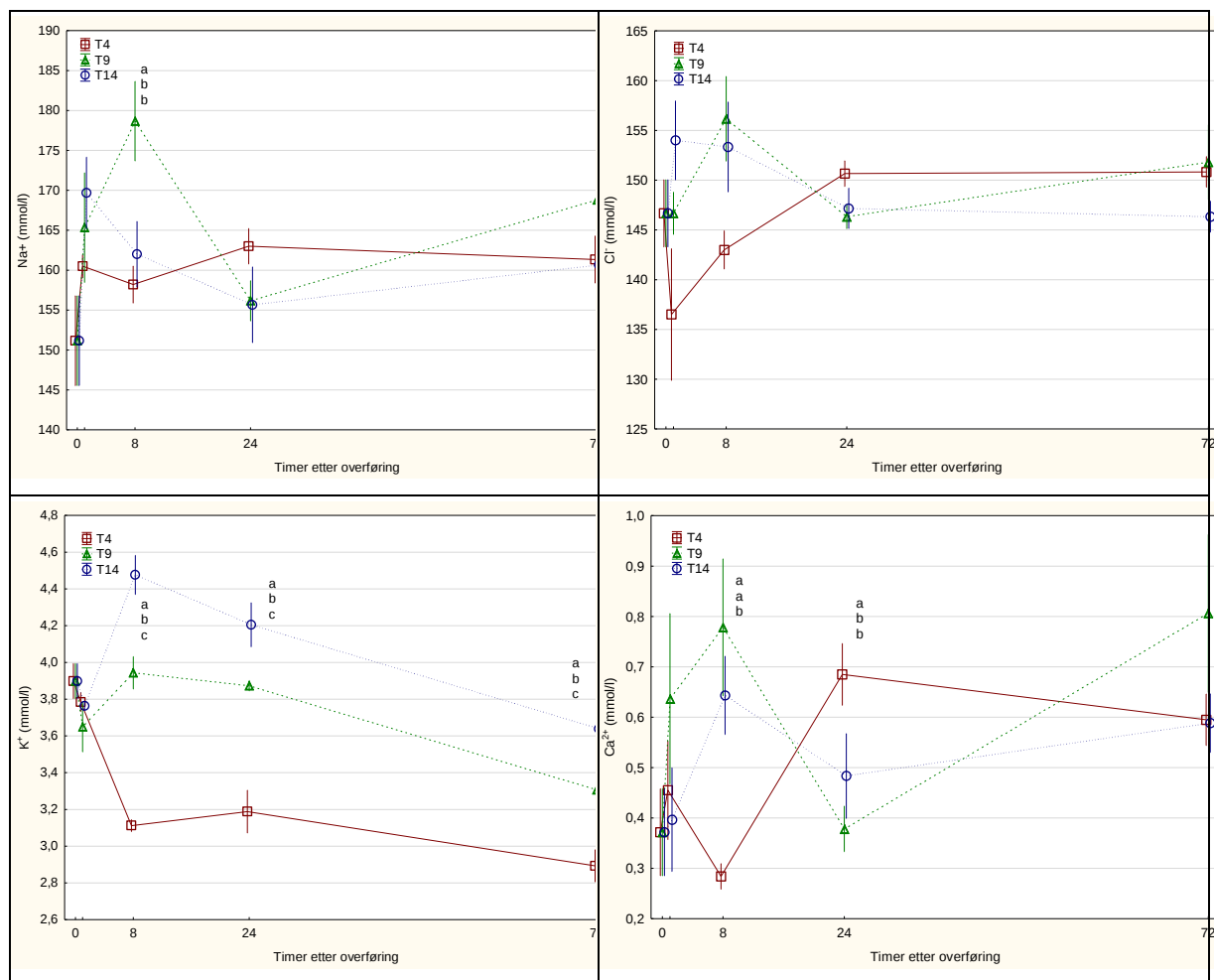
Etter overføring til forsøkskarene ble det påvist et tidlig, men relativt lite dropp i pH for T9 og T14 målt etter 1 og 8 timer, og en regulering tilbake til utgangsnivået etter 24 timer (Figur 2). Det var et seinere dropp i T4 og signifikante forskjell mellom gruppene kun etter 24 timer ($p < 0,05$), hvor T4 hadde signifikant lavere pH sammenlignet med T9 og T14. Det var ingen forskjell mellom gruppene etter 72 timer, men en tendens til seinere regulering av pH i T4.



Figur 2. Variasjon i plasma-pH hos rognkjeks etter flytting til kar med forskjellige temperaturer (T4: fra 9,5 til 4,2 °C, T9: fra 9,5 til 9,5 °C, T14: fra 9,5 til 14,2 °C). Punktene er gjennomsnitt av 6 fisk, vertikale linjer indikerer standard feil rundt gjennomsnittet (SEM). Forskjeller mellom gruppene på de enkelte måle-tidspunktene er indikert med bokstaver hvor rekkefølge indikerer rangering av gruppene (SNK, $p < 0,05$).

Den akutte responsen på overføringen til forsøkskarene (håndteringsstresset) for alle de undersøkte plasmaionene (Na^+ , Cl^- , K^+ og Ca^{2+}) er temperaturavhengig (Figur 3), hvor en for de to høyeste temperaturene (T9 og T14) får en økning i ione-konsentrasjonene de første 8 timene etter håndteringsstresset, mens T4 enten er uendret (Na^+ og Cl^-) eller får redusert ione-konsentrasjon (K^+ og Ca^{2+}). Det er ellers stor variasjonen i Ca^{2+} mellom gruppene over tid, men ingen signifikant forskjell etter 72 timer (Figur 3d, $p > 0,05$).

Konsentrasjonene av Na^+ , Cl^- og Ca^{2+} stabiliseres til samme nivå for alle temperaturgruppene etter 72 timer (Figur 3a, b og d), mens nivåene av K^+ (Figur 3c) tidlig reguleres i forhold til temperatur og forblir temperaturregulert med økt konsentrasjon med økende temperatur frem til forsøksslutt (72 timer).



Figur 3. Variasjon i konsentrasjonen av Na^+ , Cl^- , K^+ og Ca^{2+} i plasma hos rognkjeks etter flytting til kar med forskjellige temperaturer. (T4: fra 9,5 til 4,2 °C, T9: fra 9,5 til 9,5 °C, T14: fra 9,5 til 14,2 °C). Punktene er gjennomsnitt av 6 fisk, vertikale linjer indikerer standard feil rundt gjennomsnittet (SEM). Forskjeller mellom gruppene på de enkelte måle-tidspunktene er indikert med bokstaver hvor rekkefølge indikerer rangering av gruppene (SNK, $p < 0,05$).

Diskusjon

Økningen i plasmakortisol i alle forsøksgruppene etter flytting av fisk fra akklimatiseringskarene (oppdrettskarene) til forsøkskarene viste at selve håndteringen (håving og trenging) ved overføringen var en stressfaktor, og fisken i de forskjellige gruppene responderte forskjellig på dette stresset, avhengig av temperatur. Tidlig og høy stressrespons på fisken i gruppe T9 og T14 (9,5 og 14,2 °C), etterfulgt av en rask regulering tilbake til nivået før flyttingen, hvor fisken gikk ustresst, tyder på at rognkjeks på temperaturer rundt 9-14 °C håndterer moderat håndteringsstress effektivt og re-etablerer likevekt etter kort tid. Kritisk øvre temperatur hos rognkjeks (CT_{max}) er tidligere beregnet til like over 16 °C (Ern m.fl. 2016). Stressforløpet på 4,2 °C, hvor kortisol-nivåene lå klart høyere enn 14,2 °C etter 8 og 24 timer, tyder på at det tar lengre tid å stresse ned ved lavere temperatur. Etter 72 timer var kortisolnivået ved 4,2 °C fremdeles over tre ganger høyere enn ved 14,2 °C. Variasjonen i akklimeringshastigheten kan være en direkte respons på effekten temperatur har i regulering av hastigheten for fysiologiske prosesser (Jobling 1979), men overganger fra høy til lav temperatur

kan også tenkes å være en stressfaktor i seg selv, selv ved relativt små temperaturdifferanser, som tidligere indikert på liten torsk (Sæther 2005).

Temperaturløansen vil ha betydning for hvordan rognkjeks klarer å tilpasse seg (akklimatisere) i merd etter transport. Det er også vist at fiskens svømmeevne og evne til å stå imot sterk strøm er temperaturavhengig, og kritisk svømmehastighet ved 3, 9 og 15 °C er målt til hhv. ca. 25, 31 og 34 cm/s for rognkjeks på ca. 300 g (Hvas m.fl. 2018).

Det er godt dokumentert at forskjellige stressfaktorer relatert til transport kan akkumuleres til høye nivåer, avhengig av transportmåte og håndtering (Remen og Jonassen 2017). Dette gjør det spesielt viktig at fiskens evne til å regulere (respondere på stresset) er god. Fiskekvalitet (robusthet) spiller inn, og det er her vist at temperatur spiller inn i forhold til hvor effektivt rognkjeks klarer å re-etablere likevekt. Dersom fiskens evne til å regulere stress og kompensere for å gjenopprette homeostase (fysiologisk likevekt) ikke er tilstrekkelig, vil fisken utvikle kronisk stress som kan gi økt risiko for bla. redusert appetitt, aktivitetsnivå, sykdomsresistens og overlevelse (Wendelaar Bonga 2011).

Reduksjonen i pH det først døgnet etter overføring til forsøkskarene er sannsynligvis påvirket av økt CO₂ i blodet som følge av økt metabolisme eller svømmeaktivitet knyttet til håving og flytting av fisken. En slik reduksjon i pH er for eksempel vist hos laks ved kraftig stress og utmattelse (Gilmour & Perry 2009). Denne responsen står likevel i kontrast til tidligere data fra simulerte transporter med rognkjeks og analyser fra kommersielle transporter av rognkjeks (Remen & Jonassen 2017) hvor pH økte med økende stress. Dette ble forklart med at rognkjeks kompenserer for en initiell reduksjon i plasma-pH som respons på økt CO₂ i transportvannet, eller at rognkjeksens "trykke-respons" ved stress førte til akkumulering av CO₂ i blodet (pga. redusert utlufting over gjellene) som fisken kompenserer med økt opptak av bikarbonat (HCO₃⁻) som bufrer blodet og øker pH slik at den passive diffusjonen av CO₂ over gjellene øker (Wood & Jackson 1980). Forholdene med kortere stresseksposering, vanngjennomstrømning i karene samt fravær av bevegelser (transportsimulering) og trykkeadferd kan forklare hvorfor en slik "overkompensering" i pH ikke skjedde i dette forsøket.

Det signifikant lavere pH-nivået på 4 °C etter 24 timer og den seinere oppreguleringen sammenlignet med fisk på 9 og 14 °C samsvarer med utviklingen i den primære stressresponsen (plasmakortisol), som er kraftigere og akklimerer seinere på 4 °C.

Endringer i fiskens salt-vannbalanse (osmotisk stress) er det mest typiske trekket i en sekundær stressrespons hos fisk (Wendelaar Bonga 1997), og kapasiteten for osmoregulering reduseres ved kraftig stress. Økning i Na⁺ og Cl⁻ konsentrasjonene er derfor tegn på osmotisk stress i forbindelse med overføringen til forsøkskarene. Perioden med osmotisk stress var kortvarig og stabiliseringen skjedde etter 24 timer for alle temperaturgruppene. Det er likevel et klart temperaturavhengig forløp, tilsvarende forløpet på plasmakortisol, med tidligere og høyere økning i Na⁺ og Cl⁻ med økende temperatur, og samtidig raskere nedregulering og akklimatisering på de høyere temperaturene. Temperaturfølsomheten for osmoregulering varierer mellom arter. Overføring av regnbueørret fra 8 til 1 °C førte til alvorlig osmotisk stress og dødelighet (Finstad m.fl. 1988), mens tilsvarende temperaturovergang for tosk ga økt stress, men ingen stor effekt på fiskens vann-saltbalanse (Staurnes m.fl. 1994). Overgangen for rognkjeks fra 9,5 til 4,2 °C var mindre ekstrem enn disse tilfellene, og rognkjeks viste god evne til osmoregulering på begge temperaturene. Forsinkelsen i regulering på 4,2 °C er sannsynligvis en effekt av lavere metabolsk aktivitet ved lavere temperatur (Jobling 1994).

Ca²⁺ er regulert på samme måte som Cl⁻ via spesifikke ATPase enzymer i gjellene, og det skjer en utveksling mellom Na⁺ og Ca²⁺ over gjelleepitelet (Verbost m.fl. 1997), som kan forklare den observerte samvariasjonen mellom Na⁺, Cl⁻ og Ca²⁺. Konsentrasjonen av K⁺ blir i starten oppregulert på de høyere temperaturene som respons på stress, men reduseres under

akklimeringen, med en klar temperaturgradering hvor konsentrasjonen av K^+ øker med temperatur.

Med den begrensede kunnskapen man har på rognkjeksens fysiologi er det usikkert om kjente forklaringsmodeller for regulering av sekundære stressresponser som syre-baseregulering og ione-regulering i fisk gjelder fullt ut for rognkjeks. Det er bl.a. vist at ferskvann kan akkumuleres i mage/tarm hos rognkjeks (Franzen m.fl. 2015), at den har vev med lavt ione-innhold som har betydning for regulering av oppdrift (Davenport og Kjørsvik 1986), og det er nylig oppdaget en ny type celler i huden til rognkjeks (upubliserte data, Pittman m.fl.) med en struktur som kan tyde på at de har en funksjon forbundet med regulering av salt-vannbalansen eller oppdrift. Muligens skiller rognkjeks seg ut fra andre arter i måten den regulerer fysiologisk likevekt.

Konklusjoner og anbefalinger

Det ble observert en raskere og tidlig forbigående stressrespons hos rognkjeks på høye temperaturer (9,5 og 14,2 °C) sammenlignet med fisk som gikk på lav temperatur (4,2 °C), som førte til en hurtigere akklimatisering og stabilisering på et lavere stressnivå etter 72 timer. Dette tyder på at rognkjeks responderer på stress hurtigere ved høye temperaturer enn ved lave temperaturer og at håndtering, transport og overføring av rognkjeks til nytt miljø er mer kritisk ved lave temperaturer. Tiltak under transport og i merd for å unngå akkumulering av stress er derfor spesielt viktig ved lave temperaturer. Slike tiltak kan være styrt utsettingstidspunkt og valg av lokalitet i forhold til miljø, temperaturakklimatisering før transport og akklimatisering i merd etter transport (ventemerd e.l.). Temperaturregulering under transport, kanskje spesielt biltransport hvor man har eksempler på betydelig nedkjøling vinterstid, kan være et viktig tiltak. Lengre akklimatiseringstid i merd ved lave temperaturer gjør at det kan ta litt tid før rognkjeks er aktivt søkende etter lakselus.

Referanser

- Davenport, Kjørsvik (1986). Buoyancy in the Lumpsucker *Cyclopterus Lumpus*. *Journal of the Marine Biological Association of the UK* 66, (1), 159 - 174
- Ern, R., Norin, T., A. Kurt Gamperl, A.K., Esbaugh, A.J. (2016). Oxygen dependence of upper thermal limits in fishes. *Journal of Experimental Biology* 219, 3376-3383, doi:10.1242/jeb.143495.
- Finstad, B., Staurnes, M. & Reite, O.B. (1988). Effect of low temperature on the seawater tolerance in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquaculture*, 72, 319-328.
- Frantzen, M., Hansen, B. H., Geraudie, P., Palerud, J., Falk-Petersen, I. B., Olsen, G. H., & Camus, L. (2015). Acute and long-term biological effects of mechanically and chemically dispersed oil on lumpsucker (*Cyclopterus lumpus*). *Marine environmental research*, 105, 8-19.
- Gilmour, K.M., Perry, S.F. (2009). Carbonic anhydrase and acid–base regulation in fish *Journal of Experimental Biology* 212, 1647-1661.
- 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*, 7,1-9, bio036079. doi:10.1242/bio.036079
- Jobling, M. (1994). Fish bioenergetics. Chapman and Hall, London, UK.

- Remen, M., Jonassen, T.M. (2017). Utvikling av transport- og mottaksprosedyrer for rognkjeks basert på kartlegging av miljø og stress. Akvaplan-niva rapport nr. 7707-1, 74 sider.
- Staurnes, M., Rainuzzo, J.R., Sigholt, T. & Jørgensen, L. (1994). Acclimation of Atlantic cod (*Gadus morhua*) to cold water: stress response, osmoregulation, gill lipid composition and gill Na-K-ATPase activity. *Comp. Biochem. Physiol.* 109A, 413-421.
- Sæther, B.-S. (2005). Toleranse for temperaturfall hos torsk i settefiskfasen. Potensiell flaskehals i intensiv sesonguavhengig produksjon. NOFIMA, Rapport 14/2005, 24 sider.
- Verboost PM, Bryson SE, Wendelaar Bonga SE, Marshall WS. (1997). Na⁺-dependent Ca²⁺ uptake in isolated opercular epithelium of *Fundulus heteroclitus*. *J Comp Physiol* 167B:205–212.
- Wendelaar Bonga S.E. (2011) Hormonal responses to stress. In: *Encyclopedia of Fish Physiology* (ed. A. Farrell). Academic Press, San Diego, pp. 1515-1523.
- Wood, C.M. & Jackson, E.B. (1980). Blood acid-base regulation during environmental hyperoxia in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*)

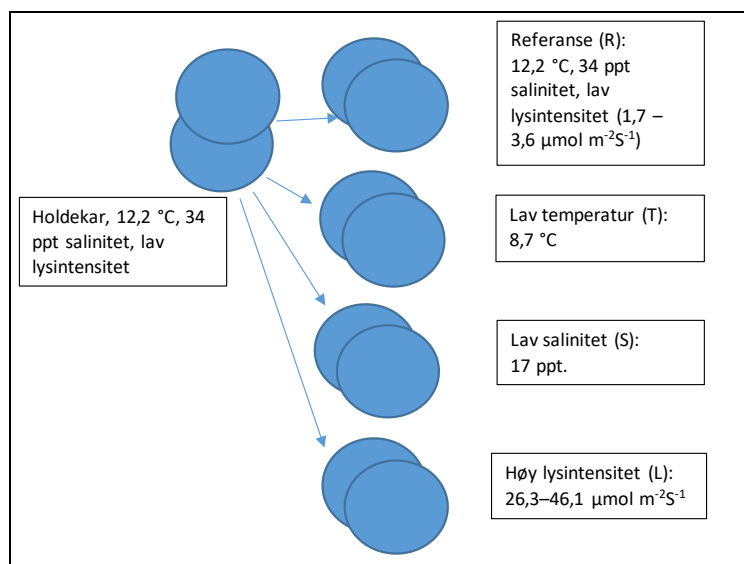
Del IV: Berggyllt: Toleranse for brå miljøoverganger; lys, temperatur og salinitet

Det finnes lite kunnskap på berggyllt og toleranse for brå miljøendringer som fisken utsettes for i forbindelse med transport og overgang fra oppdrettsmiljøet i kar til et svært varierende miljø i merder i sjø. I dette forsøket ble derfor stressresponsen etter brå overgang til redusert salinitet, økt lysintensitet og redusert temperatur hos berggyllt undersøkt.

Materiale og metode

120 berggyllt med snittvekt 51,7 g, klekket og oppdrettet ved Marine Harvest Labrus i Øygarden, ble fordelt på to stk. 1,3 m³ holdekar plassert i et eget forsøksrom 6 dager før forsøksstart under normale oppdrettsbetingelser (12,2 °C, 34 ppt sjøvann, kontinuerlig dimmet belysning (1,7 – 3,6 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{S}^{-1}$)) fra lysstoffrør i tak (58W/840). Følgende forsøksbetingelser var etablert ved forsøksstart (Figur 1):

- **Gruppe R (referansekar):** Normale oppdrettsbetingelser med temperatur på 12,2 °C, dimmet belysning (1,7 – 3,6 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{S}^{-1}$) og salinitet på ca. 34 ppt.
- **Gruppe S (salinitet-overgang):** Samme betingelser som referansekarene, men med innblanding av ferskvann for justering til lav salinitet (17 ppt).
- **Gruppe L (lys-overgang):** Samme betingelser som referansekarene, men med ekstra kontinuerlig belysning fra en metallhalogenlampe like over karene for justering til høy lysintensitet (26,3 – 46,1 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{S}^{-1}$). Denne gruppen var skjermet fra de andre gruppene med presenning for å unngå lysspredning til de andre forsøkskarene.
- **Gruppe T (temperatur-overgang):** Samme betingelser som referansekarene, men med uoppvarmet vann for justering til lav temperatur (8,7 °C).



Figur 1. Forsøksoppsett.



Forsøkskar med berggylt ved Marine Harvest Labrus.

Ved forsøksstart 9. oktober 2018 ble fisk overført direkte fra de to holdekarene plassert i forsøksrommet på "normale" oppdrettsbetingelser til forsøkskar på de respektive forsøksbetingelsene (lav salinitet, høy lysintensitet, lav temperatur og normalreferanse), med to parallelle kar à 1,3 m³ per gruppe og 30 fisk per kar. Mellom hver gruppe var det lagt inn en tidsforskjell i tidspunktet for overføring på 30 minutter for å ta høyde for et tidsforbruk ved prøvetaking på 30 minutter. Prøvetidspunktet ble dermed lik for alle gruppene. Fisken ble ikke føret i forsøksperioden og alle kar hadde lik vannutskifting (ca. 50% utskifting per time). Det ble lagt spesiell vekt på hurtig uttak av fisk direkte til bedøvelse (Metomidat, 15 mg/l).

Forsøket varte i 72 timer. Det ble tatt blodprøver av 6 fisk fra hver gruppe (3 fra hvert kar) etter 1, 8, 24 og 72 timer for å måle utviklingen i primær stressrespons (plasmakortisol) og osmotisk stress (konsentrasjonene av Na⁺, Cl⁻, K⁺, Ca²⁺ i blodplasma). I tillegg ble 0-prøver (referanse fra ubehandlet fisk) fra 6 fisk tatt fra de to holdekarene (3 fra hvert kar) like før forsøksstart. I tillegg ble det tatt prøver fra 6 fisk fra et uforstyrret oppdrettskar i påveksthallen på anlegget som gikk på 34 ppt salinitet, 12,2 °C og dimmet belysning. Blodprøvetaking, behandling, analysering av prøvene og statistikk er beskrevet i vedlegg 1. Etter blodprøvetaking ble fisken avlivet med overdose bedøvelse (Finquel, 200 mg/l).

En tre-veis nøstet ANOVA med replikater nøstet i gruppe og gruppe nøstet i tidspunkt ble benyttet for å teste forskjeller mellom tidspunkt uavhengig av gruppe. En-veis ANOVA ble benyttet for å undersøke om det var forskjeller mellom behandlingsgruppene på de enkelte prøvetakingstidspunktene. Signifikante ANOVA ble etterfulgt av Student Newman-Keuls test (SNK) for å identifisere hvilke grupper som var forskjellige. Dersom annet ikke er oppgitt inngikk seks blodprøveanalyser per gruppe per måletidspunkt (n=6). Signifikansnivå (α) på 0,05 ble brukt i alle analysene.

Resultater

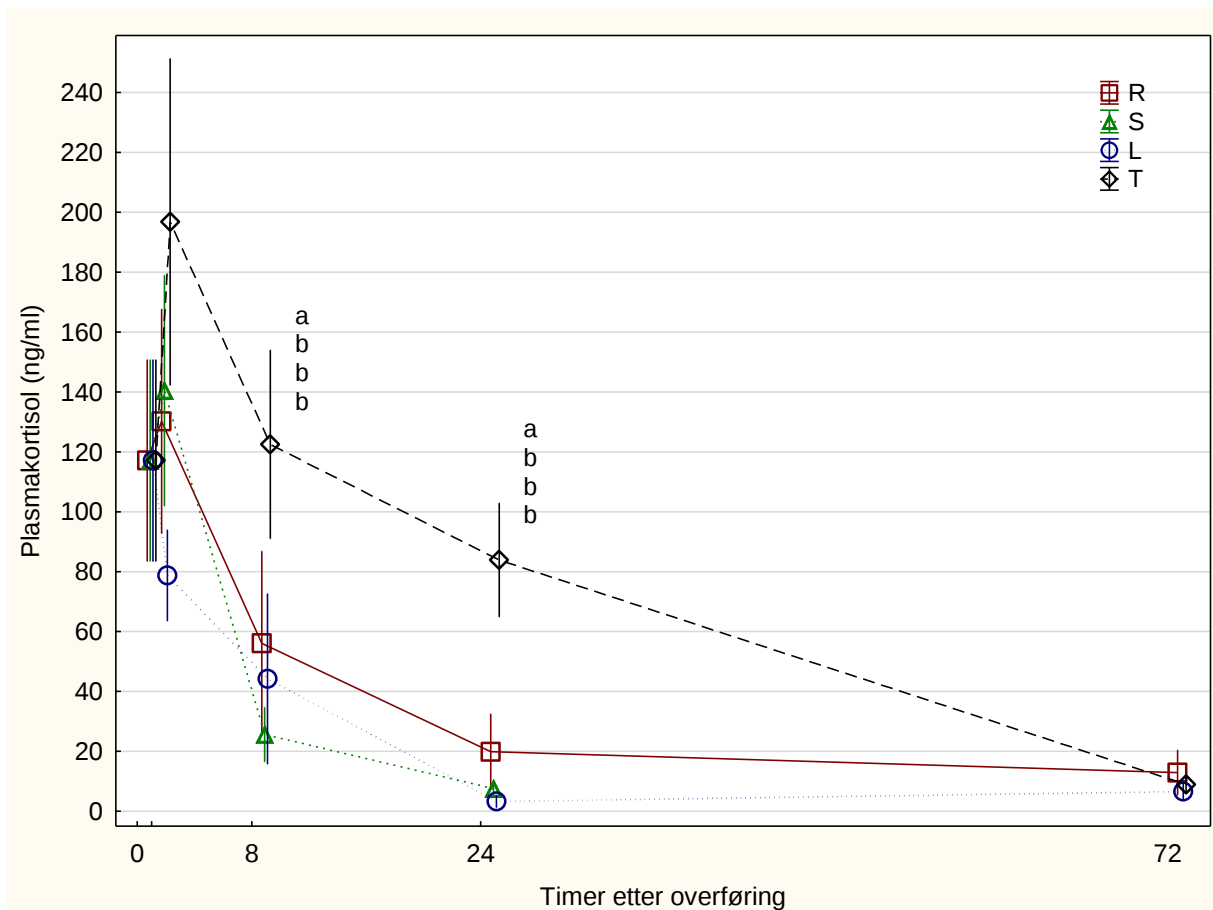
Nivået av plasmakortisol fra fisk i de to samlekarer tatt like før overføring til forsøkskarene var 117 ng/ml ($\pm$ 82,3). Dette var signifikant høyere enn for uforstyrret fisk fra et av produksjonskarene (6,76 ng/ml ($\pm$ 5,4)) hvor fisken ble flyttet fra 6 dager før ($p < 0,05$). Det var også store individuelle variasjoner i stressnivå i samleket, med to fisk mellom 12 og 24 ng/ml og fire fisk mellom 142 og 225 ng/ml kortisol.

Gruppe S, som fikk direkte overgang fra normalt sjøvann (34 ppt) til brakkvann (17 ppt), fikk en moderat økning i plasmakortisol en time etter overføring, men ikke signifikant forskjellig fra referansegruppen (R) overført til normalt sjøvann eller stressnivået før overføringen ($p > 0,05$, Figur 2). Gruppe S endte på 7,6 ng/l ($\pm$ 4,8) plasmakortisol etter 24 timer, som var signifikant lavere enn utgangsnivået ($p < 0,05$).

Ved et uhell ble sjøvannstilsetningen i blandetanken til de to karene i gruppe S stanset tredje dag av forsøket. Dette ble oppdaget ca. kl. 13:00, ca. 50 timer etter forsøksstart. Saliniteten i de to parallelle karene i gruppen var da på hhv. 5 og 0 ppt. Det var 5-10 dødfisk i hvert av karene. Det ble åpnet for sjøvann igjen, og saliniteten ble raskt (tiden ikke tallfestet) stabilisert til 17 ppt. Analysene av gruppe S er derfor avgrenset til de først 24 timene hvor saliniteten var stabil.

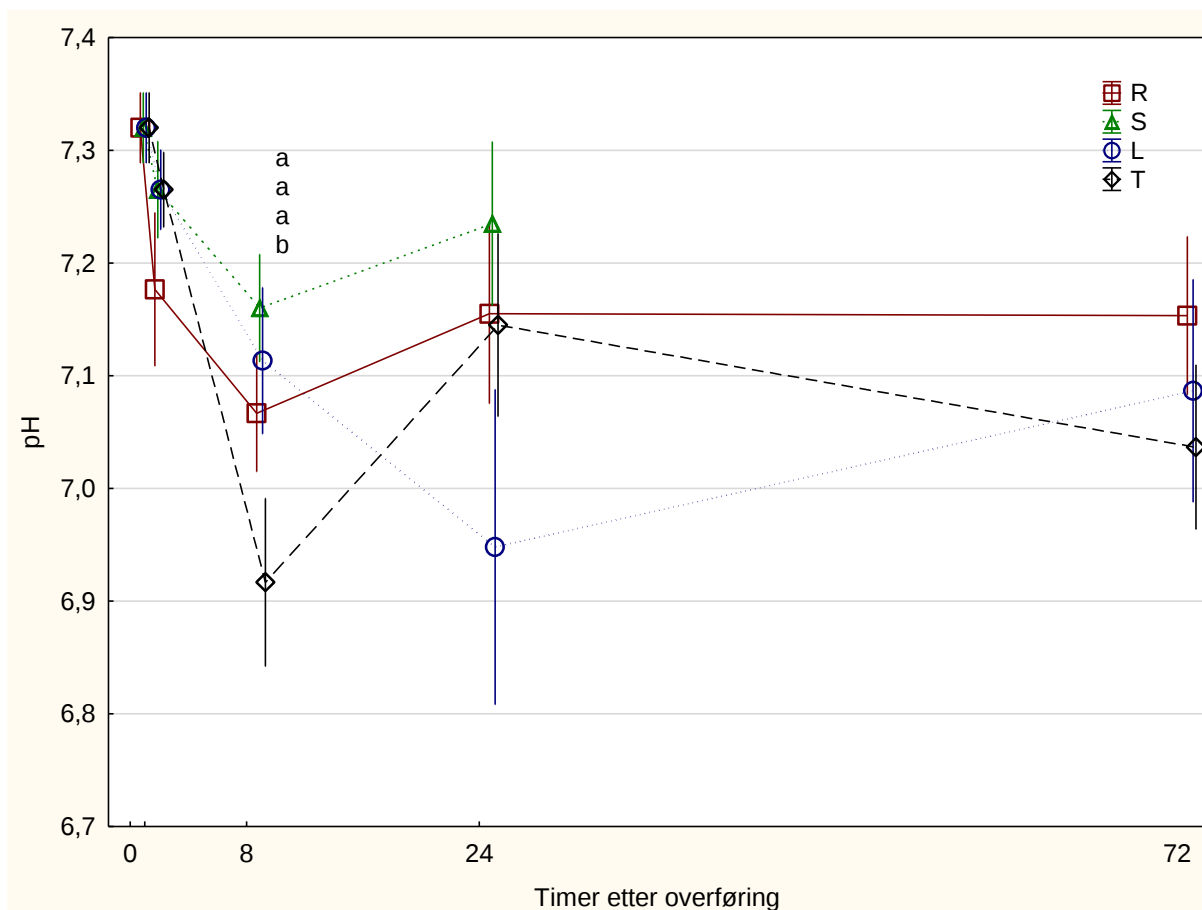
Det var en klar tendens til redusert plasmakortisol i gruppe L allerede 1 time etter overføringen fra dimmet lys til høy lysintensitet (Figur 2), og etter 24 timer var denne forskjellen fra utgangsnivået før overføringen statistisk signifikant ($p < 0,05$). Det var ingen signifikant forskjell mellom L og referansegruppen (R) på noen tidspunkt ($p > 0,05$). Gruppe L stabiliserte seg rundt 3,9 ($\pm$ 5,2) ng/ml plasmakortisol etter 24 timer.

Gruppe T fikk en klar økningen i plasmakortisol etter overføring til lavere temperatur, signifikant høyere enn normalreferansen på høyere temperatur (R) og de to andre forsøksgruppene etter 8 og 24 timer ($p < 0,05$). Etter 72 timer var gruppe T ikke lenger forskjellig fra R og L, og kortisol-nivået var redusert til 8,9 ng/l ($\pm$ 7,8), signifikant lavere enn før overføringen til kar med lavere temperatur ($p < 0,05$). Temperaturen i gruppe T ble noe redusert gjennom forsøket og endte på 8,5 °C ved forsøksslutt.



Figur 2. Variasjon i plasmakortisol hos berggylt etter flytting til kar med forskjellige miljøforhold (**R**: referansekar, **S**: gruppe overført til lav salinitet (17 ppt), **L**: grupper overført til høy lysintensitet (26,3 – 46,1 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), **T**: gruppe overført til lav temperatur (8,7 °C). Punktene er gjennomsnitt av 6 fisk, vertikale linjer indikerer standard feil (SEM). Forskjeller mellom gruppene på de enkelte måletidspunktene er indikert med bokstaver hvor rekkefølge indikerer rangering av gruppene (SNK test, $p < 0,05$).

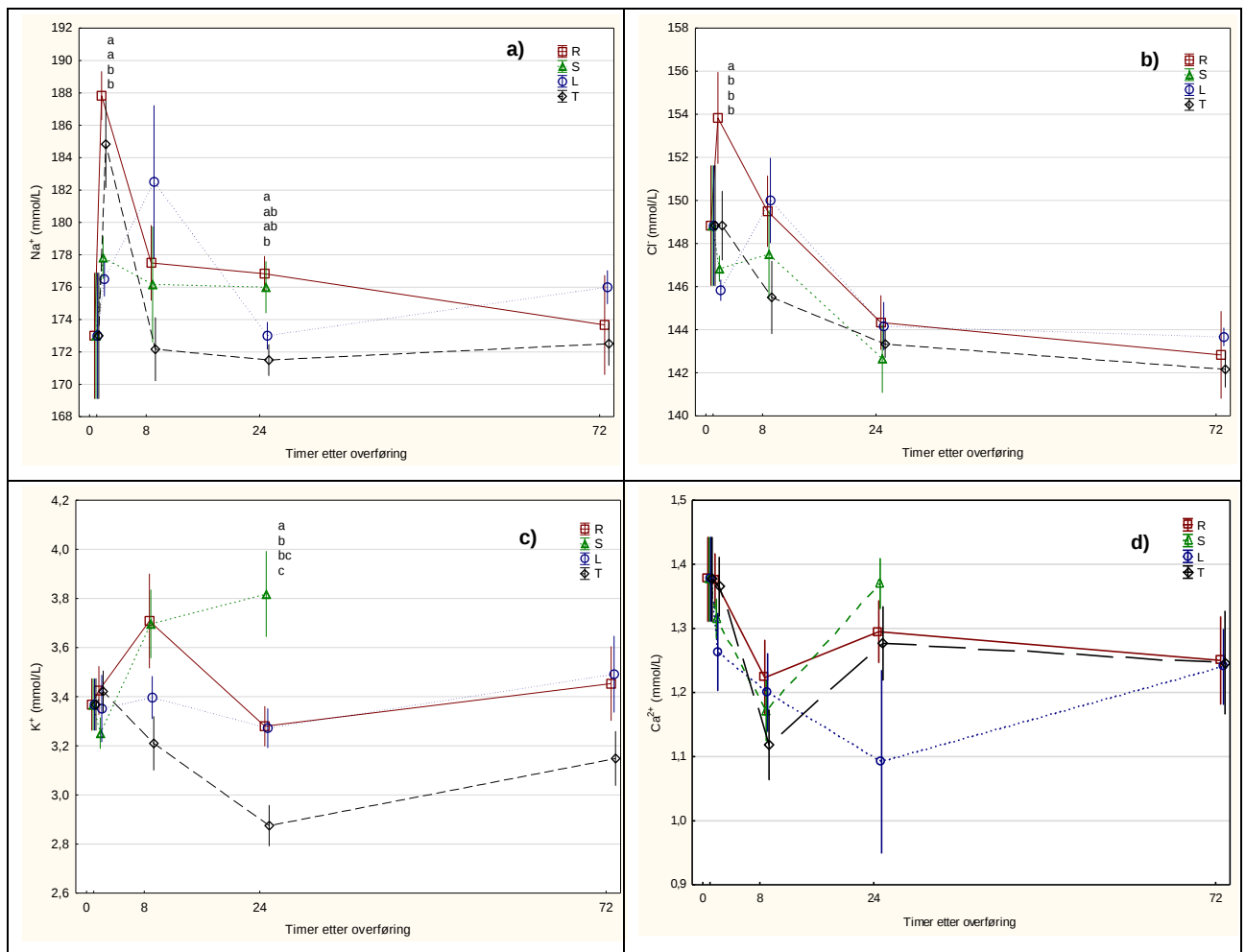
Sammenlignet med mønsteret for plasmakortisol var det en mindre systematisk utvikling i pH for alle gruppene etter overføring til nye miljøbetingelser, og stor variasjon innad i gruppene på de enkelte måletidspunktene (Figur 3). Det var forskjell mellom gruppene kun etter 8 timer, hvor pH var signifikant lavest i gruppe T ($p < 0,05$).



Figur 3. Variasjon i pH hos berggylt etter flytting til kar med forskjellige miljøforhold (**R**: referansekar, **S**: gruppe overført til lav salinitet (17 ppt), **L**: grupper overført til høy lysintensitet (26,3 – 46,1 $\mu\text{mol m-2S-1}$), **T**: gruppe overført til lav temperatur (8,7 °C). Punktene er gjennomsnitt av 6 fisk, vertikale linjer indikerer standard feil (SEM). Forskjeller mellom gruppene på de enkelte måletidspunktene er indikert med bokstaver hvor rekkefølge indikerer rangering av gruppene (SNK test, $p < 0,05$).

Etter 8 timer var pH i alle forsøksgruppene signifikant lavere sammenlignet med fisk fra oppdrettskaret og holdekarene før overføring (SNK-test, $p < 0,05$), mens forskjellene var mindre deretter.

Utviklingen i plasmaioner (Figur 4) fulgte i grove trekk samme utvikling som plasmakortisol, med en generell tendens til en umiddelbar økning i ionekonsentrasjonen like etter overføringen til forsøkskarene, og deretter en reduksjon og stabilisering etter 24 – 72 timer på samme nivå (Na^+ og K^+) eller noe lavere nivå (Cl^- og Ca^{2+}) sammenlignet med før overføringen. Gruppe T hadde en tendens til akklimatisering til lavere ione-konsentrasjoner spesielt for K^+ , og hadde signifikant lavere Na^+ og K^+ sammenlignet med referansegruppen (R) etter 24 timer ($p < 0,05$, Figur 4). Konsentrasjonen av K^+ var signifikant høyest for gruppe S etter 24 timer (en-veis ANOVA, $p < 0,05$).



Figur 4. Variasjon i konsentrasjonen plasmaionene Na^+ (a), Cl^- (b), K^+ (c) og Ca^{2+} (d) hos berggylt etter flytting til kar med forskjellige miljøforhold (R: referansekar, S: gruppe overført til lav salinitet (17 ppt), L: grupper overført til høy lysintensitet ($26,3 - 46,1 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), T: gruppe overført til lav temperatur ($8,7^\circ\text{C}$). Punktene er gjennomsnitt av 6 fisk, vertikale linjer indikerer standard feil (SEM). Forskjeller mellom gruppene på de enkelte måletidspunktene er indikert med bokstaver hvor rekkefølge indikerer rangering av gruppene (SNK test, $p < 0,05$).

Uhellet med stans i sjøvannstilførselen til blandekaret til gruppe S tredje dag medført en reduksjon fra 17 ppt til hhv. 5 og 0 ppt for de to parallelle karene i denne gruppen. Denne reduksjonen hadde sannsynligvis foregått over nærmere ett døgn. Sjøvannet ble umiddelbart slått på igjen og saliniteten økte igjen gradvis til stabilt 17 ppt. Det ble tatt blodprøver fra fisk utsatt for dette salinitetsstresset ved forsøksslutt, ca. 24 timer etter vannstansen. Disse er i 1 sammenstilt med blodprøver fra fisk fra produksjonskaret, samlelekarene og salinitetsgruppene (S) 1 og 24 timer etter direkte overføring til 17 ppt.

Tabell 1. Blodverdier fra berggylt utsatt for forskjellige salinitetsendringer. **Produksjonskar:** uforstyrret fisk i produksjonskar (34 ppt salinitet); **Samlekar:** 6 dager etter overføring av fisk til 1,3 m³ holdekar i forsøksrom (34 ppt salinitet), **17 ppt, 1 time;** 1 time etter overføring av fisk fra samlekar til forsøkskar på 17 ppt salinitet; **17 ppt, 24 timer;** 24 timer etter overføring av fisk fra samlekar til forsøkskar på 17 ppt salinitet; **5 ppt;** 24 timer etter midlertidig dropp fra 17 til 5 ppt; **0 ppt;** 24 timer etter midlertidig dropp fra 17 til 0 ppt.

	Kortisol		Na ⁺		Cl ⁻		K ⁺		Ca ²⁺		pH	
Behandling	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD
Produksjonskar (n=6)	6,8	5,4	175,0	9,5	151,4	6,4	4,18	0,84	1,46	0,26	7,37	0,05
Samlekar (n=6)	117,1	82,3	173,0	9,5	148,8	6,8	3,37	0,26	1,38	0,16	7,32	0,08
17 ppt, 1 time (n=6)	140,5	94,3	177,8	3,2	146,8	1,5	3,25	0,15	1,32	0,08	7,27	0,11
17 ppt, 24 timer (n=6)	7,6	4,8	176,0	3,9	142,7	3,9	3,82	0,43	1,37	0,10	7,24	0,18
5 ppt (n=3)	16,4	10,4	167,7	3,2	136,0	1,0	3,58	0,37	1,28	0,01	7,27	0,07
0 ppt (n=2)	484	230	134,3	5,5	106,4	8,8	3,15	0,53	1,06	0,08	6,93	0,22

Ca. 24 timer etter reetablering av den opprinnelige saliniteten på 17 ppt var konsentrasjonen av plasmakortisol fremdeles svært høy i gruppen som fikk et midlertidig dropp fra 17 til 0 ppt (484 ng/ml ($\pm$ 230), n=2). En plasmaprøve fra gruppen på 0 ppt målt til 1400 ng/ml kortisol er ekskludert på grunn av hemolysering.

Nivået av plasmakortisol i gruppen med midlertidig dropp til 5 ppt varierte fra 4,4–23,6 ng/ml med gjennomsnitt på 16,4 ng/ml ($\pm$ 10,4) 24 timer etter droppet, og var ikke signifikant forskjellig fra nivået for gruppe S som hadde vært 24 timer på stabilt 17 ppt (en-veis ANOVA, p>0,05).

For pH var det liten forskjell mellom gruppene på saliniteter fra 5 til 34 ppt, mens fisk utsatt for et midlertidig dropp til 0 ppt ikke regulerer opp til samme nivå som før droppet i løpet av 24 timer.

Konsentrasjonen av plasmaioner 24 timer etter salinitetsdroppet var redusert i forhold til utgangsnivået både for gruppen med dropp til 5 og 0 ppt, med lavest nivå for fisk med dropp til 0 ppt.

Diskusjon

All fisk ble overført samtidig til samlekar 6 dager før forsøksstart og hadde derfor samme utgangspunkt og betingelser før overføringen til forsøkskarene. Den direkte overføringen av fisk fra samlekar til forsøkskar var forventet å medføre et relativt likt håndteringsstress, mens miljøovergangen ville enten gi additivt stress eller dempe stressresponsen på håndteringen (eventuelt transporten) avhengig av retning og størrelse på miljøspranget, og om det nye miljøet var mer gunstig for regulering av stress eller ikke.

Stressmålingene fra samlekarene som fisken ble fordelt fra viste at fisken allerede var stresset før flytting til forsøkskarene (117 ng/ml ($\pm$ 82)), og lå noe høyere enn stressnivåene målt på berggylt før overføring fra båt til merd (41-51 ng/ml) i kommersielle transporter, men rundt samme nivå som etter biltransport kombinert med sekundærtransport i båt (119-156 ng/ml).

Utgangsstresset før fisken ble flyttet til nye miljøbetingelser var derfor representativt for reelle transportbetingelser.

Det var kun overgangen til lavere temperatur som ga en økning i stressnivå (additivt stress) i forbindelse med overføringen, mens overgangen fra fullt sjøvann til lav salinitet eller fra lav til høy lysintensitet ikke medførte økt stress.

I tillegg stresset gruppen på lav salinitet og gruppen på høy lysintensitet ned i forhold til utgangsnivået allerede etter 8 timer, stabiliserte seg på et lavt stressnivå etter 24 timer og viste et likt stressforløp som normalreferansen på dimmet belysning og fullt sjøvann. Dette indikerer at berggylt har god kapasitet til å regulere stress (gjenopprette homeostase) under disse miljøforholdene, og at intervallet for den brå overganger var uproblematisk.

God toleranse for saliniteter som nærmer seg iso-osmotiske nivåer (det osmotiske trykket som fisken opprettholder, ca. 1/3 av sjøvann) er også tidligere vist for en rekke marine oppdrettsarter, og kan forklares med det lavere energiforbruket fisken har for å regulere ione-balansen samt lavere standardmetabolisme som gir økt energi tilgjengelig for regulering (Boeuf & Payan 2001; Brett 1979; Jobling 1994). Dette underbygger den effektive reguleringen av stress etter overføring til 17 ppt.

Stressresponsen på de ekstreme salinitetsdroppene berggylta ble utsatt for i forbindelse med vannstoppen i blandekaret, hvor saliniteten en kort periode sank til hhv. 5 og 0 ppt, tyder på at berggylt tilvendt 17 ppt klarer å restituere seg etter en kortere periode med videre reduksjon ned mot 5 ppt, men ikke etter eksponering til ferskvann. Normale rutiner for AGD-behandling av berggylt, hvor saliniteten gradvis reduseres til 15 ppt og holdes på dette nivået i seks dager før den økes igjen, fremstår som en forsiktig behandling i forhold til den observerte salinitetstoleransen til berggylt i dette forsøket.

Salinitetstoleranse er ikke tidligere undersøkt på berggylt, men for torsk, som er beskrevet som spesielt euryhalin (tolerant for variasjoner i salinitet), er det vist at nedre grense for salinitetsakklimatisering er ca. 6 ppt, og at dette nivået gjør den spesielt følsom for transport (Árnason m.fl. 2013). Restituering etter midlertidig dropp til salinitet til 5 ppt indikerer at berggylta tåler et stort spenn i salinitet (er euryhalin), og pre-akklimeringen til 17 ppt kan ha gjort det enklere å tolerere den ekstremt lave saliniteten. En skal også være obs på at temperatur kan påvirke denne toleransen for salinitetsendringer, og på laks førte lav temperatur til forsinket osmotiske forstyrrelser og forlenget periode med osmotisk stress sammenlignet med høy temperatur (Handeland m.fl. 2000).

Rask reduksjon i stressnivået i gruppe L etter overføring fra lav til høyere lysintensitet sammenlignet med de andre forsøksgruppene tyder på at høy lysintensitet har en stressdempende effekt. Det kan også ha sammenheng med at denne gruppen, i motsetning til de andre gruppene, var skjermet med presenning og derfor gikk mer uforstyrret. Responsen på høy lysintensitet er noe overraskende siden en i oppdrett av berggylt oppfatter lav lysintensitet som mer gunstig.

Det er kjent at lysintensitet kan påvirke bla. aggressivitet, utvikling, vekst og overlevelse hos fisk i oppdrett (Boeuf & Le Bail 1999). Lysintensitet som stressor med direkte effekt på plasmakortisol er også vist på havabborarten grouper (Wang m.fl. 2013), hvor både lav (0,1 og 10-50 lux) og høy (3000-3500 lux) lysintensitet var mer stressende enn midlere lysintensitet (320-1150). Den midlere lysintensiteten rapportert på grouper lå rundt samme lysintensitet som høy lysintensitet i forsøket med berggylt. Det kan derfor tenkes at en ytterligere økning i lysintensitet kunne vært stressende for berggylt. Lysfølsomheten varierer også mellom oppdrettsarter (Vera m.fl. 2010), livsstadium (Miyazaki m.fl. 2000) og genetisk bakgrunn

(Puvanendran & Brown 2002), og kompliserer derfor optimalisering av denne miljøparameteren.

Brå temperaturovergang (endring fra akklimeringstemperaturen på 12,2 °C til 8,7 °C) var den miljøendringen som ga den høyeste stressresponsen etter overføring til forsøkskarene, og regulering ned til hvilenivåer gikk seinere sammenlignet med referansegruppen og de andre forsøksgruppene på stabil temperatur (12,2 °C). Generelt for fisk går metabolismen ned og dermed akklimatiseringen seinere ved redusert temperatur (Jobling 1994). Den direkte stressresponsen på temperaturendringer er ikke tidligere vist på berggylt, men for torsk er det observert en kraftig og langvarig økning i stress etter rask temperaturendring, men med en mer ekstrem temperaturovergang enn testet for berggylt (fra 8 til 1 °C, Staurnes m.fl. 1994). For liten torsk med dropp til 3 °C økte stressresponsen med økende størrelse på temperaturspranget (akklimeringstemperaturer på 8–14 °C, Sæther 2005). For berggylt derimot, tyder den begrensede varigheten av stressresponsen, på at temperaturoppgang fra 12,2 til 8,7 °C er uproblematisk for berggylt, og at det ved ca. 8-9 °C vil gå ca. tre dager før fisken har akklimatisert seg til nye miljøbetingelser etter transport, forutsatt at det ikke oppstår annet miljø- eller behandlingsstress (additivt stress) i merden. Ved lavere temperaturer vil en forvente at det går lenger tid.

Det er behov for å finne ytterpunktene for hva berggylt tåler av temperaturendringer, men generelt er det gunstig å akklimatisere til lavere temperatur for å redusere temperaturoppet ved overføring til nytt miljø mest mulig.

Det relativt høye stressnivået på fisk i holdekaret før fisken ble overført til de forskjellige forsøkskarene tyder på at berggylt er spesielt følsom for forstyrrelser (aktiviteter) i nærheten av karet. Den lave stressresponsen og raske akklimatiseringen etter overføring av fisk til gruppe L, som til forskjell fra de andre gruppene var avskjermet med presenning, indikerer at skjerming fra aktiviteter/forstyrrelser kan ha spesiell betydning for reduksjon av stress hos berggylt.

De sekundære responsene på stress gir seg moderate og kortvarige utslag i pH og plasmaioner, og reflekterer en god toleranse og effektiv regulering av likevekt (homeostase) etter miljøovergangene. Den lille og forbigående reduksjonen i pH like etter overføring til forsøkskarene er sannsynligvis påvirket av økt CO₂ i blodet (Gilmour & Perry 2009) som følge av økt metabolisme eller svømmeaktivitet knyttet til håving og flytting av fisken. Reguleringen av pH skjer primært over gjellene (utveksling av H⁺ og HCO₃⁻) og er koplet til Na⁺ og Cl⁻ (Perry & Gilmour 2006). Dette kan forklare noe av økningen i Na⁺ og Cl⁻ for berggylt samtidig med pH-droppet etter 8 timer.

I tillegg er ionekonsentrasjonen påvirket av kortisol gjennom regulering av permeabiliteten i gjellene (Wendelaar Bonga 1997). I sjøvann under kraftig stress vil fisken dehydrere og ionekonsentrasjonene øke, mens ionekonsentrasjonen vil bli redusert i ferskvann. Samlet vurdert er det indikasjoner på forbigående osmotisk stress kort tid etter overføring til forsøksbetingelsene, og nedregulering til stabile nivåer etter 24 timer, som indikerer effektiv osmoregulering under de testede miljøforholdene. Unntaket er fisk som ble utsatt for en kortere eksponering med ferskvann, hvor evnen til regulering av stress og ionebalanse ble tydelig svekket.

Konklusjoner og anbefalinger

En er helt i startfasen i forhold til å undersøke og forstå miljøresponsen til berggylt, både i forhold til tilpasning til nye miljøbetingelser etter utsett i merd, samt hva som er optimale miljøbetingelser for oppdrett på land og hold i merd med laks. Regulering av lysintensitet, og muligens skjerming fra støy eller andre stressorer utenfor karet, ser ut til å være spesielt viktig for berggylt i oppdrett. Høy lysintensitet er mer gunstig enn lav. Overført til en transportsituasjon vil en forvente at berggylta takler overgangen til merd bedre i dagslys enn i mørke eller i dimmet belysning.

Berggylta er svært tolerant for redusert salinitet (brakkvann), og brakkvannslokaliteter er i utgangspunktet egnet for berggylt. Toleransen for lav salinitet kan variere med temperatur, og kan tenkes å svekkes ved lavere temperatur enn det som er undersøkt. Korttidseksponering av berggylt til ferskvann kan gi langvarig stressreaksjoner og osmotisk stress.

Berggylt tåler godt moderat temperaturoppgang fra ca. 12 til 8-9 °C, men toleranse for større dropp er mer usikkert. Generelt trenger fisk lengre tid på akklimatisering ved lave temperaturer, noe som øker sjansen for akkumulering av stress etter utsett i kalde perioder. Det er da spesielt viktig med strategier før og under transport som reduserer stress, for eksempel forhånds-akkimring slik at miljøsprang reduseres, samt og at fisken etter utsett i merd skjermes for additivt stress spesielt i tilvenningsfasen etter utsett. Tiltak kan være bruk av akklimeringsmerd, redusert håndtering og annen operasjonelle forstyrrelser, flytting av utsettingstidspunkt til mer gunstige perioder osv.

Strømforhold er en miljøparameter som kan variere mye mellom lokaliteter, og som en ikke kjenner betydningen av hos berggylt. Det er behov for undersøkelse av toleranse for strømhastighet, samt hvordan berggylta takler forskjellige kombinasjoner av miljøforhold, f.eks. høy temperatur ved høy strømhastighet, eller lav temperatur og lav salinitet.

Miljøresponsen undersøkt i dette forsøket med berggylt er gjort innenfor relativt snevre gradienter. Det er behov for nærmere kartlegging av toleranse for mer ekstreme miljøoverganger for å teste ytterpunktene hva berggylta tolererer.

Referanser

- Árnason, T., Magnadóttir, B., Björnsson B., Steinarsson A., Björnsson, B.T. (2013). Effects of salinity and temperature on growth, plasma ions, cortisol and immune parameters of juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture* 380-383, 70-79.
- Boeuf, G., Le Bail, P.-Y. (1999). Does light have an influence on fish growth? *Aquaculture* 177, 129–152.
- Boeuf, G., Payan, P. (2001). How should salinity influence fish growth? *Comparative Biochemistry and Physiology* 130C, 411–423.
- Brett, J.R., Groves, T.D.D. (1979). Physiological energetics. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Brett, J.R. (Eds.), *Fish Physiology. Bioenergetics and growth*, vol. 8. Academic Press, New York, pp. 279–352.
- Gilmour, K.M., Perry, S.F. (2009). Carbonic anhydrase and acid–base regulation in fish *Journal of Experimental Biology* 212, 1647-1661.
- Handeland, S., Berge, Å., Björnsson, B.Th., Lie, Ø., Stefansson, S.O. (2000). Seawater adaptation by out-of-season Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts at different temperatures. *Aquaculture* 181(3-4), 377-396.

- Jobling, M. (1994). Fish bioenergetics. Chapman and Hall, London, UK.
- Miyazaki, T., Shiozawa, S., Kogane, T., Masuda, R., Maruyama, K., Tsukamoto, K. (2000). Developmental changes of the light intensity threshold for school formation in the striped jack *Pseudocaranx dentex*. *Marine Ecology Progress Series* 192, 267-275.
- Perry, S. F. and Gilmour, K. M. (2006). Acid-base balance and CO₂ excretion in fish: unanswered questions and emerging models. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 154, 199- 215.
- Puvanendran, V., Brown, J.A. (2002). Foraging, growth and survival of Atlantic cod, *Gadus morhua*, larvae reared in different light intensities and photoperiods. *Aquaculture* 214, 131–151.
- Staurnes, M., Rainuzzo, J.R., Sigholt, T. & Jørgensen, L. (1994). Acclimation of Atlantic cod (*Gadus morhua*) to cold water: stress response, osmoregulation, gill lipid composition and gill Na-K-ATPase activity. *Comp. Biochem. Physiol.* 109A, 413-421.
- Sæther, B.-S. (2005). Toleranse for temperaturfall hos torsk i settefiskfasen. Potensiell flaskehals i intensiv sesonguavhengig produksjon. NOFIMA, Rapport 14/2005, 24 sider.
- Vera, L.M., Davie, A., Taylor, J.F., Migaud, H. (2010). Differential light intensity and spectral sensitivities of Atlantic salmon, European sea bass and Atlantic cod pineal glands *ex vivo*. *General and Comparative Endocrinology* 165, 25-33.
- Wang, T., Cheng, Y., Liu Z., Yan S., Long X. (2013). Effects of light intensity on growth, immune response, plasma cortisol and fatty acid composition of juvenile *Epinephelus coioides* reared in artificial seawater. *Aquaculture* 414-415, 135-139.
- Wendelaar Bonga, S.E. (1997). The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77(3), 591-625.

Vedlegg 1: Beskrivelse av prøvetaking og analysemetoder

Prøvetaking og analysering av plasmakortisol

Hepariniserte sprøyter ble brukt for å ta blodprøver fra hjertet (0,2 – 0,6 ml) av bedøvd fisk. Prøvene ble overført til Eppendorfrør og sentrifugert minimum 3 minutter. Plasma ble overført til nye Eppendorfrør og holdt fryst på – 80 °C eller lavere (flytende nitrogen eller fryser) frem til analysering. For nedfrysing i felt og transport ble det enten brukt tørris eller stålbeholder mettet med flytende nitrogen (dryshippe).

Kortisolkonsentrasjonen (ng/ml) fra plasma av rognkjeks og berggyllt ble analysert med DetectX® Cortisol Enzyme Immunoassay Kit (Arbor Assays, USA). Plasma ble fortynnet 1:100, og ble analysert i duplikat. Standardkurven er lagt fra en standard med kjent kortisolkonsentrasjon og hadde en range fra 0 til 320 ng/ml. Deteksjonsgrensen ble testet til 0,045 ng/ml. Prøver utenfor standardkurvens nedre grense ble satt til <0,05 ng/ml, plasmaprøver med en kortisol konsentrasjon over 320 ng/ml ble fortynne 1:1000 og reanalysert.

Prøvetaking og analysering av pH, Na⁺, K⁺, Cl⁻ og Ca²⁺

Etter at blodplasmaet var analysert for kortisol ble resterende plasma analysert for pH, Na⁺, K⁺, Cl⁻ og Ca²⁺ ved bruk av Convergy's ISE Comfort elektrolytt analysator (Convergent Technologies GmbH & Co., Tyskland).

Prøvetaking og analyser av slimceller fra hud

Hudprøver på ca. 2 x 1 cm og ca. 0,5 cm dype ble tatt lateralt på høyre side like bak brystfinne for analysering av slimceller fra berggyllt og rognkjeks samt Q-celler for rognkjeks (Bilde 1 og 2). For berggyllt ble prøvene tatt like over sidelinjen, mens den for rognkjeks ble tatt i "gropen" som er avgrenset av en øvre og nedre rekke med beinknuter (tagger). Prøvene ble plassert enkeltvis i histokassetter og lagt i 4% fosfatbufret formalin. Hudprøvene fra samme fisk fikk samme merkenummer som plasmaprøvene.



Bilde 1: Berggyllt etter uttak av skinnprøve.



Bilde 2: Rognkjeks etter uttak av skinnprøve. Skinnprøver i histokassetter.

Prøvene ble dehydrert i etanol før innstøpning i Technovit og snittet. Snittene ble farget med Periodic Acid Schiff (PAS)-Alcian Blå og prosessert i henhold til Pittman m.fl. (2011). Hvert snitt ble gjennomgått for identifisering av relevante områder av interesse (ROI) ved bruk av billedanalyseprogrammet VIS (Version 3.6.5.0; Visiopharm Integrator System). ROI ble tilfeldig inndelt i 5–100% av det totale området av interesse, hvor antall og areal av slimceller ble målt.