

Hygienisk produksjon, desinfeksjon og transport av rogn og melke fra rognkjeks

Faglig sluttrapport

Ingrid Lein, Dag Bundgaard og Bjarne Gjerde





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

Nofima har om lag 350 ansatte.

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

Hovedkontor Tromsø:

Muninbakken 9–13
Postboks 6122 Langnes
NO-9291 Tromsø

Ås:

Osloveien 1
Postboks 210
NO-1431 ÅS

Stavanger:

Måltidets hus, Richard Johnsen gate 4
Postboks 8034
NO-4068 Stavanger

Bergen:

Kjerreidviken 16
Postboks 1425 Oasen
NO-5844 Bergen

Sundalsøra:

Sjølseng
NO-6600 Sunndalsøra

Felles kontaktinformasjon:

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

Foretaksnr.:

NO 989 278 835 MVA

Rapport

<i>Tittel:</i> Hygienisk produksjon, desinfeksjon og transport av rogn og melke fra rognkjeks	ISBN: 978-82-8296-511-8 (trykt) ISBN: 978-82-8296-512-5 (pdf) ISSN 1890-579X
<i>Title:</i> Hygienic production, disinfection and transport of lumpfish eggs and sperm	<i>Rapportnr.:</i> 16/2017
<i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Ingrid Lein, Dag Bundgaard og Bjarne Gjerde	<i>Tilgjengelighet:</i> Åpen
<i>Avdeling:</i> Produksjonsbiologi	<i>Dato:</i> 29.06.2017
<i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF)	<i>Ant. sider og vedlegg:</i> 26
<i>Stikkord:</i> Rognkjeks, egg, melke, desinfeksjon, transport	<i>Oppdragsgivers ref.:</i> FHF # 901234
<i>Sammendrag/anbefalinger:</i> I prosjektet har en undersøkt effekt av standard stryking av rogn og melke, og kirurgisk uttak av gonader med hensyn til generelt bakterietall, og kjente patogener hos rognkjeks. Det ble ikke funnet store forskjeller mellom de to metodene, men det må understrekes at antall undersøkt fisk var lavt. Rogn ble gitt standardisert sjokk på ulike tider etter befruktning, og det ble vist at rogn er mest følsom den første uka etter befruktning, og i siste periode fram mot klekking. Det ble gjort forsøk med simulert seks timer transport på ulike tidspunkt etter befruktning. Rogna ble pakket tørt i transportkasser for laks med overrissing av vann fra våt sjøis. Rogna tålte transporten en dag etter klekking befruktning, deretter var den mer følsom fram mot øyerognstadiet, og i siste periode fram mot klekking. Resultatene viser at rogn kan transporteres fuktig uten vann, og at temperaturen holder seg stabil under transporten. Det ble gjort en serie desinfeksjonsforsøk. To midler, Ovadine (jod) og glutaraldehyd ble testet under befruktning, like etter befruktning, og ved øyerognstadiet. Metodene som ble testet ga ikke tilfredsstillende resultat under og like etter befruktning, men tyder på at desinfisering av øyerogn gir økt klekkeprosent.	<i>Prosjektnr.:</i> 11665
<i>English summary/recommendation:</i> Stripping of lumpfish eggs and milt was compared to dissection of gonads with emphasis on bacterial growth and detection of known pathogens. Disinfection of newly fertilized eggs or eyed eggs was tested using iodine or glutaric aldehyde. Effects of handling on egg development and hatching was investigated in two experiments. No major differences in bacterial counts observed between stripping and dissection of gonads. Disinfection during egg hardening can not to be recommended while disinfection at the eyed egg stage improved hatching. It is not recommended to handle or transport Lumpfish eggs during the first week post fertilization, and not too close to hatching.	

Forord

FHF er oppdragsgiver for prosjektet (FHF-prosjekt 901234), og har finansiert prosjektet i sin helhet. Prosjektet har en ramme på 1 550 000 NOK, og en tidsramme på 8 mnd. På grunn av uforutsette tekniske problemer, og på grunn av problemer med rognkvalitet hos høstgytende villfisk måtte enkelte forsøk utsettes, og enkelte gjentas for å verifisere resultatene. Prosjektet er derfor 6 måneder forsinket.

Innhold

1	Innledning.....	1
2	Problemstilling og formål	2
3	Prosjektgjennomføring.....	3
4	Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjoner	24
5	Leveranser	26

1 Innledning

Oppdrett av rognkjeks for bruk i laksemerder øker raskt i omfang. Det viser seg at rognkjeks er utsatt for ulike smittsomme sykdommer som atypisk furunkulose (*Aeromonas salmonicida*) og vibrio (ulike varianter) allerede i yngelstadiet før vaksinerings. Fordi det fremdeles er vanlig å bruke villfanget stamfisk er det en risiko for vertikal smitte av patogener som kan ha en negativ effekt på utviklingen av rogn og yngel. I tillegg til atypisk *A. salmonicida* og *vibrio* er både *Pasteurella sp.*, *Lumpfish flavivirus*, blodparasitten *Nuclospora cyclopteri*, og amøben *Paramoebae peruvans* påvist i villfanget stamfisk.

Det er stor variasjon i klekkesuksess hos ulike rogngrupper, og det er ikke uvanlig at enkelte grupper går helt ut før klekking, noe som ofte assosieres med oppblomstring av bakterier. Desinfeksjon av rogn ved inntak i klekkeriet, rensing av vann, og generelt gode hygienerutiner i klekkeri- og yngelavdeling er god sikring mot sykdomssmitte. Nybefruktet lakserogn desinfiseres rutinemessig med en jodløsning ved inntak til klekkeriene. Denne prosedyren kan ikke uten videre overføres til rognkjeks fordi eggene klister seg sammen i kontakt med sjøvann, og eggene former da en hard «kake». Ved desinfeksjon etter befruktning er det derfor vanskelig å nå alle eggene. Et alternativ er å hindre utvikling av limlaget, for eksempel ved enzymbehandling før befruktning. Dette er en problemstilling det ble arbeidet med i FHF-prosjekt #900997 Stamfiskhold rognkjeks.

Ubefruktet rogn og melke har vært fraktet over større avstander langs Norskekysten, og også til Storbritannia de siste årene, men med varierende resultat. Transporter over 10 timer ser ut til å være negativ for befruktning og overlevelse fram til klekking. Fra andre arter vet en at rogn er følsom for håndtering på enkelte stadier. Dette er årsaken til at rogn fra for eksempel laks, regnbueørret, kveite og torsk først transporteres etter at den har nådd øyerognstadiet. Det er naturlig å tro at en etter hvert vil gå over til transport av befruktet rognkjeksrogn, og det er derfor behov for kunnskap om hva som er beste alder for transport, og for metoder som gir stabile forhold under transporten med tanke på temperatur og oksygentilgang.

Idégrunnet til prosjektet er kommet gjennom henvendelser fra næringen, og diskusjoner med ulike aktører som er involvert i produksjon av rognkjesyngel.

Prosjektet har en ramme på kr 1 550 000, og varighet fra april-desember 2016. På grunn av mye dårlig kvalitet på villfanget rogn høsten 2016 måtte flere forsøk kjøres gjentatte ganger. Det er mistanke om at høy sjøtemperatur (>15°C i september/oktober) på de dypene hvor fisken ble fanget kan være en årsak til dårlig rognkvalitet.

Nofima ved Ingrid Lein har ledet prosjektet. Patogen har gjennomført alle PCR-analyser av patogener agenser, og Sunniva Wannebo fra Patogen har deltatt aktivt ved flere prøveuttak. Skjerneset fisk v/Tor Gunnar Otterlei har velvillig supplert prosjektet med rogn og melke fra villfanget fisk, og deler av arbeidet har vært utført der. Nordland Rensefisk har også stilt fisk og fasiliteter til rådighet for prosjektet.

Stryringsgruppe:

Namdal Rensefisk/Bjørøya: Mads Kristiansen

Salmar: Marco Schaer

Alsaker: Øystein Eskeland

Marine Harvest: Olav Breck

2 Problemstilling og formål

Prosjektet har som mål å bidra til å redusere risikoen for å spre smittsomme agens i forbindelse med stryking av rogn og melke fra villfisk, og starte arbeidet med utvikling av en trygg metode for transport av ubefruktet og befruktet rogn.

Delmål:

- 1) Utvikle en standardisert metode for hygienisk høsting av rogn og melke fra rognkjeks.
- 2) Utvikle en trygg og effektiv måte for desinfeksjon av ubefruktet og befruktet rognkjeksrogn.
- 3) Skaffe kunnskap om hvilke utviklingsstadier hos rogn fra rognkjeks som er minst/mest følsomme for håndtering.
- 4) Utvikle en sikker og reproduserbar metode for transport av ubefruktet og befruktet rognkjeksrogn.

3 Prosjektgjennomføring

Prosjektet ble delt opp i fire arbeidspakker, en for hvert av de fire delmålene:

AP 1 Effekt av kirurgisk uttak av gonader

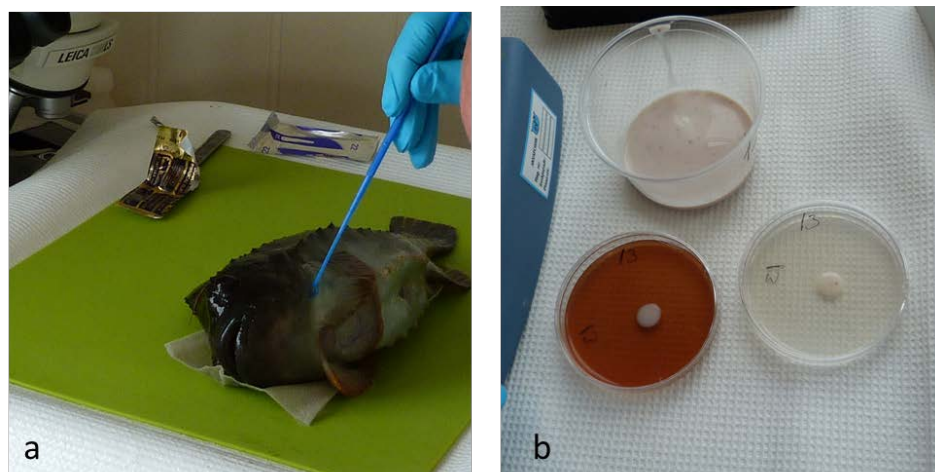
Prosjektet ble etablert i april 2016, og mai samme år ble det i samarbeid med Patogen gjort uttak for PCR-analyser og bakteriedyrking fra gonade og nyre hos hanfisk (AP1). Denne arbeidspakken hadde som mål å klarlegge:

- Kan det påvises kjente patogene agens i kjønnsprodukter eller andre organer hos rognkjeks?
- Vil kirurgisk uttak av rogn og melke redusere funn av patogene agens sammenlignet med tradisjonell stryking?

Uttak av hannlige gonader ble utført hos Nordland Rensefisk på Lovund (Figur 1). Det var planlagt å stryke melke fra 10 hanner på tradisjonelt vis, og å gjøre kirurgisk uttak fra 10 andre hanner. På grunn av begrenset antall tilgjengelige hanner ble totalt antall hanner som ble undersøkt 17, hvorav kun 5 slapp rennende melke.

I mai 2016 ble det i samarbeid med Patogen gjort tilsvarende uttak fra 20 hunnfisk hos Skjerneset Fisk på Ekkilsøy i Møre og Romsdal. Det ble gjort kirurgisk uttak av rogn fra 10 hunner mens rogn fra de resterende 10 hunnene ble strøket på tradisjonelt vis.

Det ble tatt prøver fra hud rundt gatt og sugeskopp til generell bakterievekst før fisken ble bedøvd og avlivet. Det ble tatt prøver på RNA-later til PCR-analyser fra hodenyre (Figur 2), rognvæske og melke.

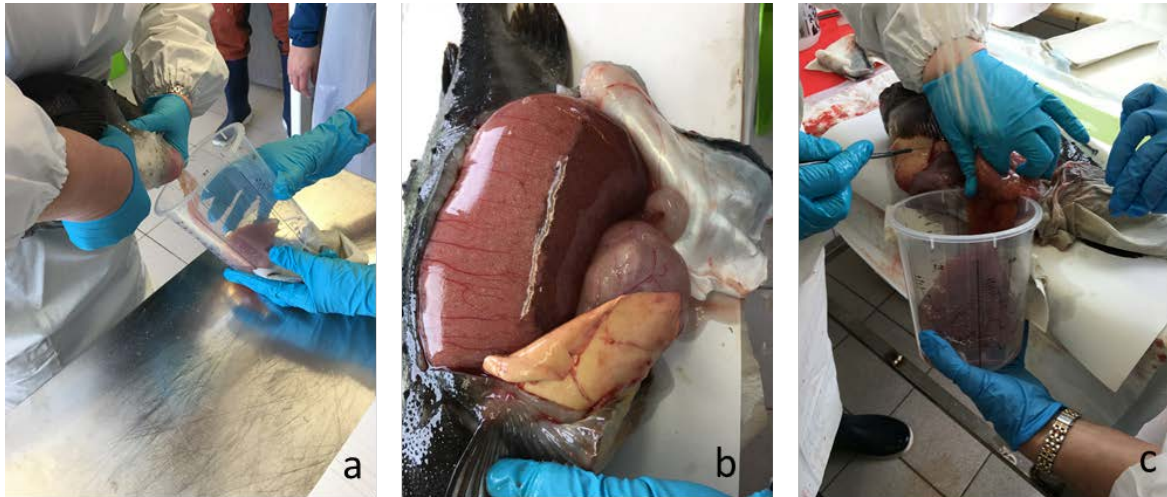


Figur 1 Uttak av bakterieprøver fra sugeskopp og gattåpning (a), og fra melke (b). Bakteriene ble dyrket på marin agar og blodagar.



Figur 2 Uttak av hodenyre til PCR-analyse.

Stryking av rogn (Figur 3) og melke (Figur 4) ble gjort etter standard metode ved at fisken ble tørket med papir før rogn ble strøket.



Figur 3 Stryking av rognkjeksrogn (a), og kirurgisk uttak av rogn (b og c).



Figur 4 Stryking av melke fra rognkall (a) og kirurgisk uttak av melke (b).

Ved kirurgisk uttak av rogn og melke ble fisken vasket med sprit utvendig før uttak av gonade, og fisken ble åpnet med skalpell (Figur 3b, 3c og 4b). Hos hannene ble hele gonaden dissekert ut. Deretter ble den kværnet og silt før det ble tatt prøver til bakteriologi og PCR-analyse. Hos hunnfisk ble rognsekken åpnet for å ta ut rogn før det ble tatt prøver til bakteriologi og PCR-analyse. Det ble benyttet sterilt engangsutstyr ved uttak av prøver, øvrig utstyr ble desinfisert med 10 % klor mellom hver fisk. Rogn og melke ble analysert for atypisk furunkulose, *Aeromonas salmonicida*, og *Pasteurella sp.*

Etter at gonadene var fjernet ble det tatt prøver av gjeller og nyre for PCR-analyse for atypisk furunkulose, Infeksiøs Pankreas Nekrose Virus (IPNV), *Nucleospora cyclopteri*, *Paramoeba perurans* (AGS), *Pasteurella sp.* og *Viral Hemoragisk Septikemi Virus* (VHSV).

PCR benyttes for å påvise små mengder agens i vev. CT-verdi reflekterer antall sykluser som må til for å nå en terskelverdi. Jo mer agens som er tilstede, jo færre PCR-sykluser skal til før det kan påvises. Dette betyr høye CT-verdier ved lav forekomst av agens, og lave CT-verdier ved høy forekomst av agens. Det at et agens påvises betyr ikke nødvendigvis at fisken er syk.

Resultater og diskusjon

Ved bruk av PCR-analyse ble det ikke påvist kjente patogener i melke fra noen av de 17 hannene som ble testet ved Nordland Rensefisk.

I nyre ble det påvist *Nucleospora cyclopteri* i 9 hannfisk. Av disse hadde tre fisk CT-verdier som er så lave (8,34 og 8,42) at det er grunn til å mistenke at fisken kan være syk.

Det ble ikke påvist kjente patogener i rognvæske fra noen av de 20 testede hunnene fra Ekkilsøy.

I nyre ble det påvist *Nucleospora cyclopteri* i 12 hunner. Av disse hadde ingen så lave CT-verdier at det er grunn til å mistenke at fisken kan være syk.

Nå det gjelder generell bakteriologi ble det ikke funnet noen systematisk sammenheng mellom høstingsmetode og bakterievekst på marin agar og blodagar. Det er tendens til at fisk som har stått lenge på land før høsting av melke gir mer bakterievekst. Dette er det nå tatt hensyn til ved at fisken holdes kortere tid på land etter fangst.

Antallet fisk som er undersøkt i studien er begrenset, 17 hanner og 20 hunner. Analyser for kjente patogener er etter dette tatt rutinemessig i bruk av industrien. Vi har fått tilgang til noen av disse analysene. I ett tilfelle ble *Pasteurella sp* påvist i rogn fra 3 av 42 fisk. I tillegg viser dataene hyppig påvisning av *Nucleospora cyclopteri* både i nyre, melke og rogn. *Nucleospora cyclopteri* ser ut til å være det mest utbredte patogenet i villfanget rognkjeks. Vi vet imidlertid per i dag ikke om parasitten smitter vertikalt til avkom. Vi vet heller ikke hvilke CT-verdier som tilsier at fisken er syk. Når det gjelder generell bakterievekst er det noe overraskende at det ikke ble funnet noen systematiske forskjeller mellom melke/rognvæske fra fisk hvor gonaden ble høstet ved stryking kontra kirurgisk uttak av rogn/melke.

Det kan nevnes at Nofima i juni 2016 analyserte nyreprøver fra 64 kjønnsmodne oppdrettede stamfisk som var klekket ved Nofima i august 2015. Det ble ikke påvist patogener i vev fra noen av disse individene.

AP 2 Desinfeksjon av ubefruktet rogn

AP 2.1 Bestemmelse av innhold av elektrolytter i rognvæske

Fysiologiske løsninger er aktuelle i senere arbeid med desinfeksjon av ubefruktet rogn, og for lagring av melke. Det er derfor viktig å kjenne sammensetningen av rognvæske og spermvæske.

Rogn ble strøket fra fire villfangede hunnfisk fra Ekkilsøy. Rognvæsken ble silt fra eggene, og deretter frosset ned til -20°C. Melke ble høstet fra gonader som ble tatt ut kirurgisk. Gonadene ble malt, silt og sentrifugert før uttak av spermvæske til analyse. Prøvene ble senere analysert for elektrolytter ved Molde sykehus.

Resultater og diskusjon

Det var overraskende stor variasjon i innhold av enkelte elektrolytter som kalium og magnesium, både mellom hanner og hunner, og mellom prøver fra fisk av samme kjønn (Tabell 1). Informasjonen fra disse analysene vil i første omgang bli benyttet til å lage en fysiologisk løsning for bruk ved proteasebehandling av rogn for å hindre dannelse av limlag. Til nå har en benyttet ferdige løsninger som f.eks. Ringers løsning. Vi har klart å hindre dannelse av limlag, men befruktningen har ikke vært tilfredsstillende. Ut fra tidligere arbeid med steinbit antar vi at sammensetningen av elektrolytter kan være viktig for befruktningsresultatet.

Tabell 1 Innhold av elektrolytter (mmol) i rognvæske og spermvæske hos rognkjeks

Fisk nr	Kjønn	Elektrolytter				
		Kalsium	Klor	Kalium	Magnesium	Natrium
1	Hunn	0,8	166,2	13	1,1	171,1
2	Hunn	0,6	166,1	13	0,8	171,3
3	Hunn	0,8	178,9	16	2,6	178,2
4	Hunn	1,0	164,9	11	5,9	171,1
Snitt	Hunn	0,8	169,0	13	2,6	172,9
5	Hann	1,3	158,1	7	8,8	163,7
6	Hann	1,4	146,3	15	7,1	157,6
7	Hann	1,3	149,6	6	9,6	155,9
8	Hann	1,8	160,8	4	12,8	163,5
Snitt	Hann	1,4	153,7	8	9,6	160,2

AP 2.2 og 2.3 Desinfeksjon av ubefruktet og befruktet rogn

Det ble gjennomført fire forsøk med ubefruktet og nybefruktet rogn, og et forsøk hvor desinfisering av øyerogn inngår (Forsøk 4). Det første forsøket ble gjennomført i juni 2016 (forsøk 0). På grunn av uforutsette problemer med vannbehandlingen måtte dette forsøket avbrytes. AP2.2. og 2.3 er slått sammen i rapporten fordi det siste forsøket (forsøk 4) omfatter både ubefruktet og befruktet

Desinfeksjonsforsøk 1

Forsøk 1 ble gjennomført i september 2016 da det ble tilgang på rogn fra høstgytende villfisk.

Desinfeksjon av egg med en jodløsning under eller etter herding benyttes som standard prosedyre for rogn fra laksefisk. Prosedyrene for laksefisk danner grunnlag for forsøksoppsettet som ble benyttet.

To ulike desinfeksjonsmidler ble testet, Ovadine som er et jodpreparat, og glutaraldehyd som tidligere har vært benyttet til desinfeksjon av øyerogn fra torsk og kveite. Fordi rognkjeksrogn limer seg sammen i kontakt med sjøvann kan det være gunstig å foreta desinfeksjon av rogn før den herder.

Tabell 2 Forsøksoppsett Desinfeksjonsforsøk 1. To konsentrasjoner av Ovadine ble testet som desinfeksjonsmiddel både under og etter herding. To konsentrasjoner av glutaraldehyd ble testet etter herding. Fire gjentak per behandling

Behandling	1	2	3	4	5	6	
	Under herding		Etter herding				
Ubehandlet kontroll	Ovadine 50 ppm 30 min	Ovadine 100 ppm 10 min	Ovadine 50 ppm 30 min	Ovadine 100 ppm 10 min	Glutaraldehyd 200 ppm 8 min	Glutaraldehyd 400 ppm 4 min	Antall inkubatore
4	4	4	4	4	4	4	28

Før forsøket ble startet ble effekten av Ovadine og glutaraldehyd på spermienes motilitet testet under mikroskop. En liten dråpe melke ble plassert på et mikroskopglass. Motiliteten ble sjekket ved å tilsette en liten dråpe sjøvann til melken (kontroll), dette starter svømmeaktivitet hos spermier. For de andre gruppene ble motiliteten testet ved at sjøvannet ble tilsatt, 50 ppm Ovadine, 100 ppm Ovadine, 200 ppm glutaraldehyd eller 400 ppm glutaraldehyd før blandingen ble brukt til å sjekke motiliteten hos spermier. Det ble ikke observert noen reduksjon i motilitet hos spermier som ble tilsatt sjøvann med Ovadine i forhold til kontrollen, mens spermier som ble tilsatt sjøvann med glutaraldehyd mistet all motilitet. Det ble derfor besluttet at kun Ovadine skulle testes som desinfeksjonsmiddel under herding.

Ubefruktet rogn og melke fra villfisk ble fraktet med bil fra Skjerneset Fisk, Averøy til Nofima, Sunndalsøra (to timer). Rogn fra flere hunner ble blandet, og melke fra flere hanner ble blandet. Før forsøket startet ble spermietettheten i melken fra hver hanfisk sjekket ved bruk av fotometer, og motiliteten på spermier ble undersøkt under mikroskop ved å tilsette en dråpe sjøvann. Kun melke med >8 mrd. spermier/ml og med god motilitet ble benyttet til befruktning av rogn.

Løsninger med ulike konsentrasjoner av Ovadine og glutaraldehyd var forberedt på forhånd. Desinfeksjonsmidlene ble løst i 1 µm filtrert og UV-behandlet sjøvann om ble filtrert gjennom 0,2 µm filter før bruk (se Tabell 3). Denne vannkvaliteten ble også benyttet for befruktning og inkubering av all rogn som er beskrevet i rapporten. Vanntemperaturen ble holdt på 7,5-9°C.

Tabell 3 Oversikt over løsninger benyttet til desinfeksjon av rogn

	Ovadine (ppm)		Glutaraldehyd (µm)	
	50	100	200	400
ml/l sjøvann	5	10	0,8	1,6

50 ml rogn ble fordelt i engangs litermål merket med forsøk nummer, behandling, konsentrasjon og inkubatornummer. Deretter ble rogn befruktet med 500 000 spermier per egg. For å kunne kontrollere behandlingstiden ble kontrollgruppen og desinfeksjon under herding gjennomført først, deretter desinfeksjon etter herding. Før befruktning av rogn ble det tatt ut prøver av rognvæske og melke til PCR-analyser, og til bakterievekst på sjøvannsagar og blodagar. For bakterievekst ble 10 egg overført til 1 ml 0,2 µm filtrert sjøvann, og ristet med en wortexer i 20-30 sekunder. Deretter ble det gjort en 10 x fortykning etterfulgt av utstryk på sjøvannsagar og blodagar (for hemolysende bakterier). For melke og rognvæske ble det tatt ut 1 ml som ble løst i 9 ml finfiltrert sjøvann før

fortynning x10, og utstryk på begge agartypene. Denne prosedyren ble fulgt for forsøk en og to, mens en for forsøk 4 bare benyttet sjøvannssagar. Skålene ble avlest 4-5 dager etter utstryk. Prøver til PCR-analyser ble tatt med utstyr som ble sterilisert i en 10 % klorløsning mellom hver fisk. Etter desinfisering ble det tatt ut ca 0,75 ml rogn for PCR-analyse. Samme volum ble tatt ut av melke og rognvæske. Prøvene sto over natt i kjøleskap før de ble sendt med is til Patogen.

For kontrollgruppen ble melken ristet raskt i sjøvann før blandingen ble tømt forsiktig over rogn. For behandling 1 og 2 ble melken blandet raskt med henholdsvis sjøvann tilsatt 50 ppm eller 100 ppm Ovadine. Tre minutter etter befruktning ble det tatt ut en prøve av rogn til beregning av befruktningsprosent. Prøvene ble lagt i separate petriskåler, og skylt i sjøvann før de ble plassert på et rørebrett. Resten av rogn sto 10 minutter med desinfeksjonsløsningene før den ble skylt tre ganger i 100 ml autoklavert sjøvann. Deretter ble det tatt ut prøver til PCR-analyser, og til bakterievekst på sjøvannssagar og blodagar. Etter prøvetaking ble rogn lagt over i perforerte aluminiumsbokser som ble plassert i et inkubatorrom med separate inn- og utløp for vann.

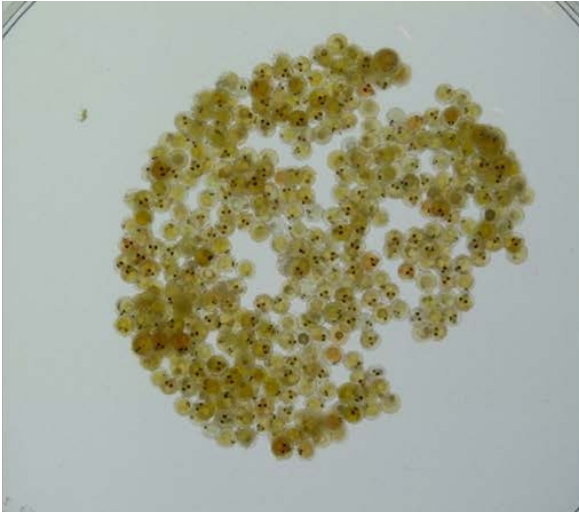


Figur 5 Rogn i perforerte aluminiumsbokser plassert i inkubatorrom med separate inn- og utløp for vann.

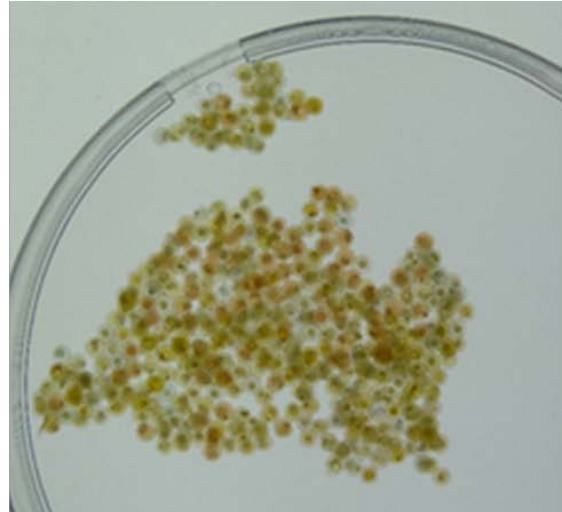
Resultater og diskusjon

Andel øyerogn i kontrollgruppen var høy, 95,5 %. Rogngruppene som var desinfisert med Ovadine eller glutaraldehyd hadde en befruktning mellom 92,6 og 96,6 %. De ble ikke funnet signifikante forskjeller mellom de ulike behandlingene som ble gjort etter at rogn var herdet (Figur 6).

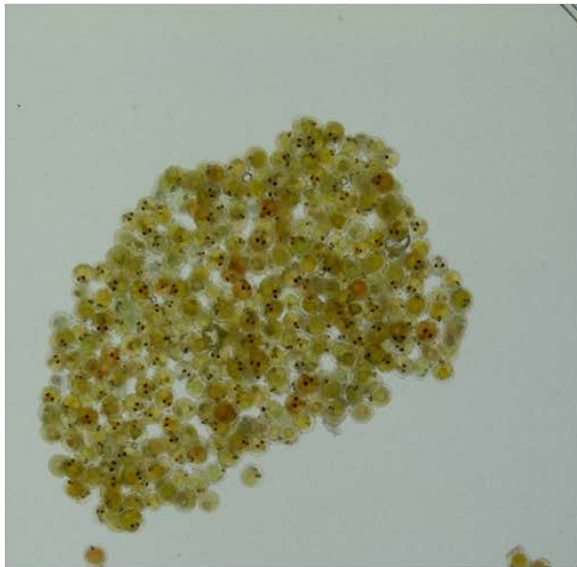
Rogn som ble desinfisert under befruktning (dvs. før herding) viste ingen befruktning (Figur 6 og 7) til tross for at det ikke var observert noen reduksjon i motiliteten på spermier når de ble tilsatt sjøvann med 50 eller 100 ppm Ovadine.



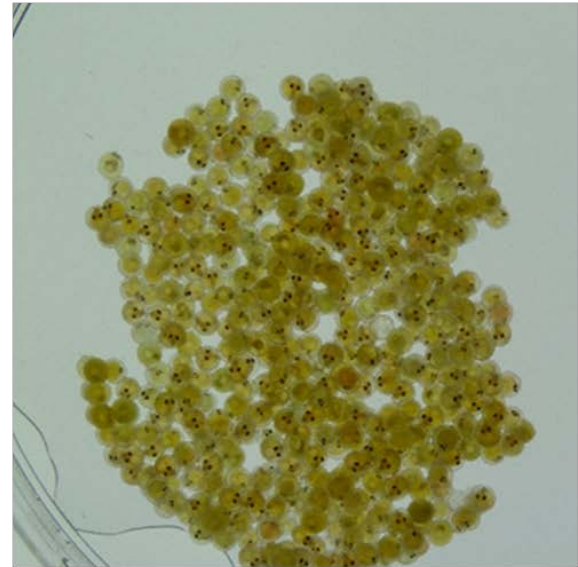
Kontrollgruppe



50 ppm Ovadine i 30 min før herding

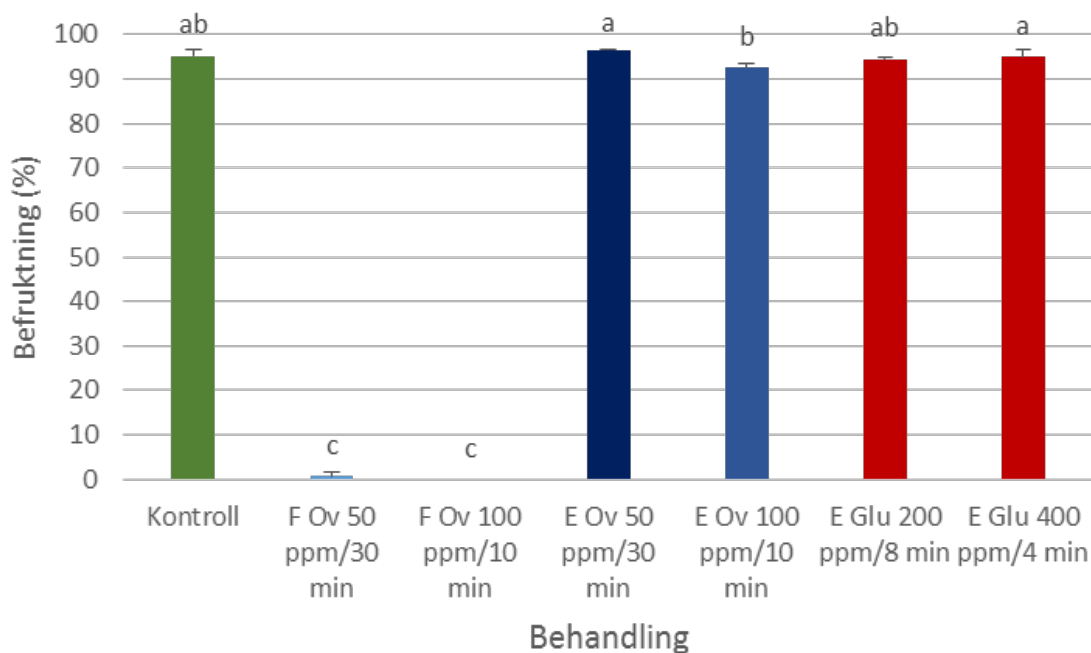


100 ppm Ovadine i 10 min etter herding



200 ppm Glutaraldehyd i 8 min etter herding

Figur 6 Sjekk av andel øyerogn i de ulike forsøksgruppene i forsøk nr. 1. Rogn som ble desinfisert før herding (øverst til høyre) viste ingen utvikling.



Figur 7 Prosent øyerogn ved de ulike behandlingene i forsøk nr 1. F OV = desinfisering med Ovadine før herding, E OV = desinfeksjon med Ovadine etter herding, E Glu=desinfisering med glutaraldehyd etter herding. Standardfeil og signifikansnivå er vist på søylene, $p < 0,05$.

Ved PCR-analyse ble det funnet *nucleospora* i rognvæske, og i 1 av 29 egg. Det ble ikke funnet *nucleospora* i melke. Forekomsten av bakterier var svært lav etter desinfisering (Tabell 4). Ubefruktet rogn og rognvæske inneholdt også lite bakterier, mens melke hadde høyere bakterietall før desinfisering.

Tabell 4 Antall bakteriekolonier etter ulike behandlinger i desinfiseringsforsøk 1. Tallene viser CFU per 10 egg

	Konsentrasjon (ppm)	Varighet (min)	Tidspunkt behandling	Sjøvannsagar CFU	Blodagar CFU
Kontroll	Ubehandlet	-	-	20	0
Ovadine	50	30	FH	0	0
Ovadine	100	10	FH	0	0
Ovadine	50	30	EH	0	0
Ovadine	100	10	EH	0	0
Glutaraldehyd	200	8	EH	0	0
Glutaraldehyd	400	4	EH	0	0
Ubefruktet rogn				50	-
Rognvæske				2400	-
Melke				34000	29000

Til tross for at det var høy prosent øyerogn både i kontrollgruppen og i gruppene som ble desinfisert etter herding utviklet rogn seg dårlig fram mot klekking, og det var svært få egg som klekket. Dette var et generelt problem høsten 2016. Det er mistanke om at den høye sjøtemperaturen på de dypene

hvor fisken ble fanget (>15°C) kan ha påvirket kvaliteten på rogn. På grunn av dette ble forsøket gjentatt senere da sjøtemperaturen var lavere (ca 10°C).

Desinfeksjonsforsøk 2

I forsøk 2 ble behandlingene under herding utelatt fordi befruktningsresultatet i forsøk 1 forsøk var dårlig for disse behandlingene. I stedet ble det lagt til en behandling som benyttes for berggylltrogn hos Marine Harvest. Denne innebærer behandling med formalin (1:4000) dagen etter befruktning, og deretter behandling med Pyceze annenhver dag. I forsøket ble rogn behandlet med Pyceze hver tredje dag, begrunnet med at vannbehandlingen til klekkeinkubatorene ved Nofima er god (1 µm filtrering pluss UV-behandling).

Tabell 5 Forsøksdesign for Desinfeksjonsforsøk 2. Fire gjentak per behandling

Behandling	1	2	3	4	5	6
	Ubehandlet kontroll	Formalin 1:4000 dag 1 Pyceze 1 ml/10 l hver 3. dag	Ovadine 50 ppm i 30 min	Ovadine 100 ppm i 10 min	Glutaraldehyd 200 ppm 8 min	Glutaraldehyd 400 ppm 4 min
Etter herding	4	4 prøver fredag	4	4	4	4

Ubefruktet rogn og fortynt melke ble fraktet med bil fra Skjerneset Fisk, Averøy til Nofima, Sunndalsøra. Rogn fra flere hunner, og melke fra flere hanner ble blandet før befruktning. Skjekk av melkekvalitet og befruktning av rogn ble gjennomført som for Desinfeksjonsforsøk 1. Det ble lagt inn 50 ml rogn per gjentak. Det ble regnet ca 80 000 rogn/liter. Andel øyeroggn ble beregnet ut fra telling av befruktet og ubefruktet rogn i petriskåler 16 dager etter befruktning. Andel øyeroggn ble beregnet til ca 90 % i alle behandlingene.

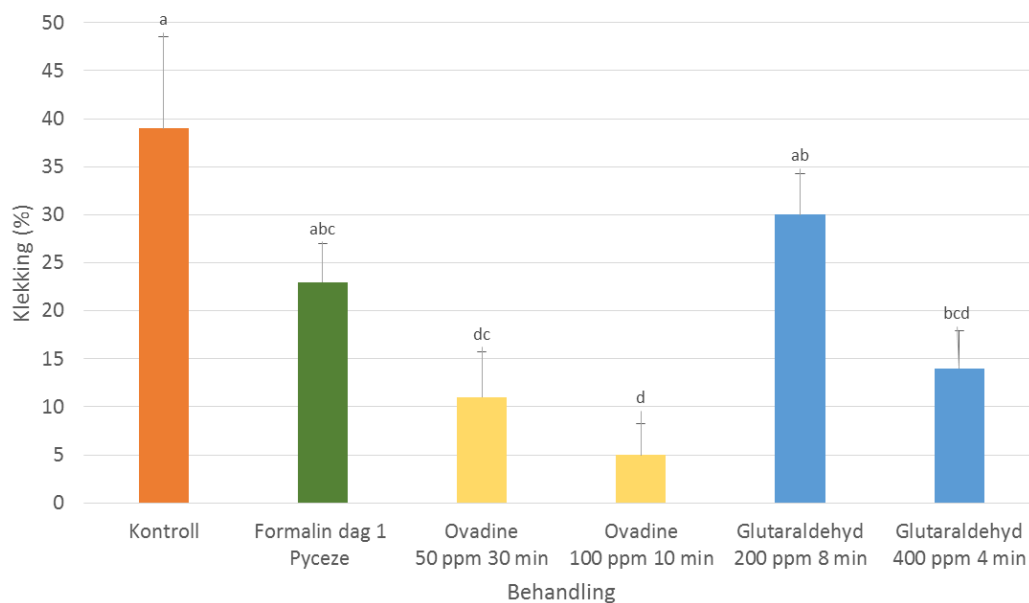
Rogna i behandling 2 ble behandlet med formalin (1:4000) dagen etter befruktning. Vannet i de fire inkubatorene ble stoppet, og det ble tilsatt 750 µl 4 % buffret formalin. Etter 45 minutter ble vanngjennomstrømning startet igjen. Deretter ble den samme rogn behandlet med Pyceze hver tredje dag, men ingen behandling de siste tre dagene før klekking. 300 µl Pyceze (1ml/10 l) ble blandet i 150 ml sjøvann og tilsatt i hver av de 4 inkubatorene. Beregnet tid for vannutskifting var 30 minutter under behandlingen.

Ved avslutning av forsøket ble rogn og eggeskall separert ved å fjerne så mye av uklekket rogn som mulig før den perforerte kassen med rogn og larver ble senket ned i en transparent kon. Resten av eggeskallene ble fjernet før larvene ble tappet ut i en liten håv. Håven ble tørket med tørkepapir, og deretter veid. Ut fra veing av et mindre antall larver ble så totalt antall klekte larver beregnet. Det er vanskelig å beregne klekkeprosent nøyaktig fordi larvene fester seg til underlaget.

Resultater og diskusjon

Klekkeprocenten var relativt lav for alle behandlinger (fra 11 til 39,2 %, Figur 8). Kontrollgruppen som ikke var desinfisert hadde høyest klekkeprocent (39,2 %), mens den laveste konsentrasjonen av glutaraldehyd (200 ppm i 4 min.) og behandling med formalin (29,8 %) og Pyceze (22,7 %) ga best klekking blant gruppene som ble desinfisert. Gruppene som ble behandlet med Ovadine hadde 11 % (50 ppm i 30 min.) og 4 % (100 ppm i 10 min.) klekking.

Selv om alle behandlingene resulterte i høy andel øyerogn (95 %) var det ingen av behandlingene som ga like god klekking som kontrollen. Behandling med Ovadine ga svært lav klekkeprosent, og ser derfor ut til å være lite egnet til desinfeksjon av nybefruktet rognkjeksrogn. Det samme gjelder den høyeste konsentrasjonen av glutaraldehyd.



Figur 8 Klekkeprosent i Desinfeksjonsforsøk 2. Fire gjentak for hver behandling.

Forekomsten av bakterier var lav etter desinfisering (Tabell 6). Ubefruktet rogn og rognvæske inneholdt også lite bakterier, mens melke lå en god del høyere.

Tabell 6 Antall bakteriekolonier etter ulike behandlinger i desinfiseringsforsøk 2. Tallene viser CFU per 10 egg

	Konsentrasjon (ppm)	Varighet (min)	Tidspunkt behandling	Sjøvannsagar CFU	Blodagar CFU
Formalin dag 1 e. befr + Pyceze hver 3. dag	1:4000			95	0
Ovadine 50 ppm 15 min e. befruktning	50	30	FH	1233	0
Ovadine 100 ppm e. befruktning	100	10	FH	1581	0
Glutaraldehyd	200	8	FH	810	0
Glutaraldehyd	400	4	EH	0	0
Ubefruktet rogn (kontroll)				72,5	0
Rognvæske (kontroll)				300	0
Melke				800	200

Den lave klekkeprosenten kan ha sammenheng med at det ble brukt høstgytt rogn i forsøket. Som nevnt tidligere var det generelt problemer med utvikling og klekking av villfanget rogn i denne perioden. Resultatene fra forsøket tilsier likevel at det er behov for å undersøke andre alternativer for desinfisering av nybefruktet rogn. Et alternativ kan være «Kick-start» som benyttes til desinfisering av kveiterogn og tidvis rognkjeksrogn i Skottland. Dette er et eddiksyrebaseret middel som benyttes til rengjøring og desinfeksjon i matindustrien.

Desinfeksjonsforsøk 3

I dette forsøket ble ble effekt av desinfisering av befruktet rogn ved øyerognstadiet undersøkt med hensyn til klekkeprosent, og forekomst av bakterier.

Forsøksoppsettet er vist i tabell 7. Fordi klekkesultatet i forsøk 2 var generelt dårlig, inkludert kontrollgruppen, ble de samme behandlingene gjentatt i forsøk 3. I tillegg ble det lagt inn en ny behandling med Ovadine under herding. Her ble spermene tilsatt rogn før sjøvann tilsatt 50 ppm Ovadine ble tilsatt 3 minutter senere Dette for å undersøke om spermene da kunne befrukte rogn, eller om det er egget som blir negativt påvirket når det desinfiseres før befruktning mens microfylen fremdeles er åpen.

To grupper ble først desinfisert når de nådde øyerognstadiet. I behandling 10 ble rogn da desinfisert med 400 ppm glutaraldehyd i 4 minutter, noe som tilsvarer det en tidligere har testet med godt resultat for berggyllt. I behandling 11 ble rogn da desinfisert med 100 ppm Ovadine i 10 minutter, som er anbefalt for desinfisering av laksefisk.

Tabell 7 Forsøksdesign for Desinfeksjonsforsøk 3. Behandling 2 er ny behandling under herding. Behandling 10 og 11 ble gitt når eggene nådde øyerognstadiet

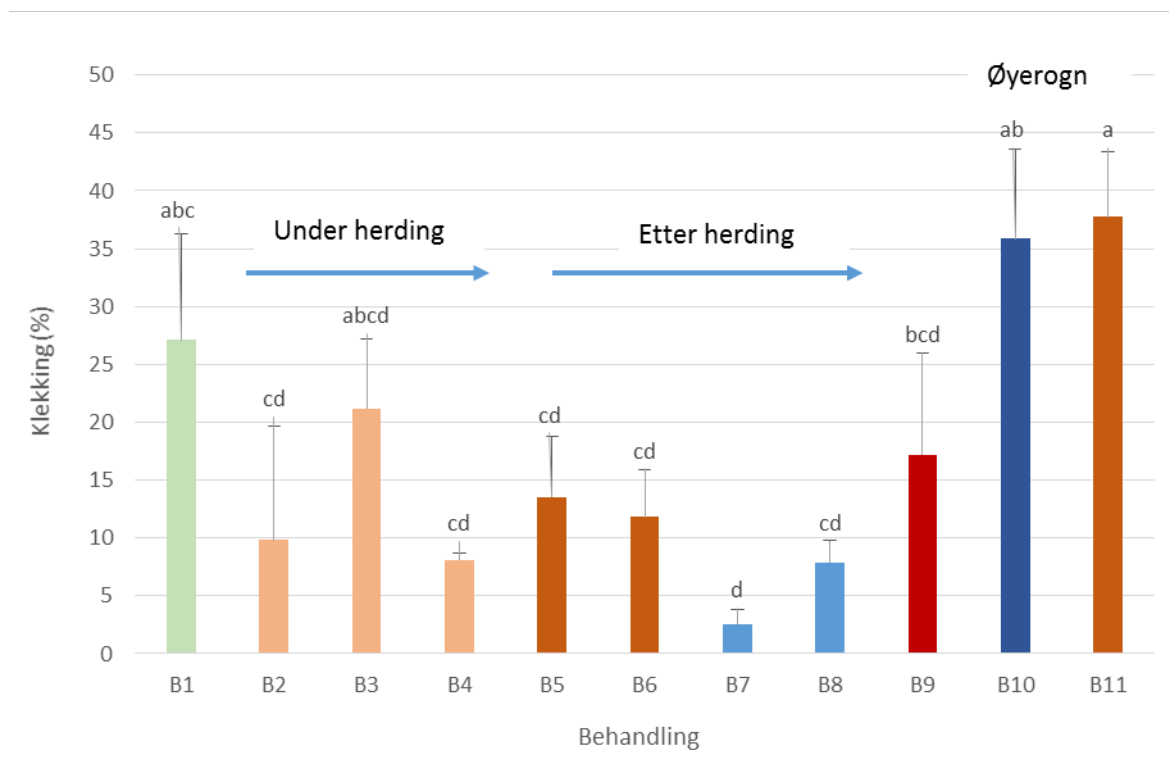
Behandling								
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ubehandlet kontroll	Desinfisering under herding			Desinfisering etter herding (15 minutter etter befruktning)				Formalin 1:4000 Pyceze 1 ml/10 l hver 3. dag
	Ovadine 50 ppm 30 min (i befr. vannet)	Ovadine 50 ppm 30 min. e. befruktning	Buffodine 10 ml/l e. befruktning	Ovadine 50 ppm 30 min	Ovadine 100 ppm 10 min	Glut. a. 200 ppm 8 min	Glut. a. 400 ppm 4 min	
12	3	3	3	3	3	3	3	3

↓

6 gjentak ved øyerogn:
T10 glutaraldehyd (400 ppm, 4 min.),
T11 Ovadine (100 ppm, 10 min.)

Rogn fra flere hunner, og melke fra flere hanner ble blandet før befruktning. Skjekk av melke kvalitet og befruktning av rogn ble gjennomført som for Desinfeksjonsforsøk 1. Det ble lagt inn 50 ml rogn per gjentak (4000 rogn forutsatt 80 000 rogn/liter). Andel øyerogn ble beregnet ut fra telling av befruktet og ubefruktet rogn 16 dager etter befruktning. Andel øyerogn ble beregnet til ca 90 % i alle behandlingene. Etter befruktning ble det tatt utstryk på sjøvannsagar etter desinfisering. Det ble samtidig tatt prøver for PCR-analyse.

Klekkeprosenten var generelt ganske lav, også i kontrollgruppen (27 %) (Figur 9). Høyest andel klekte larver ble oppnådd i gruppene som ble desinfisert med 100 ppm Ovadine i 10 minutter på øyerognstadiet (36 %), og i gruppen hvor øyerogna ble desinfisert med 400 ppm glutaraldehyd i 4 minutter (38 %). Ved desinfisering av nybefruktet rogn under herding ble det oppnådd best klekking (22 %) når melke ble tilsatt rogn før sjøvann med Ovadine ble helt over rogn tre minutter senere. Behandling med formalin dagen etter klekking, etterfulgt av behandling med Pyceze hver 3. dag, ga klekking (17 %) i samme område som desinfisering med 50 ppm Ovadine under herding (B5).



Figur 9 Klekkeprosent (med standardfeil) for rogn i Desinfeksjonsforsøk 3. B1=kontroll uten desinfeksjon, B2=melke tilsatt i befruktningsvann med 50 ppm Ovadine, B3 og B4=melke tilsatt rogn først, deretter 50 eller 100 ppm Ovadine, B5=50 ppm Ovadine i 10 min, tilsatt 15 min e. befruktning, B6=100 ppm Ovadine i 10 min, tilsatt 15 min. e. befruktning, B7=200 ppm glutaraldehyd i 8 min, tilsatt 15 min. e. befruktning, B8=400 ppm glutaraldehyd i 4 min, tilsatt 15 min. e. befruktning, B9=formalin (1:400) i 45 min dagen e. befruktning, Pyceze hver 3. dag, B10=400 ppm glutaraldehyd i 4 min ved øyerognstadiet, B11=100 ppm Ovadine i 10 min. ved øyerognstadiet. Standardfeil og signifikansnivå er vist på søylene. $P < 0,05$.

Bakterietallene var lave etter befruktning (<1000 CFU) (Tabell 8), men noe høyere enn i desinfeksjonsforsøk 1 og 2. Dette har vi ingen god forklaring på ettersom prosedyrene som ble benyttet var identiske med det som ble gjort i desinfeksjonsforsøk 1 med hensyn til desinfisering og befruktning av rogn.

Tabell 8 Antall bakteriekolonier etter ulike behandlinger i desinfiseringsforsøk 3. Tallene viser CFU per 10 egg

Behandling	Konsentrasjo n (ppm)	Varighet (min)	Tidspunkt behandling	Sjøvannsagar CFU	
1	Kontroll	Ubehandlet	-	0	
2	Ovadine 50 ppm i befruktningsvannet	50	30	FH	<1000
3	Ovadine 50 ppm etter tilsetning av melke	50	30	FH	<1000
4	Ovadine 100 ppm etter tilsetning av melke	100	10	FH	<1001
5	Ovadine 50 ppm 15 min e. befruktning	50	30	EH	<1002
6	Ovadine 100 ppm e. befruktning	100	10	EH	<1003
7	Formalin (1:4000) dag 1 e. befr + Pyceze hver	1:4000	45	Dag 1 e. befr.	<1004
8	Glutaraldehyd	200	8	EH	<1005
9	Glutaraldehyd	400	4	EH	<1006
Melke				83	

Den generelt lave klekkeprosenten kan ha sammenheng med rognkvaliteten ettersom en annen rogngruppe som ble lagt inn i klekkeriet dagen etter hadde ca 90 % klekking. Resultatene viser at alle behandlinger utført under eller etter herding ga redusert klekkeprosent, og denne metoden kan derfor ikke anbefales som standard prosedyre. Desinfisering på øyerognstadiet økte derimot klekkeprosenten, og begge desinfeksjonsmidlene kan anbefales. Jodløsninger (her Ovadine) er imidlertid mer helsevennlig for de som skal utføre desinfeksjonen. Resultatene tyder på at det er gunstig å desinfisere rognkjeksrogn på øyerognstadiet, men at det er behov for å verifisere resultatene.

AP 3.2.2 Desinfeksjon av befruktet single rogn

Single rogn – forsøk 1

I dette forsøket var planen å undersøke effekt av desinfisering? av både? klebrige og single rogn på prosent øyerogn og prosent klekt rogn. Det viste seg at metoden med bruk av enzymbehandling som tidligere har vært brukt til å produsere single egg hos berggylt fungerte dårlig for rognkjeksrogn. Det ble derfor fokus på å finne en alternativ metode som gir single rognkjeks egg. Det ble valgt å teste bruk av leire som er en metode som har vært brukt til en del ferskvannsarter med klebrige egg. Første del av dette arbeidet ble gjort hos Skjerneset Fisk, Averøy hvor det ble gjort en screening med 12 ulike behandlinger. Se Tabell 6 og Figur 9 for forsøksoppsett.

For noen grupper ble rognvæsken silt bort, mens de andre ble behandlet med rognvæsken. Noen grupper ble tilsatt leire som tørt pulver, mens de andre fikk leire blandet med sjøvann. I tillegg ble det testet om skylling med to ulike fysiologiske løsninger (HSBB og Aquacoat) før leire tilsettes kan bidra til å hindre at eggene kleber seg.

Etter at rogna var ferdig skylt ble rogna transportert i isoporkasse med is til Nofima, Sunndalsøra hvor eggene ble overført til petriskåler. Petriskålene var fylt med 30 ml 0,2 µm filtrert og UV-behandlet vann tilsatt en svak antibiotikaløsning, og det ble foretatt vannskifte to ganger per uke. Petriskålene sto på rørebrett i klimarom ved 8°C. Når eggene nådde øyerognstadiet ble eggene fotografert, og bildene ble brukt for beregning av andel øyerogn. Etter klekkingen ble antall klekte larver og uklekte egg talt opp for beregning av klekkeprosent.



Figur 10 Test av tilsetning av leire for å forhindre at eggene klistrer seg sammen.

Tabell 9 Oversikt over forsøksdesign for AP 3.2.2. Tolv ulike behandlinger med to gjentak per behandling. Tabellen viser også grad av klebrighet, prosent øyerogn og prosent klekt rogn

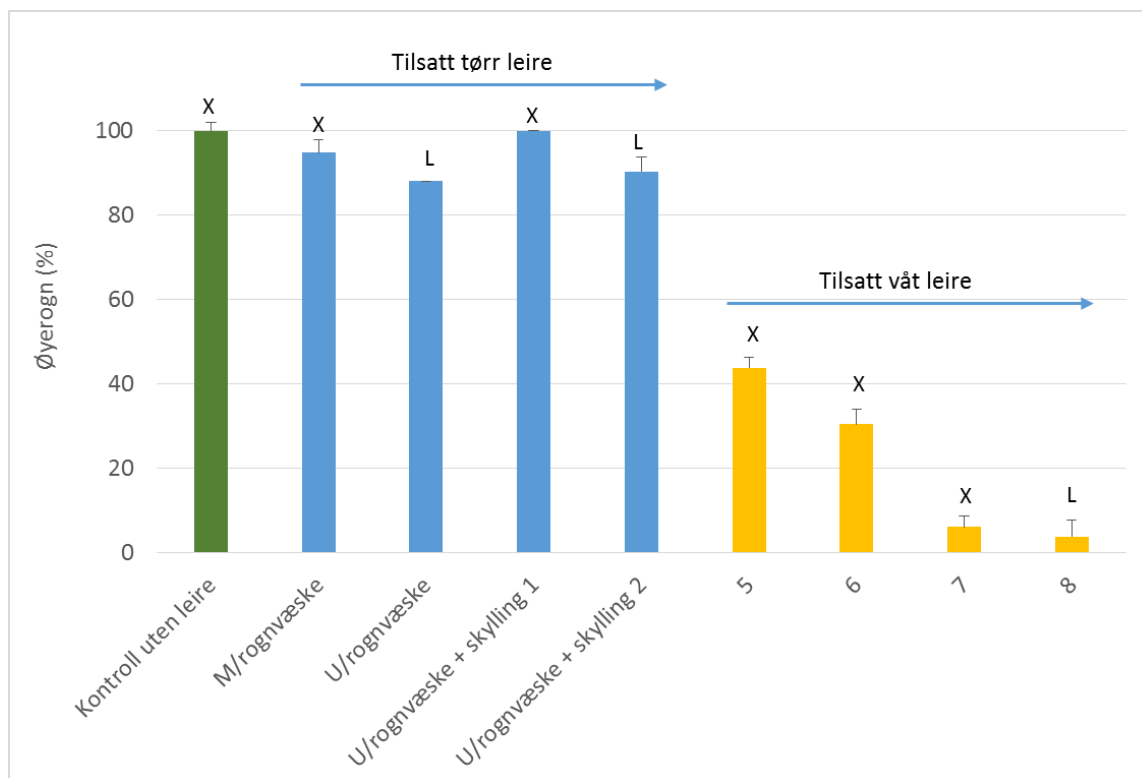
Behandling	Petriskål	Behandling	Leire tørr	Leire våt	HSBB 5 ml sjø	Aquacoat 5 ml sjø		Øyerogn %	Klekket (%)
1	1	m/rognvæske	0,1				Små klumper	93,0	0
1	2	m/rognvæske	0,1				Små klumper	96,6	0
2	3	u/rognvæske	0,1				Løs	91,3	0
2	4	u/rognvæske	0,1				Løs	84,9	0
3	5	u/rognvæske	0,1		X		Store klumper	100,0	0,6
3	6	u/rognvæske	0,1		X		Store klumper	100,0	1,3
4	7	u/rognvæske	0,1			X	Løs, noen klumper	90,3	0
4	8	u/rognvæske	0,1			X	Løs	90,4	0
5	9	m/rognvæske		0,1			Løs, noen klumper	47,3	0
5	10	m/rognvæske		0,1			Løs, noen klumper	40,5	0
6	11	u/rognvæske		0,1			Løs	33,3	6,6
6	12	u/rognvæske		0,1			Løs, noen klumper	27,6	10,6
7	13	u/rognvæske		0,1	X		Løs, en mindre klump	2,1	0
7	14	u/rognvæske		0,1	X		Større klumper	10,1	0
8	15	u/rognvæske		0,1		X	Løs	7,0	0
8	16	u/rognvæske		0,1		X	Løs	0,6	0
9	17	u/rognvæske		0,1 g			Løs, noen små klumper	52,6	0
9	18	u/rognvæske		0,1 g			Løs	29,5	16,8
10	19	u/rognvæske		0,075			Løs, noen klumper	10,3	0
10	20	u/rognvæske		0,075			Mindre klumper	25,6	4,8
11	21	u/rognvæske		0,05			Løs	63,1	0
11	22	u/rognvæske		0,05			Løs	86,0	0
12	23	Kontroll					Klump	100,0	17,7
12	24	Kontroll					Klump	100,0	12,2
12	25	Kontroll					Klump	100,0	17,3
12	26	Kontroll					Klump	100,0	13,1

I behandlingene som fikk tilsatt leire ble det rørt forsiktig med en pensel i rogn i 20 minutter før den ble skylt tre ganger med totalt 100 ml sjøvann.

Resultat og diskusjon

Kontrollgruppen hadde 100 % øyerogn, men rogn var klebrig. Det ble oppnådd en høy andel øyerogn (90,3-100 %) i alle de fire behandlingene hvor 0,1 g leire/5 ml sjøvann ble tilsatt rogn som tørt pulver (Figur 10). Av disse var det kun to behandlinger som resulterte i single egg; behandling 2 hvor rognvæsken var silt fra før tilsetning av leire, og behandling 4 hvor også rognvæsken var silt bort, og rogn skylt med HSBB eller Aquacoat før tilsetning av leire. Alle behandlingene hvor leiren var blandet med sjøvann hadde en kraftig reduksjon i andel øyerogn (Figur 11, og Tabell 6).

Klekkeprosenten var lav i alle behandlingene. Det har i gjentatte forsøk vist seg vanskelig å oppnå høy klekkeprosent i petriskåler selv om vannet skiftes, og røre Brett sørger for bevegelse i vannet.



Figur 11 Andel øyerogn med standardfeil for behandlinger med og uten rognvæske tilsatt enten leire som tørt pulver eller løst i sjøvann. X=klebrige egg, L=single egg. Skylling 1=HSSB, Skylling 2=Aquacoat.

Single egg - forsøk 2

Dette forsøket hadde som formål å verifisere resultatene fra behandlingene som ga best resultat med hensyn til andel øyerogn og single egg fra Forsøk 1. Målet var også å undersøke hvordan behandlingene påvirker klekkes resultatet. Forsøksoppsettet er vist i Tabell 10.

Tabell 10 Forsøksoppsett Forsøk 2 Single egg. Tre gjentak per behandling

Behandling	Behandling	Leire tørr	Aquacoat 15 ml
1	Kontroll		
2	m/rognveske	1	
3	U/rognvæske	1	
4	u/rognvæske	1	X

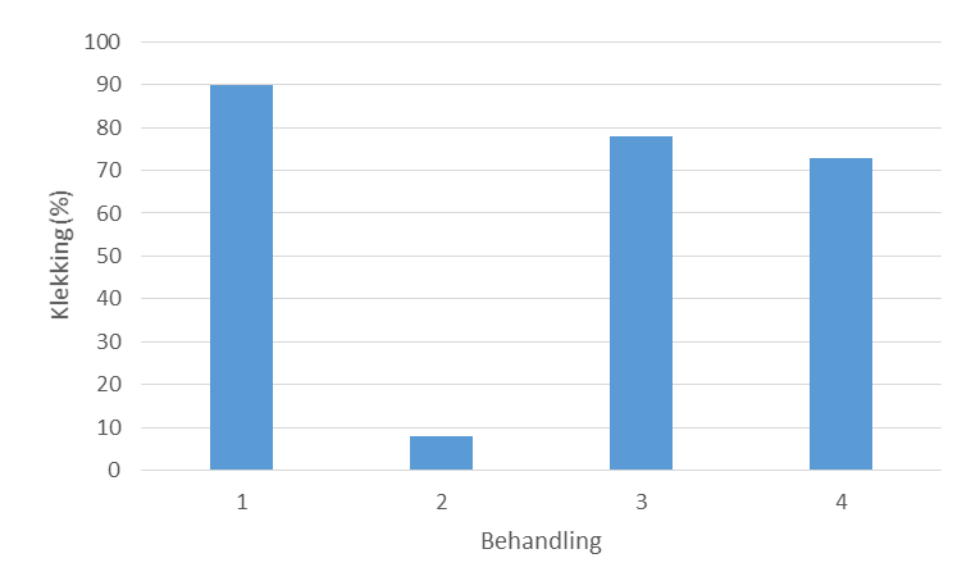
Ubefruktet rogn og fortynnet melke ble fraktet med bil fra Skjerneset Fisk, Averøy til Nofima, Sunndalsøra. Rogn fra flere hunner, og melke fra flere hanner ble blandet før befruktning. Skjekk av melke kvalitet som for Desinfeksjonsforsøk 2. Det ble lagt inn 50 ml rogn (4000 egg forutsatt 80 000 rogn/liter) per gjentak. Andel øyerogn ble beregnet ut fra telling av befruktet og ubefruktet rogn 16 dager etter befruktning. Andel øyerogn ble beregnet til ca 95 % i alle behandlingene.

50 ml rogn ble fordelt i tre litermål for behandling 1 (kontroll) og 2. For de øvrige to behandlingene ble rogn målt opp med et 50 ml målebeger med sil i bunnen slik at rognvæsken ble silt fra før rogn ble overført til litermål. Rogn i behandling 4 ble skylt i 15 ml Aquacoat (Cryogenetics) før den ble overført til litermål. Deretter ble det tilsatt 1 gram tørr leire til behandling 2, 3 og 4, og rørt forsiktig om ved hjelp av en myk pensel. Rogn i alle behandlingene ble så befruktet med 50 µl melke som ble blandet

raskt i 50 ml sjøvann. Det ble rørt forsiktig i rogn i 20 minutter etter befruktning før rogn til sist ble skylt tre ganger i totalt 300 ml sjøvann.

Resultat og diskusjon

Det var vanskelig å skille eggeskall, uklekte egg og nyklekte larver etter klekking. Det var store mengder klekte larver, dataene er derfor bestemt ut fra telling av en fraksjon av klekte larver. Dataene er derfor ikke gode nok til statistisk behandling, men gir en klar indikasjon på effekten av de ulike behandlingene. Behandling 3 og 4 (uten rognvæske) ga 100 % single egg mens det for behandling 2 var noen klumper. Eggene i kontrollgruppen var klebrige. Kontrollgruppen ga høyest andel klekt rogn (90 %). Bruk av leire til rogn med rognvæske ga svært dårlig klekkesresultat (8 %). Når leiren ble silt fra før tilsetning av tørr leire gav relativ høy klekkeprosent (78 %). Siling av rognvæske pluss skyling av rogn med en fysiologisk løsning (Aquacoat) ga også kraftig økning i klekkeprosenten (73 %).



Figur 12 Klekkeprosent. Behandling 1=kontroll uten leire, 2=rogn med rognvæske tilsatt leire, 3=rogn uten rognvæske tilsatt leire, 4=rogn uten rognvæske, vasket med Aquacoat og tilsatt leire.

Metoden er tidkrevende fordi det må røres i rogn i 20 minutter etter befruktning. I tillegg danner leiren klebrige «tråder» som bør fiskes ut i løpet av disse 20 minuttene. Det ser også ut til å være viktig med god skyling for å bli kvitt leirepartiklene.

Metoden må sies å være vellykket med hensyn til å hindre klebing av rogn, og gir muligheter for alternative inkuberingsmetoder hvor det vil være mulig å separere ut død rogn underveis i inkuberingsperioden, noe som ikke er mulig per i dag. Den gir også mulighet for mer effektiv desinfisering av rogn fordi desinfeksjonsvæsken lettere vil nå all rogn.

AP 3 Transport av rognkjeksrogn

AP 3.1 Sjøkking av rogn på ulike tidspunkt

Forsøket ble utført for å klarlegge i hvilke stadier av inkuberingsfasen rogn er mest/minst følsom for håndtering. Dette er viktig informasjon i forbindelse med transport av befruktet rogn, og annen håndtering av rogn. Forsøksdesignet ble valgt ut fra tilsvarende forsøk med kveiterogn utført ved

Nofima. Fordi rognkjeksrogn er langt mer robust enn kveiteroggn ble det valgt å gi denne rogn en kraftigere sjokkbehandling.

Rogn ble gitt et standardisert mekanisk sjokk en dag etter befruktning, og deretter hver tredje dag til og med dag 29 etter befruktning, og med (3) tre gjentak per behandlingsdag.

Forsøket ble gjennomført med rogn fra villfisk fanget ved Ekkilsøy, Møre og Romsdal. Ubefruktet rogn og hannlige gonader som var tatt ut kirurgisk ble transportert til Nofima, Sunndalsøra (2 timer transport). Rogn fra 10 hunner ble befruktet med melke fra to hanner. 160 ml rogn ble fordelt i hver av 26 perforerte bokser. Boksene ble plassert i en plastboks før de ble befruktet med ca 200 ml sjøvann tilsatt melke, dvs. våtbefruktning. Deretter ble rogn skyllet tre ganger med filtrert og UV-behandlet sjøvann før boksene ble plassert i inkubatorrom med separate inn- og utløp (Figur 5). Prøver til beregning av befruktningsprosent ble tatt ut før skylling av rogn. 1 ml rogn ble inkubert i petriskåler med 20 ml 0,2µm filtrert sjøvann. Befrukningsprosenten ble beregnet til 70 %. Filtrert (1 µm) og UV-behandlet råvann med gjennomsnittstemperatur 9.1°C (min 8,2°C, max. 11.2°C) ble benyttet til inkubering av rogn.

Dagen etter befruktning ble rogn i tre bakker utsatt for et standardisert mekanisk sjokk. Rogn i tre nye bakker ble utsatt for samme behandling hver fjerde dag fram mot klekking, med siste sjokking 29 dager etter befruktning. Det mekaniske sjokket ble utført ved at de perforerte boksene med rogn ble tatt ut av inkubatoren, og fikk falle fritt tre ganger fra 60 cm høyde ned på en bordplate (Figur 13). Etter sjokking ble boksen med rogn lagt tilbake i inkubatoren hvor den sto fram til klekkingen var fullført. Etter klekking ble klekkede larver skilt fra eggeskall, og antall klekkede larver ble beregnet ut fra vekt.

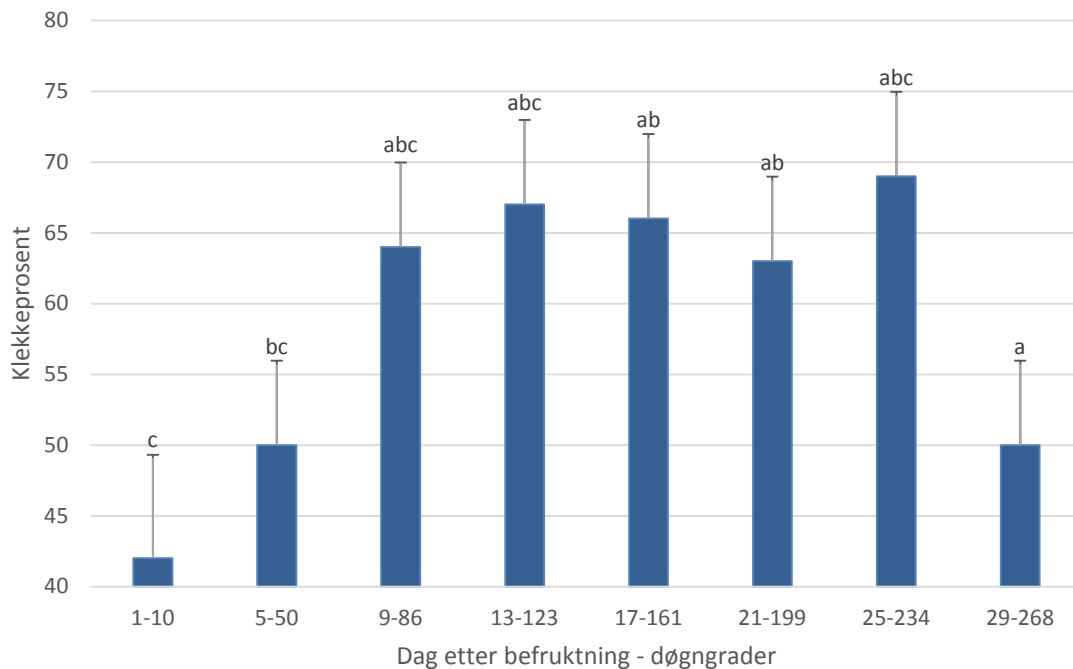


Figur 13 Sjokking av rogn. Bokser med rogn ble sluppet tre ganger fra standardisert høyde (60 cm) ned på benkeplaten på ulike tidspunkt etter befruktning.

Resultater og diskusjon

Det ble funnet en sterkt tendens til at toleransen for håndtering økte fra dag 1 etter befruktning (e.b.) fram til dag 25 e.b., mens klekkeprosenten ble redusert til 50 % når rogn ble sjokket så sent som dag 29 e.b., dvs. 270 d° e.b. (Figur 14). Rogn som ble sjokket 29 dager e.b. begynte å klekke ca en time etter sjokking mens rogn i de andre behandlingene ikke klekket før 2-3 dager senere, det vil si på forventet tidspunkt ved ca 300 døgngader. Fordi variasjonen mellom gjentakene for hver behandling var stor, noe som krever flere enn to gjentak per behandling, ble det ikke påvist statistisk sikre

forskjeller mellom de ulike behandlingstidspunktene. Ved de to første tidspunktene var klekkeprosenten henholdsvis 40 og 50 %. Fra ca 90 d° til 235 d° var det liten forskjell i klekkeprosent, 64-69 %. Ved det siste uttaket var klekkeprosenten redusert til 50 %.



Figur 14 Klekkeprosent med standardfeil for rogn som er sjokket på ulike tidspunkt etter befruktning. Tre gjentak per behandlingsdag. Standardfeil og signifikansnivå er vist på søylene. $P < 0,005$.

Resultatene viser at rogn er mest følsom for håndtering i første fase etter befruktning, det vil si i den perioden hvor ulike organer dannes. Deretter tåler rognkjeksrogn håndtering godt fram mot klekking. Som for andre arter som torsk og kveite forårsaket sjokking nær forventet klekking at rogn begynte å klekke tidligere enn forventet, og at klekkesresultatet ble redusert.

Resultatene viser at rogn må behandles med forsiktighet de første 10 dagene, eller til ca 65 d° e.b., og at den ikke bør håndteres de siste dagene før klekking. Dette er viktig informasjon i forbindelse med transport av befruktet rogn.

AP 3.2. Transport på ulik alder etter befruktning

Til nå er det mest vanlig å transportere ubefruktet rogn og melke fra villfanget fisk fram til ulike klekkerier. Dette kan gi lange transporter, og har gitt varierende klekkesresultater. Det er naturlig å anta at en også for rognkjeks vil komme over på transport av befruktet rogn på samme måte som for laksefisk. Tilgang på oksygen til eggene kan være en utfordring fordi rogna klister seg sammen når den er? i sjøvann, dvs. ved/etter? befruktning. Transport i vann fører også til høyere vekt på transportkassene. I dette forsøket har vi derfor transportert rognkjeksrogn på samme måte som lakserogn, men har benyttet våt sjøis til kjøling i stedet for våt is produsert fra ferskvann.

I forsøket har vi simulert en 6 timer lang transport, og transportene er gjort på ulike tidspunkt etter befruktning (e.b.), det vil si fra dag 1 til dag 22 e.b.

Rogn ble strøket hos Skjærneset Fisk, Ekkilsøy. Gonader fra hanfisk ble tatt ut kirurgisk, kvernet, silt og fortynnet på samme sted. Ubefruktet rogn og fortynnet melke ble transportert på is til Nofima, Sunndalsøra, dvs. 15 mil og to timer transporttid.

Rogn fra 8 hunner ble befruktet med melke fra 3 hanner som beskrevet under 3.1, og deretter overført til 24 separate inkubatorrom i en klekkerigg hvor de sto fram til klekking (Figur 5). Befruktningsprosenten ble beregnet til 75 %.

På ulike tidspunkt ble rogn fra tre inkubatorer (gjentak) tatt ut fra klekkeriggen, og pakket tørt i rognkasser (Figur 14). En temperaturlogger ble plassert ved siden av rognen for å følge utviklingen på temperaturen i løpet av den seks timer lange simulerte transporten. I øverste skuff ble det lagt våt sjøis som sørget for å holde temperaturen lav, samt at rognen ble overrislet med smeltevann under transportperioden. Etter pakking ble kassen forseglet med tape som ved vanlig rogntransport. Transporten ble simulert ved at rognkassen ble «kakket» mot en benk 10 ganger ved start og slutt transport, mens den i den 6 times simulerte transportperioden mellom disse to tidspunktene ble plassert på et røreapparat som sørget for bevegelse. Temperaturen under den simulerte transporten sank relativt raskt fra 8°C til 5-6°C, og holdt seg relativt stabil under hele transportperioden (Figur 16).



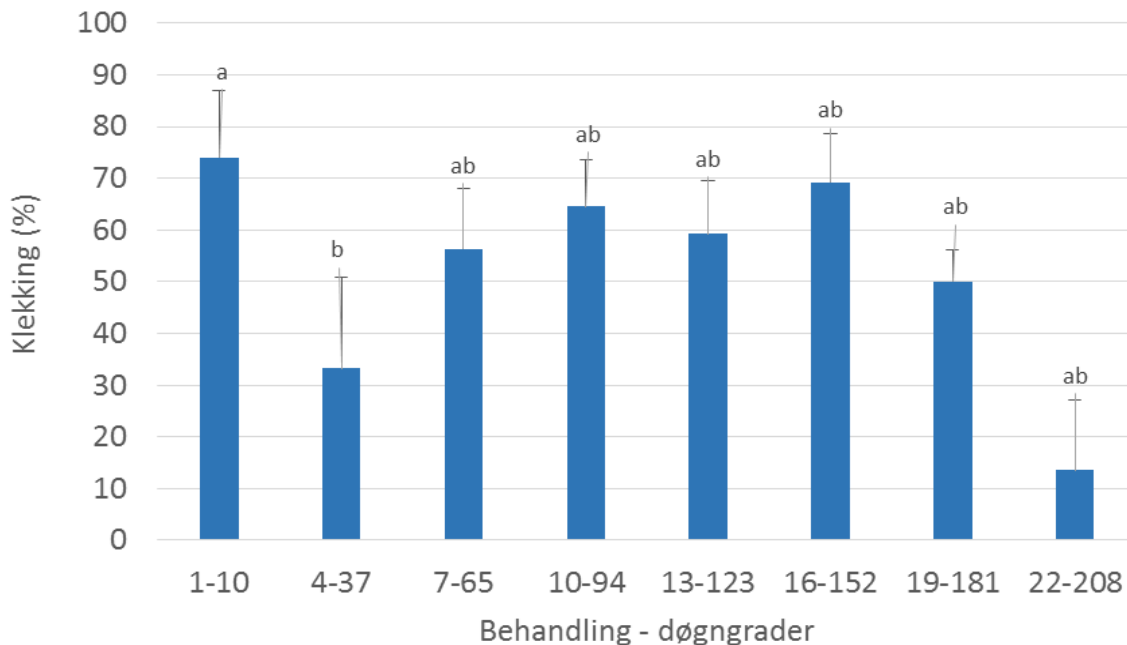
Figur 15 Rogn i rognskuff (a), rognkasse med våt sjøis i toppskuff (b), og rognkasse på risteapparat (c).

Når rognen i alle inkubatorene var klekket ble det tatt individvekt av 100 larver. Denne ble benyttet til å beregne antall klekte larver ved at klekkede larver fra hver inkubator ble veid som bulkvekt. Bulkvekten ble deretter dividert med gjennomsnittlig individvekt. Klekkeprosent ble beregnet ut fra at antall rogn inn i hver celle (200 ml) tilsvarer ca 16 000 rognkorn.

Resultat og diskusjon

Gjennomsnittlig klekkeprosent varierte fra 33 til 74 % (Figur 16). Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i klekkeprosent mellom behandlinger, mest trolig grunnet stor variasjon mellom gjentak innen behandling. Dette betyr at kun store sanne forskjeller mellom behandlinger ville resultere i signifikante forskjeller. Det var likevel en klar trend som viser at rognen er robust før celledelingen starter. Deretter følger den mest sensitive perioden fram mot dag 10. Deretter var det relativt god klekking i perioden 10-16 dager. Rognen var mer følsom for håndtering når den nærmet seg klekking.

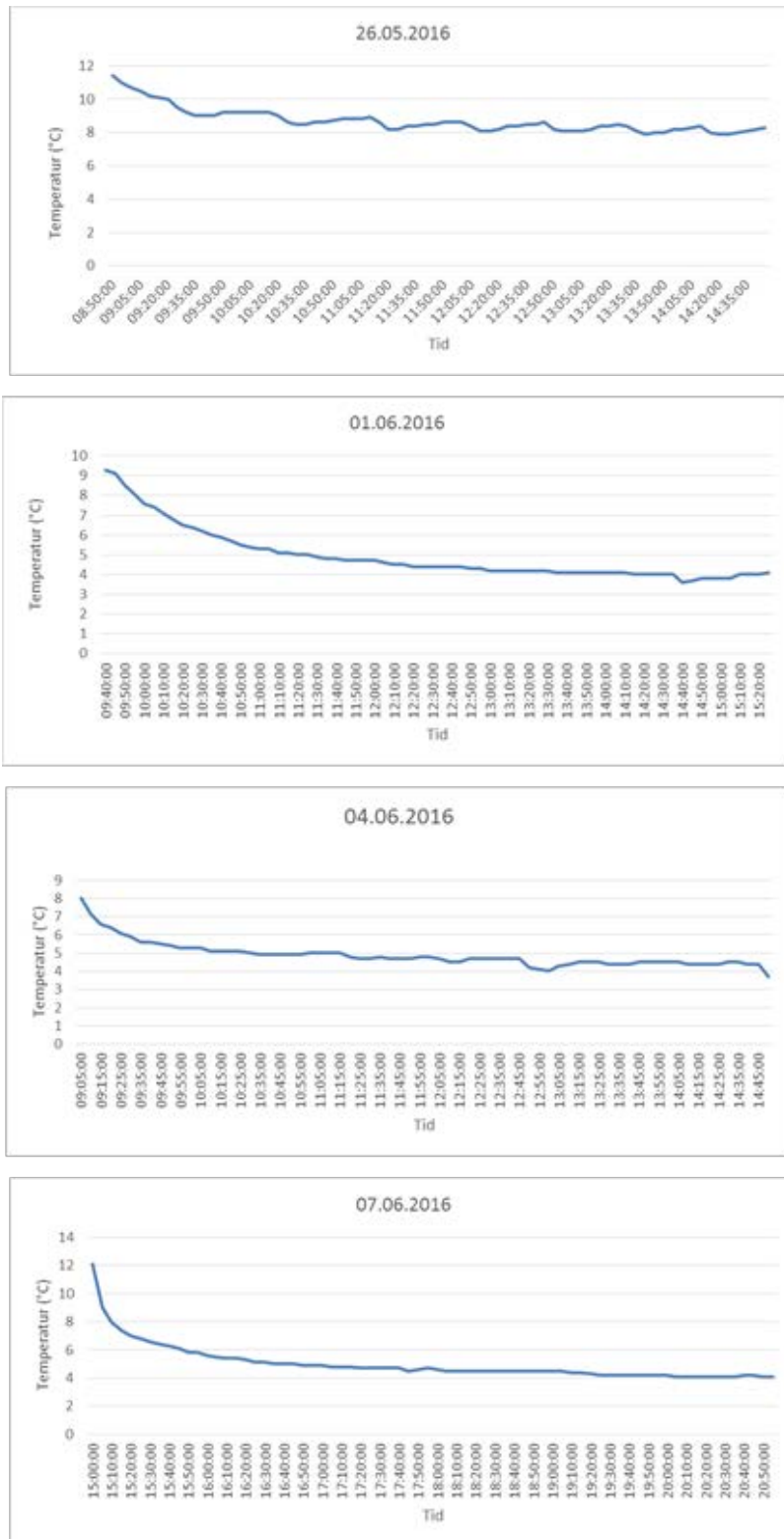
Resultatene viser også at rogn som er transportert tørt, dvs. med overrissing fra våt sjøis har god klekking (74 %) etter 6 timers transport. Temperaturen i den første transporten stabiliserte seg på ca 8 °C. Mengde is ble derfor økt i de påfølgende transportene for å stabilisere temperaturen på 4-5 °C (Figur 17).



Figur 16 Klekkeprosent med standardfeil for rogn som ble gitt en simulert 6-timers transport ved ulike tidspunkt etter befruktning. Tre gjentak per behandlingsdag. Standardfeil og signifikansnivå er vist på søylene. $P < 0,005$.

Resultatene i dette forsøket stemmer godt overens med erfaringer fra andre arter som laks, torsk og kveite. Det er også god overensstemmelse med resultatene i forsøket i AP 3.1 med sjokking av rogn, med unntak av første behandling. I AP 3.1 fant vi en redusert klekking ved sjokking på dag 1 e.b., mens en i transportforsøket fikk god klekking (74 %) når rogn ble transportert på samme tidspunkt. Dette kan ha sammenheng med at rogn i AP 3.1 ble utsatt for en kraftigere behandling enn i transportforsøket.

I løpet av forsøksperioden oppsto det problemer med vannbehandlingen til avdelingen, noe som medførte at en ikke fikk økt vannstrømmen til ønsket nivå. Dette kan ha bidratt til den store variasjonen i klekkeprosent mellom gjentak innen hver behandling.



Figur 17 Temperaturkurver for fire av rogntransportene. Etter den første transporten ble mengde is økt for å stabilisere temperaturen på 4-5 °C.

4 Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjoner

Høsting av gonader

Arbeidet i prosjektet har foregått i nært samarbeid med næringen, og da spesielt Skjærneset Fisk, Averøy som har levert all rogn. Samme firma leverer rogn til store deler av rognkjeksneringen, og leverer også rogn som blir eksportert til Irland og Storbritannia som stiller strenge hygienekrav. Prosjektet har også hatt et nært samarbeid med Patogen som har gjennomført alle PCR-analysene, og analyserer mye av melken og rogn som benyttes i rognkjeksproduksjonen. De har deltatt i flere uttak, og har vært behjelpelige med råd og informasjon underveis i prosjektperioden.

Underveis i prosjektperioden har metoden for uttak av rogn og melke blitt raffinert. Siden det ikke ble funnet store forskjeller i bakteriemengde i rogn og melke mellom kirurgisk uttak av rogn og standard stryking, er den siste metoden fortsatt i bruk, men med visse modifikasjoner:

Tidligere ble villfanget stamfisk ofte holdt på land i 2-3 uker før stryking. Hos Skjærneset Fisk holdes fisken kun i noen dager. Dette bl.a. fordi en i prosjektet har vist en stigning i bakterietall i melke hos hanfisk som har stått lenge på land (3 uker). Hunfisken bløgges før stryking, og den pakkes inn i engangs liggeunderlag. Det kuttet en åpning i gattet som sprayes med 70 % sprit før stryking av rogn. Det benyttes engangs litermål for oppsamling av rogn. Avhengig av ønske fra kundene tas det prøver til PRC-analyse av rogn/rognvæske. Rogn kan ikke oppbevares lenge før befruktning. Derfor legges rogngruppene hos mange produsenter inn i separate inkubatorer, noe som gjør at grupper med påvisning av kjente patogener kan kasseres når analysesvarene er klare.

Hanfisk bedøves og bløgges på samme måte som hunnene, og legges også på engangs liggeunderlag. Deretter åpnes buken, og gonaden tas ut og overføres til engangs plastbegre. Gonadene moses og fortynnes med en fysiologisk løsning før de lagres i celledyrkingsflasker på ristebrett i kjøleskap. Prøver fra melken kan da analyseres for kjente patogener i løpet av 2-4 dager. Melke med positive funn kasseres. Lagringsmetoden er basert på resultater fra FHF-prosjektet 1000997 Stamfiskhold rognkjeks.

Til tross for at det er tatt i bruk gode, og hygieniske metoder for uttak av gonader, må mye melke og rogn kasseres fordi ulike patogener forekommer hyppig hos rognkjeks. Dette vil være et problem så lenge villfisk benyttes til rognproduksjonen. Det bør derfor være et mål å komme raskt over på bruk av oppdrettet stamfisk. Metodene som nå er i bruk ved uttak og testing av rogn og melke vil kunne benyttes også ved bruk av oppdrettet stamfisk.

Håndtering og transport av rogn

Metoden for transport av ubefruktet rogn og melke er forbedret ved at det benyttes tilstrekkelig mengde is til å holde temperaturen relativt lav og stabil. Rogngruppene pakkes enkeltvis i plastposer tilsatt oksygen, noe som gjør at rogn får tilstrekkelig oksygen. Melken transporteres ferdig moset og fortynnet i celledyrkingsflasker tilsatt oksygen. Det er viktig at volumet per flaske er lite (20 % av totalvolum) slik at melken blir liggende i et tynt lag med stor overflate for å gi spermene god tilgang til oksygen. Tidligere ble gonadene transportert hele, noe som trolig medførte at det ble for dårlig oksygentilførsel til spermene i gonaden.

Desinfisering av rogn

Til nå har en transportert ubefruktet rogn og melke. Vi mener det vil bli vanlig med transport av øyerogn etter hvert som det etableres bestander av oppdrettet rognkjeks. Transport i vann gir ekstra vekt ved transport, og tilgang til oksygen er en utfordring for rogn som klistrer seg sammen. I prosjektet er det vist at befruktet rognkjeksrogn kan transporteres fuktig på samme måte som lakserogn, og at det er mulig å oppnå stabil temperatur under transport ved bruk av våt sjøis. Resultatene viser at rogn tåler håndtering/transport i perioden 10 - 16 dager etter befruktning, noe som bør være nyttig informasjon for videre utvikling av produksjonen.

Per i dag er det få som desinfiserer rognkjeksrogn til tross for at det ofte kan påvises kjente patogener både i rogn, rognvæske og melke. I prosjektet har vi undersøkt desinfisering av rogn under befruktning, like etter befruktning, og på øyerognstadiet. For laks er det standard rutine å desinfisere nybefruktet rogn, men de to desinfeksjonsmidlene som har vært testet i prosjektet, og/eller rutinene som har vært testet ser ikke ut til å gi ønsket resultat med hensyn til befruktning og klekkesresultat når rogn desinfiseres under eller like etter befruktning. Det bør derfor være aktuelt å teste andre aktuelle desinfeksjonsmidler og metoder.

Det er sterke indikasjoner på at desinfeksjon på øyerognstadiet gir positivt resultat på klekkesresultatet.

Det ble påvist *nucleospora* i rogn fra 1 av 29 hunner etter desinfeksjon, noe som kan indikere at denne blodparasitten er vanskelig å drepe ved standard desinfeksjon.

Mye av arbeidet i dette prosjektet ble utført med høstgytt rogn. Det har generelt vært en del problemer med kvaliteten på høstgytt rogn, noe som kan ha bidratt til at det var stor variasjon i resultatene mellom gjentak innen hver behandling. Dette gjorde det vanskelig å påvise statistisk sikre forskjeller i den del av forsøkene. Det er imidlertid sterke trender som stemmer god med resultater fra andre arter som laks, kveite og torsk. Vi mener likevel det er behov for videre arbeid med verifisering og videreutvikling før en går ut med anbefalinger, spesielt når det gjelder desinfisering av rogn.

5 Leveranser

- Lein, I., 2017. Kan vi hindre spredning av sykdomsagens frå villfanget stamfisk til avkom gjennom desinfisering av rogn og melke? Nofima faktaark, juni 2017.
- Lein, I., 2017. Hygienisk produksjon, desinfeksjon og transport av. Presentasjon på Rensefiskkonferansen. Trondheim, 7-9. februar 2017.
- Lein, I. 2017. Stryking, behandling og desinfeksjon av rognkjeksrogn. Presentasjon på NCE Aquaculture Workshop. Dønna, 25-26. januar 2017.
- Lein, I., 2016. Hygienisk produksjon, desinfeksjon og transport av rogn og melke fra rognkjeks. Presentasjon på Havbrukssamlingen (FHF). Bergen, 11-12. november 2016.
- Lein, I., 2016. Presentasjon av prosjektet på FHF dialogmøte i Bergen 1-2. juni 2016.

