

Fangst og levendelagring av snøkrabbe (*Chionoecetes opilio*)

Betydningen av ståtid og lagringstid på rømming, kvalitet og dyrevelferd

Sten Ivar Siikavuopio, Gunhild Seljehaug Johansson, Hanne Johnsen, Anette Hustad, Tina Thesslund, Stein Harris Olsen og Grete Lorentzen





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

Sunnalsøra:

Sjølsengvegen 22
NO-6600 Sunndalsøra

Alta:

Kunnskapsparken, Markedsgata 3
NO-9510 Alta

Felles kontaktinformasjon:

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

Foretaksnr.:

NO 989 278 835 MVA

Rapport

| | |
|---|---|
| <i>Tittel:</i> Fangst og levendelagring av snøkrabbe (<i>Chionoecetes opilio</i>) Betydningen av ståtid og lagringstid på rømming, kvalitet og dyrevelferd | ISBN: 978-82-8296-506-4 (pdf) ISSN 1890-579X |
| <i>Title:</i> Capture and live holding of snow crab (<i>Chionoecetes opilio</i>)- quality and animal welfare in relation to storage time | <i>Rapportnr.:</i> 34/2017 |
| <i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Sten Ivar Siikavuopio, Gunhild Seljehaug Johansson, Hanne Johnsen, Anette Hustad, Tina Thesslund, Stein Harris Olsen og Grete Lorentzen | <i>Tilgjengelighet:</i> Åpen |
| <i>Avdeling:</i> Produksjonsbiologi, Sjømatindustri | <i>Dato:</i> 20. desember 2017 |
| <i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF) | <i>Ant. sider og vedlegg:</i> 36 |
| <i>Stikkord:</i> Snøkrabbe, levendelagring, teine, kvalitet og velferd | <i>Oppdragsgivers ref.:</i> 901254 |
| <i>Sammendrag/anbefalinger:</i> Hovedmålet med dette prosjektet er å 1) fremskaffe ny kunnskap om hvordan lagringstid og temperaturbetingelser påvirker kvalitet og dyrevelferd hos snøkrabbe, 2) dokumentere om snøkrabben har mulighet til å rømme fra teine som brukes i dag under kommersielt snøkrabbefiske. Våre undersøkelser viser at snøkrabbe kan levendelagres i minst to måneder i temperaturområdet 1 °C til 5 °C uten fôring uten at det går utover muskelmengde eller gi dødelighet. Forsøkene viser at krabbene under sult henter næring fra oppsparte energireserver fra hepatopankreas, som er krabbens svar på fiskelever som energilager. Årsaken til at de klarer seg så lenge uten mat er et svært lavt stoffskifte og lav aktivitet som gir et lavt energibehov. Denne kunnskapen er viktig for norsk snøkrabbennæring for å sikre høyest mulig overlevelse, kvalitet og best mulig dyrevelferd under fangst, transport og levendelagring. Videre viser våre teineforsøk at snøkrabbene i liten grad har mulighet til å rømme fra teinene gitt at den har en skallbredde under 9 cm og veier mindre enn 300 g. Vi har også påvist at enkelte krabber er bærer av parasitten <i>Hematodinium</i> sp. <i>Hematodinium</i> , som hos snøkrabbe kan forårsake dødelighet og dårlig kjøttkvalitet. Vi har etablert en metode for dokumentasjon av parasitten. Vi har ingen grunn til å mistenke at <i>Hematodinium</i> -infeksjon er et stort problem i våre farvann per dags dato. | <i>Prosjektnr.:</i> 11656 |
| <i>English summary/recommendation:</i> The experiments show that adult male snow crab at commercial size can be kept without feeding for at least 2 months in temperatures from 1 °C to 5 °C. The experiments show that during starvation the crabs get the energy reserves from the hepatopankreas. The crab has a low metabolism and activity that requires low energy needs. Furthermore, our trap experiment shows that only crabs smaller than 300 g have possibility to escape from the trap. Knowledge generated in these experiments is important for the live holding of snow crab in order to ensure the highest possible survival, quality and the best possible animal welfare during capture, transport and live holding. For the first time, we have demonstrated that also snow crab from the Barents Sea has infections of <i>Hematodinium</i> sp. | |

Innhold

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Innledning..... | 1 |
| 2 | Materiale og metode..... | 3 |
| 2.1 | Forsøk I – Temperaturforsøk 1°C og 5°C | 3 |
| 2.2 | Forsøk II – Lagringstid og adferd | 3 |
| 2.2.1 | Evaluering av skader - Adferd..... | 4 |
| 2.3 | Forsøk III – Rømming fra teiner | 7 |
| 2.4 | Forsøk IV – Verifisering av mulig Hematodinium sp. | 8 |
| 2.4.1 | DNA isolering, PCR, kloning og sekvensering | 8 |
| 2.4.2 | Uttak og farging av hemolymfe | 9 |
| 3 | Resultater | 10 |
| 3.1 | Forsøk I | 10 |
| 3.2 | Forsøk II | 13 |
| 3.3 | Forsøk III | 16 |
| 3.4 | Forsøk IV | 18 |
| 4 | Diskusjon | 19 |
| 4.1 | Forsøk I | 19 |
| 4.2 | Forsøk II | 19 |
| 4.3 | Forsøk III | 20 |
| 4.4 | Forsøk IV | 22 |
| 5 | Oppsummering | 23 |
| 6 | Takk..... | 23 |
| 7 | Referanser | 24 |
| | Vedlegg | |

1 Innledning

Snøkrabbe (*Chionoecetes opilio*) ble første gang beskrevet av russiske forskere i Barentshavet ved Gåsebanken i 1996 (Kuzmin et al., 1999). Snøkrabbe finnes på mellom 20 og 500 meters dyp på bløt- og/eller sandholdig bunn innenfor et temperaturområde på $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ og $7\text{ }^{\circ}\text{C}$ i sitt naturlige utbredelsesområde (Hardy et al., 1994; 2000; Kuzmin et al., 1999). Snøkrabbe er en kuldekjær art og har siden oppdagelsen spredt seg til det meste av det nordlige Barentshavet, inkludert Svalbard (Pavlov og Sundet, 2011; Siikavuopio et al., 2017). Det er også gjort enkeltobservasjoner av arten langs Finnmarkskysten og ved Svalbard. Hannen utgjør den kommersielle delen av bestanden og kan bli opptil 1,5 kg og 15 år gammel. Krabben vokser relativt sakte, det tar 8-9 år fra klekking til krabben er stor nok til kommersielt fiske. Det finnes i dag ingen minstemål for snøkrabbefiske i norsk sone av Barentshavet. I 2015 var den norske fangsten av snøkrabbe på ca 9800 tonn, hvorav ca 20 % ble levert levende til anlegg på land, og de resterende 80 % ble prosessert ombord i båt. Dette bildet forandret seg i 2016, da Norge ikke tillot utenlandske båter å fiske snøkrabbe i norsk økonomisk sone i Barentshavet. Videre ble det i 2017 fastsatt kvote på 4000 tonn snøkrabbe i norsk økonomisk sone. Krabbene fanges ved bruk av kjegleformede teiner som egnes i hovedsak med akkar og sild og settes i lenke på flere hundre teiner på havbunnen. For de største snøkrabbebåtene er det vanlig å snu opptil 1500 teiner per dag. Normal ståtid på ei lenke med teiner er 1 uke.

På samme måte som for kongekrabbe har vi i Norge gode rammebetingelser for å eksportere høyt betalt levende snøkrabbe og dermed redusere eksport av et frossent, dårligere betalt produkt. På kongekrabbe er det de siste 20 årene bygget opp kompetanse på riktig håndtering av krabbe med tanke på sikre dyrene høy overlevelse fra fangst til marked (Lorentzen et al., 2017). Imidlertid finnes det i dag svært liten erfaring og dokumentert biologisk kunnskap på levendelagring av snøkrabbe. Innledende forsøk utført ved Nofima viser at snøkrabbene har en helt annen adferd og biologiske krav sammenlignet med kongekrabbe (Siikavuopio et al., 2016; 2017). Som eksempel kan det nevnes at snøkrabbe foretrekker lavere temperatur, lavere individtetthet og er mindre robust ved håndtering sammenlignet med kongekrabbe (Siikavuopio et al., 2016; 2017).

Snøkrabben er i ordenen tifotkreps og havner derfor inn under loven for dyrevelferd. Forskning på snøkrabbens biologi er viktig for best mulig tilpassing til kommersielt hold av disse dyrene.

Mangel på kunnskap kan føre til en uheldig praksis der man benytter regelverk utformet for levendelagring av for eksempel fisk som veiledende for lagring av krabbe. Det er flere grunner som tilsier at regelverket bør være artstilpasset, spesielt når det er snakk om arter som er vidt forskjellige med tanke på anatomiske, atferdsmessige og fysiologiske forutsetninger. Denne manglende kunnskapen skaper også utfordringer for krabbenæringen i fastsettelse av riktige rammebetingelser som sikrer høy dyrevelferd og kvalitet.

Prosjektet hadde som hovedmål å gi snøkrabbenæringen og myndighetene ny kunnskap om snøkrabbens biologiske respons på ståtid og lagringstid ved temperaturer innenfor krabbenes preferanseområde. Denne kunnskapen vil være av betydning for å sikre best mulig dyrevelferd under fangst og levendelagring. Det ble derfor satt opp fire forsøk for å få mer kunnskap om snøkrabbens respons på levendelagring; lagring uten føring ved 1°C og 5°C (forsøk I), så med og uten føring (forsøk II), deretter et forsøk for å avdekke adferd og rømmingsmuligheter under ståtid (forsøk III) og til slutt et forsøk for verifisering av *Hematodinium* sp hos Snøkrabber i Barentshavet (forsøk IV).

Den parasittiske dinoflagellaten *Hematodinium* sp, som forårsaker Bitter crab disease (BCD), er kjent for å forårsake sykdomsfremkallende endringer hos snøkrabber og kan være dødelig ved at lever, muskel, gjeller og hjerte påføres skader. I kraftig infiserte krabber er det også kjent at infeksjon av *Hematodinium* sp. kan bidra med bitter smak på kjøttet (derav navnet BCD). Parasitten har hovedsakelig krepsdyr som vert og det er ikke kjent at den kan smitte til fisk eller varmblodige dyr. Parasitten finnes naturlig hos snøkrabber i området den kommer fra. Parasitten har ikke vært påvist i Barentshavet. Da denne parasitten kan ha store negative biologiske og økonomiske konsekvenser, ønsket styringsgruppen at vi skulle se etter denne parasitten og komme opp med en enkel og sikker metode for å verifisere forekomst.

2 Materiale og metode

2.1 Forsøk I – Temperaturforsøk 1°C og 5°C

Snøkrabber (*C. opilio*) ble fanget inn ved bruk av tradisjonelle snøkrabbeteiner av båten MS Prowess (Ocean Venture AS) i området kjent som "Smuthullet" i Barentshavet i mars 2016. Kun hankrabber av kommersiell størrelse ble tatt ombord og disse ble fraktet levende til Havbruksstasjon i Tromsø. Krabbene ble plassert i et rundt kar på 6 m³ og forsynt med sjøvann på 4 °C for observasjon i en uke før forsøksoppstart. Ved forsøksstart ble 66 krabber individuelt målt og inspisert for skader, før de ble tilfeldig fordelt i 6 runde kar (500 l, 3 replikater). Forsøket startet opp den 15. mars 2016 og varte til 9. mai 2016 (8 uker). Hvert kar fikk tilførsel av sjøvann med salinitet over 34 ‰. Hvert kar fikk en vanntilførsel på 10 l⁻¹·min⁻¹·kg krabbe⁻¹ og justert til 1 °C og 5 °C; tre kar for hver temperatur. Krabbene ble holdt i kontinuerlig mørke (unntatt daglig inspeksjoner av en forskningstekniker iført hodelykt). Vanntemperatur ble logget og registrert hver dag. Oksygennivået ble målt ukentlig med Handy Delta logger (OxyGuard; OxyGard, International AS, Blokken, Danmark), og det var over 90 % metning gjennom hele eksperimentet i alle kar.

Som objektiv velferdsindikator ble laktatmålinger i blodet gjennomført på dag 0, 30 og 60. Det ble på ingen tidspunkt i forsøksperioden funnet forhøyet nivå av laktat i noen av gruppene. I tillegg til biokjemiske analyser av muskel og hepatopankreas ved dag 0, 30 og 60 ble det tatt hepatopankreas indeks (HI) og hepatopankreas-vev til histologisk analyse. HI er definert som: vekt på hepatopankreas/ rundvekt *100. Vev til histologisk analyse ble overført 10 % formalin (Chemi-Teknik AS, Oslo, Norway). Prøvene på 10 % formalin ble inkubert i 24 timer, fiksert i 70 % etanol, dehydrert etterfulgt av innstøping i parafinvoks. Histologiske snitt på 2,5 µm ble montert på objektglass og farget med Hematoksilin og Eosin (Merck). Vakuolearealet i hepatopankreas ble analysert med Nikon bildeanalyseprogramvare NIS-Elements Basic Research. Det ble etablert åtte «regions of interest» (ROIs) som ble plassert på representative områder (uten artefakter) i vevssnittet og vakuolearealet inni disse ROIene ble målt. Summen og gjennomsnittet av arealene ble deretter beregnet. Figur 5 viser antallet vakuoler delt på vakuolisert areal.

2.2 Forsøk II – Lagringstid og adferd

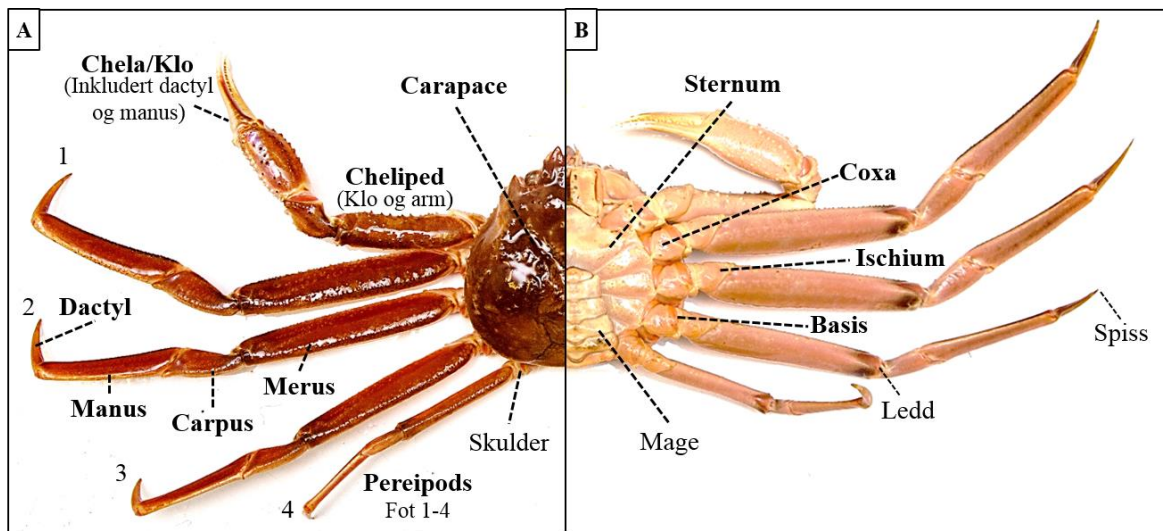
I forsøk II ble snøkrabbene fanget inn ved bruk av tradisjonelle snøkrabbeteiner av båten MS Northeastern (Br. Birkeland AS) i området kjent som "Smuthullet" i Barentshavet i januar 2017. Krabbene ble fraktet levende til Havbruksstasjon i Tromsø og plassert i et rundt kar på 6 m³ og forsynt med sjøvann på 4 °C for observasjon i en uke før forsøksoppstart. Ved forsøksstart ble 60 krabber individuelt merket, målt, inspisert for skader og fotografert, før de ble tilfeldig fordelt i 6 runde tanker (500 l, 3 replikater). Forsøket startet opp februar 2017 og varte til mai 2017 (100 dager). Hvert kar fikk tilførsel av sjøvann med en salinitet over 34 ‰. Hvert kar fikk en vanntilførsel på 10 l⁻¹ min⁻¹ kg krabbe⁻¹ og justert til 3 °C. Krabbene ble holdt ved 70 % lys, for fotografering eller filming av adferd i karene. Vanntemperatur ble registrert hver dag. Oksygennivået ble målt ukentlig og det var over 90 % metning gjennom hele eksperimentet i alle kar. Den ene gruppen av krabber ble tilbudt mat (rå akkar) to ganger i uka for å gi krabben vedlikeholdsføring. Krabbene i den andre gruppen ble ikke fôret i forsøksperioden. Vekt på krabbene ble registrert ved forsøksstart og -slutt. Videre ble hepatopankreas målt og veid på et utvalg på 6 dyr per temperaturgruppe, ved forsøkslutt. Hepatopankreasindeks (HI) er definert som: HI = vekt på hepatopankreas/rundvekt *100. Samtlige av krabbene ble registrert for

skade ved forsøksstart, etter 30, 60 og 100 dager. Krabbene ble fotografert og skadeutviklingen ble evaluert opp mot tid krabbene var lagret. Ved avslutning av forsøket ble fyllingsgraden målt i samtlige dyr fra begge gruppene.

2.2.1 Evaluering av skader - Adferd

Bilder av krabbens over- og underside ble tatt ved dag 0 og etter 30, 60 og 100 dager. For å evaluere skader, påført før og under forsøket, ble det utviklet et scoringssystem, tabell 1. Skader observert hos krabbene ved dag 0 ble brukt som grunnlag. Hver skade ble registrert til hvilket område på krabben skaden var lokalisert og en prosentsscore ble beregnet i forhold til antall uskadede områder. Figur 1 viser snøkrabbens anatomi. Den mest påfallende skaden var tap av føtter og ledd. Tap av føttens segmenter (merus, carpus, manus og dactyl) ble karakterisert som bentap (fot knekt av ved merus) eller leddtap (fot knekt av ved carpus, manus eller dactyl). Noen krabber hadde ledd som var delvis avrevet. Dette gav opphav til scoringssystemets gradering, tabell 1. Videre ble det observert en rekke skader i form av sorte riper, sprekker og hull i føttens skall. Figur 2 viser de ulike skadene observert i forsøket. I tillegg hadde flere krabber varierende antall sorte melaninprikker, særlig lokalisert i og rundt mageregionen. Disse flekkene ble ikke tatt med i scoringssystemet. Hver skade ble registrert med score og anatomisk plassering på krabben. Hver fot og klo, med sine segmenter, ble gitt egne nummer for enklere registrering i skjema. Se prosedyre «Scoring av skader hos Snøkrabber», vedlegg 2.

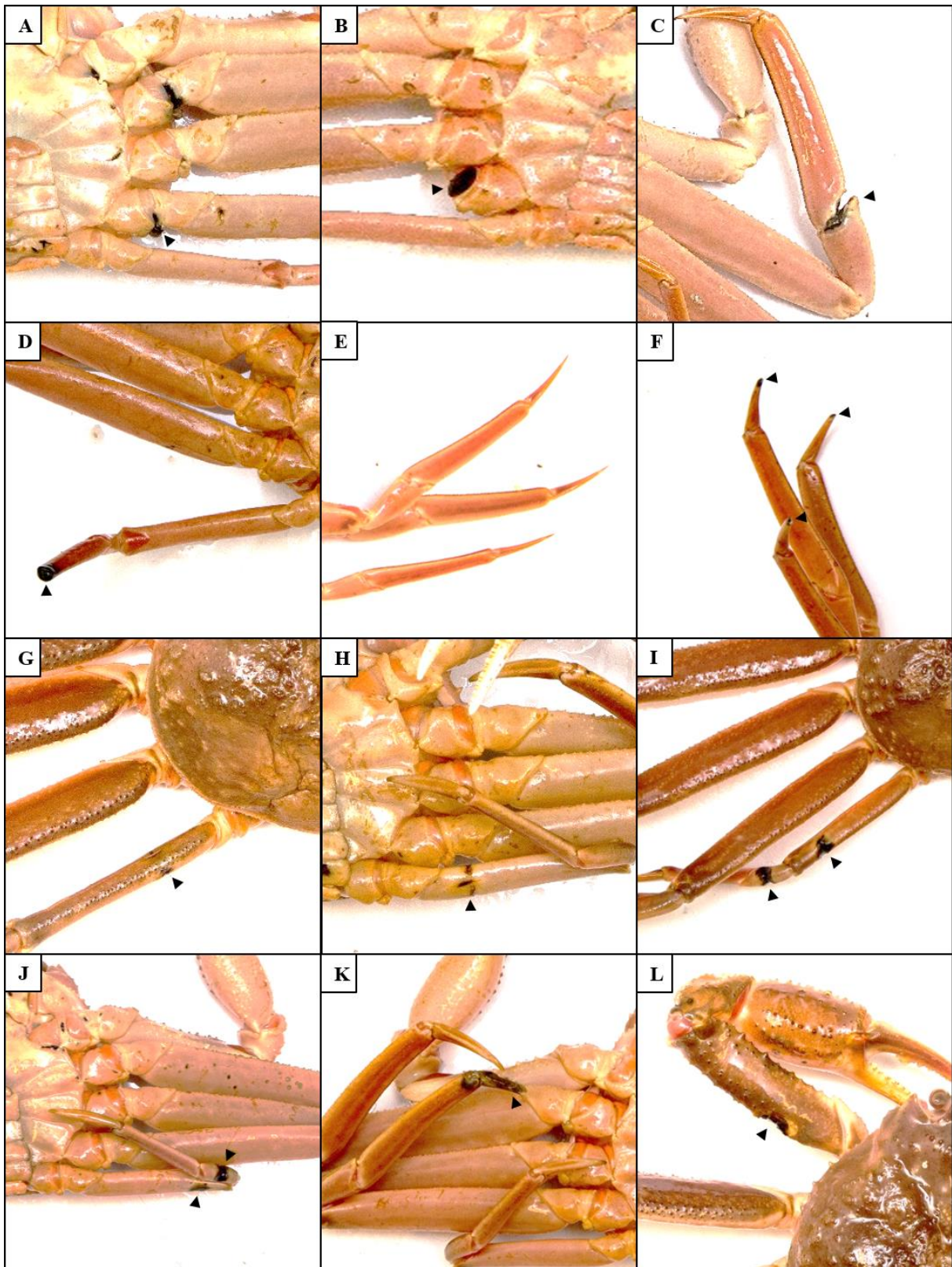
Små/ferske skader observert under fotografering, dag 0, var vanskelig å se på bildene. Disse skadene ble mer og mer tydelig utover i forsøket. Scoring av skader ble gjennomført etter endt forsøk. Da ble hvert individ scoret individuelt. På denne måten ble skader som var lite synlige ved dag 0, men som ble synlig ved dag 30, 60 eller 100, telt med som skade fra dag 0 og ikke som ny skade.



Figur 1 Snøkrabbens anatomi. (A) Krabben sett fra over. (B) Krabben sett fra undersiden

Tabell 1 Skjema for evaluering av skade hos snøkrabber

| Kriterium 1 - Tap av ben eller klo ved skulderledd | | |
|---|---|--|
| Score | Forandring | Utseende |
| 1 | Ingen | Alle ben og klør er intakte |
| 2 | Mild | Mulig påbegynt tap av ben eller klo |
| 3 | Distinkt | Ben eller klo halvveis av |
| 4 | Alvorlig | Komplett tap av ben eller klo |
| Kriterium 2 - Tap av tupp på ben eller klo | | |
| Score | Forandring | Utseende |
| 1 | Ingen | Tupp er intakt |
| 2 | Mild | Mulig påbegynt tap av tupp |
| 3 | Distinkt | Tupp halvveis av |
| 4 | Alvorlig | Komplett tap av tupp |
| Kriterium 3 - Tap av leddsegment på ben eller klo | | |
| Score | Forandring | Utseende |
| 1 | Ingen | Alle leddsegment er intakt |
| 2 | Mild | Mulig påbegynt tap av carpus, manus eller dactyl |
| 3 | Distinkt | Carpus, manus eller dactyl halvveis av |
| 4 | Alvorlig | Komplett tap av carpus, manus og eller dactyl |
| Kriterium 4 - Klipeskade og udefinerte skader | | |
| Antall | Klipeskade på klo eller ben. Sees som striper/sprekker transvers av benet | |
| Antall | Udefinerte skader. Sees som sprekker eller flekker | |



Figur 2 Skader observert hos snøkrabber fanget med krabbeteiner utenfor NEAFC-området (breddegrad 74,58 og lengdegrad 38,49). (A) Påbegynt tap av venstre ben nummer en og tre. (B) Tap av høyre ben nummer tre. (C) Skade i ledd, eventuelt påbegynt tap av ledd, mellom carpus og manus i venstre ben nummer en. (D) Tap av dactyl i høyre ben nummer fire. (E) Uskadde bentupper. (F) Tap av tupp på dactyl på tre ben. (G, H) Klipeskade rundt merus på venstre fot nummer fire. (I, J) Mulig klipeskade på merus og carpus på venstre fot nummer fire. (K) Udefinert skade på hele dactyl i høyre fot nummer tre. (L) Udefinert skade på venstre arm (merus)

2.3 Forsøk III – Rømming fra teiner

Som forsøksteiner ble det benyttet kommersielle teiner fra rederiet Br. Birkeland AS. Det ble plukket ut tre tilfeldige teiner fra båten Northeastern. Det ble kun benyttet hankrabber, som hadde en gjennomsnittsvikt på 624 g (\pm 37 S.D). Det ble tilsammen kjørt 8 rømmingsforsøk med ulike eksperimentelle betingelser som; teine med og uten agn-pose, ståtid og ulik helning på teinene og lang ståtid med agn på utsiden av teinene og ikke inni, for å stimulere til rømming (figur 3).

Dette for å se på ulike faktorer som kan påvirke mulig rømming av krabbe fra teiene. For registrering av adferd til krabbe i teinen og mulige rømmingsforsøk ble det satt opp et GoPro kamera. Det ble gjort daglige visuelle registreringer i tillegg til GoPro for å registrere detaljert rømmingsadferd. I de tilfellene hvor vi hadde krabbe på utsiden av teinene ble krabbene inni teinene merket med individmerker. Kun ved ett tilfelle ble det registrert at en ny krabbe gikk inn i teinen (forsøk I).



Figur 3 Forsøksoppsett med teiner som er plassert skrått på bunnen (18 °) og i normal posisjon

Tabell 2 Rømmingsforsøk under ulike eksperimentelle betingelser. Tabell 2 gir en oversikt over antall forsøk (n), behandling, antall dyr (n) og tid (døgn)

| Forsøk nr | Behandling | Antall (n) | Tid (døgn) |
|-----------|---|------------|------------|
| 1 | Uten agnpose | 40 | 3 |
| 2 | Uten agnpose/agn i kar | 60 | 10 |
| 3 | Med agnpose | 21 | 21 |
| 4 | Uten agnpose | 21 | 21 |
| 5 | 8 ° vinkel på teine | 19 | 13 |
| 6 | 18 ° vinkel på teine | 19 | 13 |
| 7 | 20 ° vinkel /agn i kar | 20 | 16 |
| 8 | Uten agn/agn utenfor teinen (tre teiner, a 30 krabber pr teine) | 90 | 45 |

2.4 Forsøk IV – Verifisering av mulig *Hematodinium* sp.

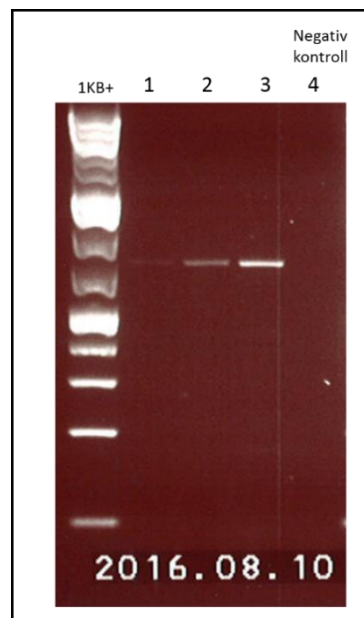
Ved avslutning av forsøket i Kårvika ble snøkrabbene (*C. opilio*) avlivet i tråd med regelverket. Det ble tatt ut prøver fra hepatopankreas, hjerte, gjeller og muskel som ble overført til RNA-later (Ambion) og 10 % formalin (Chemi-Teknik AS, Oslo, Norway). Prøvene på 10 % formalin ble inkubert i 24 timer, fiksert i 70 % etanol, dehydrert etterfulgt av innstøping i parafinvoks. Histologiske snitt på 2,5 µm ble montert på objektglass og farget med Hematoksilin og Eosin (Merck). Analyserte preparater ble sendt til Theodore R. Meyers (State Fish Pathologist, Alaska department of fish and game) for kvalitetssikring av eventuell påvisning av parasitt. For prøvene på RNA-later ble det etablert PCR assays med allerede publiserte primersekvenser (Jensen *et al.* 2010), primere er listet i tabell 3. Primerne amplifiserer parasittens 18S ribosomalt DNA. Det vil si at en vevsprøve som inneholder parasitten vil gi positivt utslag ved hjelp av PCR. For å med sikkerhet kunne si om en positiv PCR korresponderer til korrekt sekvens hos *Hematodinium* ble positive PCR produkter klonet og sekvensert.

Tabell 3 Primere bestilt for verifisering av mulig *Hematodinium* sp. infeksjon i snøkrabbe (*C. Opilio*)

| Primer pair | Sequence (5'–3') | Region amplified | Amplicon |
|--------------|------------------------|------------------|----------|
| Univ-F-15 | ctcccagtagtcatatgc | Partial 18S | 1682 |
| Hemat-R-1654 | ggctgccgtccgaattattcac | | |

2.4.1 DNA isolering, PCR, kloning og sekvensering

Det ble opparbeidet DNA fra hepatopankreas fra 30 snøkrabber ved hjelp av Dneasy Tissue Kit (Qiagen) etter produsentens anbefalinger. PCR ble utført ved hjelp av Taq PCR Core kit (Qiagen) etter produsentens anbefalinger med betingelsene publisert i Jensen *et al.* 2010. Alle PCR produkter har blitt verifisert ved hjelp av gelelektroforese som vist i Figur 4.



Figur 4 PCR analyse av 18S ribosomalt DNA fra *Hematodinium* sp., i hepatopankreas fra snøkrabbe angitt med tallene 1 til 3 i figuren. I rad fire er den negative kontrollen som inneholder vann i stedet for DNA

Seks av PCR reaksjonene gav et sterkt enkelt bånd som trolig tyder på at krabbene var infisert med *Hematodinium*. Disse seks PCR produktene ble videre klonet i en TOPO vektor ved hjelp av TOPO TA Cloning Kit for Sequencing, with One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen) etter produsentens protokoll. Reaksjonen ble platet ut på LB plater tilsatt ampicillin. Det var fin vekst på alle platene og det ble plukket enkeltkolonier og laget over-natt-kultur i LB medie tilsatt ampicillin. Plasmidet ble renset ved hjelp av PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Invitrogen) etter produsentens protokoll. Mengde og kvalitet på plasmidet ble målt ved hjelp av Nano Drop (tabell 4).

Tabell 4 NanoDrop rapport som viser mengden plasmid som ble sendt til Thermo Fisher for amplicon sekvensering

| Number | Sample | ThermoFisher ID | Amount sent | 260/280 |
|--------|--------|-------------------------------------|-------------|---------|
| 1 | # 1 | FJ844418.1 | 99 µg | 1.99 |
| 2 | # 2 | FJ844419.1 | 47 µg | 2.03 |
| 3 | # 3 | FJ844420.1 | 61 µg | 1.93 |
| 4 | # 13 | FJ844421.1 | 99 µg | 1.93 |
| 5 | # 24 | FJ844422.1 | 134 µg | 1.96 |
| 6 | # 27 | Hematodinium_18S_UnivF15_HematR1654 | 175 µg | 1.92 |

Renset plasmid (6 stk) ble sent til Thermo Fisher Scientific GENEART GmbH, Regensburg, Tyskland for amplicon sekvensering. Av de seks plasmidene var det kun nummer 1 og 2 som hadde delvis riktig sekvens. De fire siste plasmidene var «tomme» noe som mest sannsynlig skyldes tekniske årsaker.

2.4.2 Uttak og farging av hemolymfe

Krabbene ble løftet fra karet, plassert på rygg og ca 1 ml hemolymfe tatt fra innsiden av nest bakerste skulderledd. En liten dråpe hemolymfe ble strøket ut på objektglasset. Utstrykene lufttørket i omtrent 10 minutter før prøvene ble fiksert i 100 % metanol i 5 minutter. Fikserte hemolymfeutstryk ble farget med fargeløsninger og metode fra Diff Quik (Dade Behring Inc.). Prøvene ble dypet 1 sekund 5 ganger i Diff Quik fikseringsløsning, 5 ganger i fargeløsning I (Diff Quik I) og 3 ganger i fargeløsning II (Diff Quik II). Til slutt ble prøvene vasket i bad med destillert vann og lufttørket. Utstrykene ble mikroskopert ved 10 og 40 ganger forstørrelse. Det har blitt laget en brosjyre på norsk og engelsk som enkelt forklarer Diff Quick metoden og viser hvordan infeksjon med *Hematodinium* ser ut i mikroskopet, vedlegg 1.

3 Resultater

3.1 Forsøk I

Tabell 5 viser vekt (g) ved forsøksstart (T0), dødelighet (%) og hepatopankreas indeks (HI) (%) ved de ulike måletidspunktene hos de to temperaturgruppene. Standardavvik er angitt i parentes.

Som det fremgår av tabell 5 var det ingen dødelighet under forsøksperioden i noen av temperaturgruppene. Det ble heller ikke observert tap av gangbein i noen av gruppene.

Biokjemisk analyse av hepatopankreas og muskel (tabell 6) viser ingen signifikante forskjeller ved noe tidspunkt i forsøksperioden.

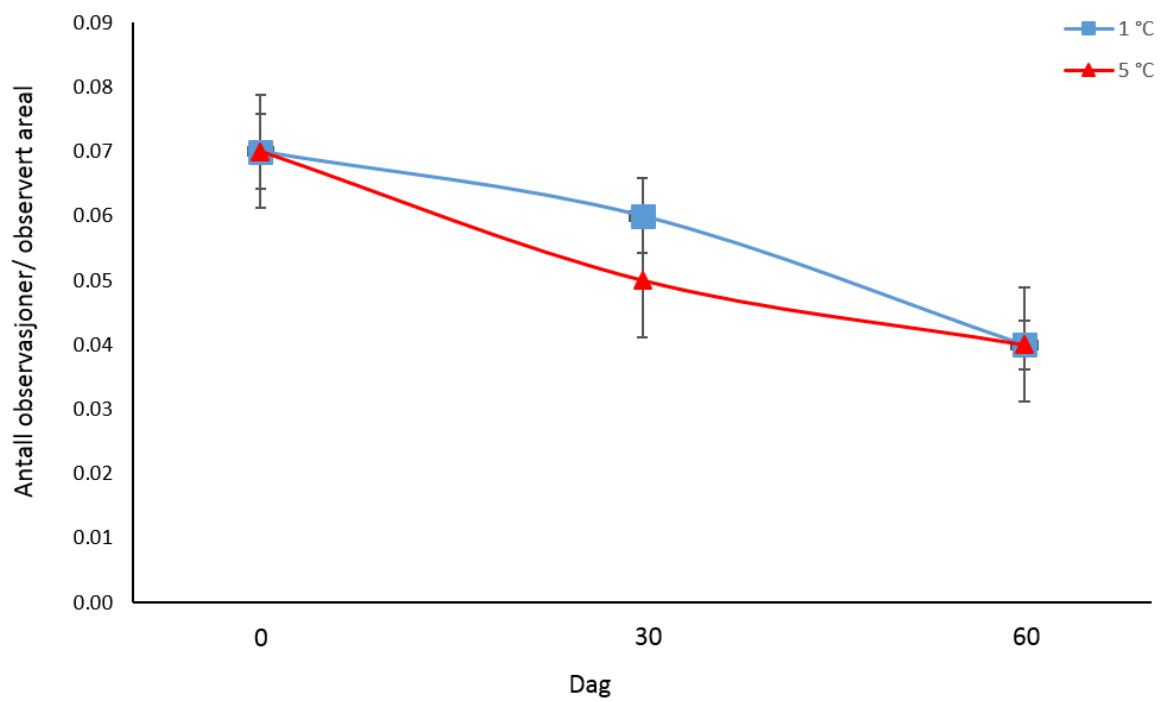
Figur 5 viser resultatene fra arealanalysene av hepatopankreas.

Tabell 5 Snittvekt (Standard avvik er angitt i parentes) ved forsøksstart, dødelighet og hepatopankreas indeks hos Snøkrabber

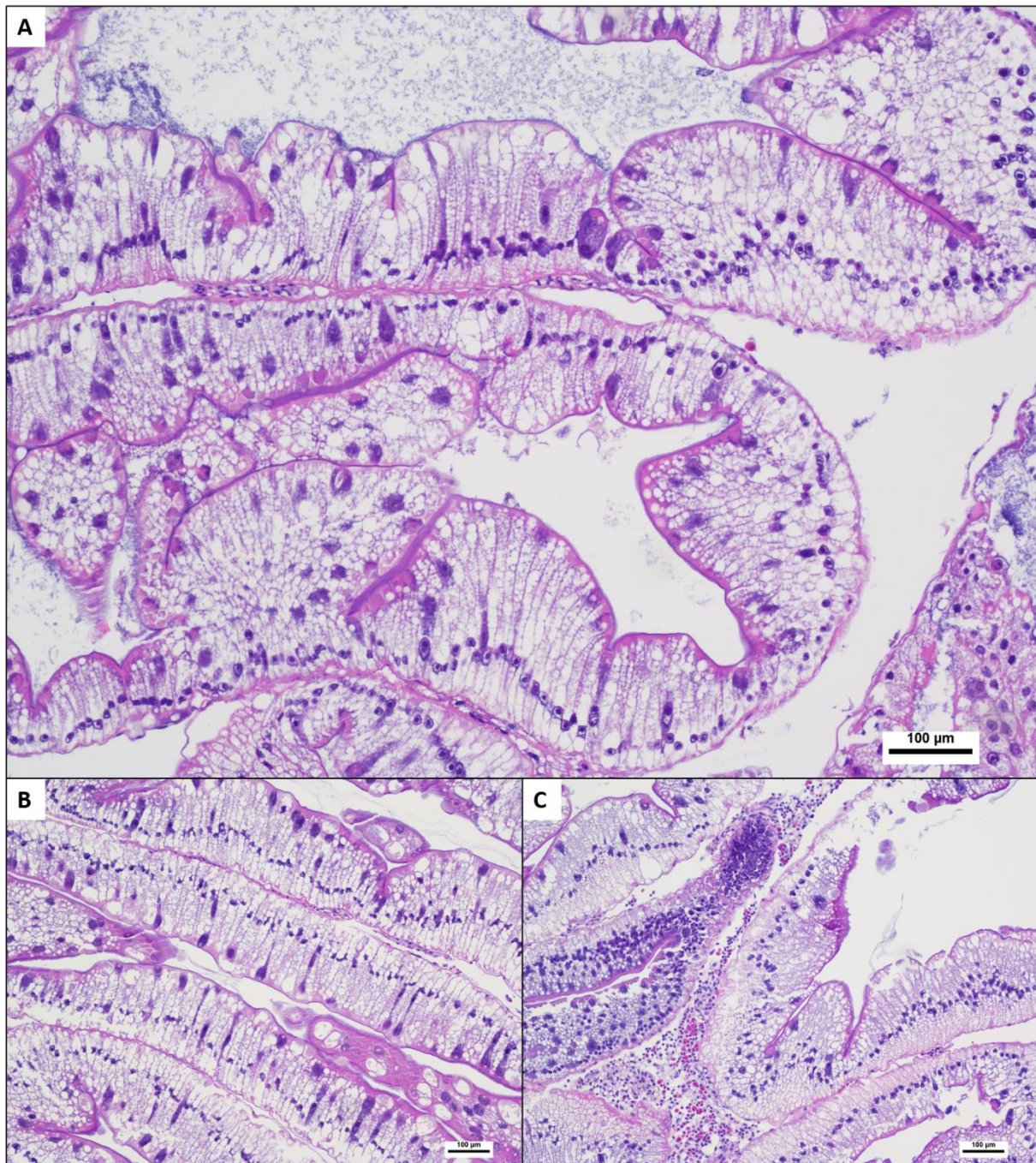
| Temperatur | Vekt (g) | Dødelighet (%) | HPI % 15/3 (S.D) | HPI % 11/4 (S.D) | HPI % 9/5 (S.D) |
|------------|--------------|----------------|------------------|------------------|-----------------|
| 1 °C | 747,1 (68,5) | 0 | 5,56 (1,03) | 5,10 (1,36) | 5,03 (0,41) |
| 5 °C | 738,6 (98,4) | 0 | 5,56 (1,03) | 5,42 (0,93) | 4,09 (0,97) |

Tabell 6 Biokjemisk analyse (i % av prøven) av hepatopankreas og muskel over tid ved 1°C og 5°C. Standard avvik er angitt i parentes

| | | Dag 0 | Dag 30 | | Dag 60 | |
|---------------------|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | | | 1 °C | 5 °C | 1 °C | 5 °C |
| Hepato- pankreas | Tørrstoff | 30,2 (6,3) | 40,3 (4,7) | 38,1 (6,0) | 42,3 (1,2) | 43,6 (7,5) |
| | Aske | 1,93 (0,06) | 1,65 (0,17) | 1,67 (0,19) | 1,55 (0,17) | 1,52 (0,56) |
| | Protein | 10,3 (1,9) | 10,0 (0,9) | 9,9 (0,5) | 10,1 (0,2) | 10,0 (0,5) |
| | Fett | 25,9 (4,6) | 26,3 (5,4) | 24,2 (6,4) | 28,8 (1,8) | 29,9 (5,0) |
| Muskel | Tørrstoff | 15,8 (3,3) | 17,3 (3,0) | 17,4 (2,3) | 16,7 (2,4) | 16,0 (2,3) |
| | Aske | 2,36 (0,35) | 2,17 (0,29) | 2,27 (0,29) | 2,20 (0,29) | 2,22 (0,17) |
| | Protein | 13,7 (2,9) | 14,7 (3,02) | 14,7 (2,3) | 14,3 (2,64) | 13,2 (1,6) |
| | Fett | 0,5 (0,0) | 0,5 (0,0) | 0,5 (0,0) | 0,5 (0,0) | 0,5 (0,0) |



Figur 5 Endring i vakuolisering i hepatopankreas fra snøkrabber holdt ved 1 °C og 5 °C ved dag 0, 30 og 60. Hvert punkt (n=5) viser gjennomsnittet \pm SEM



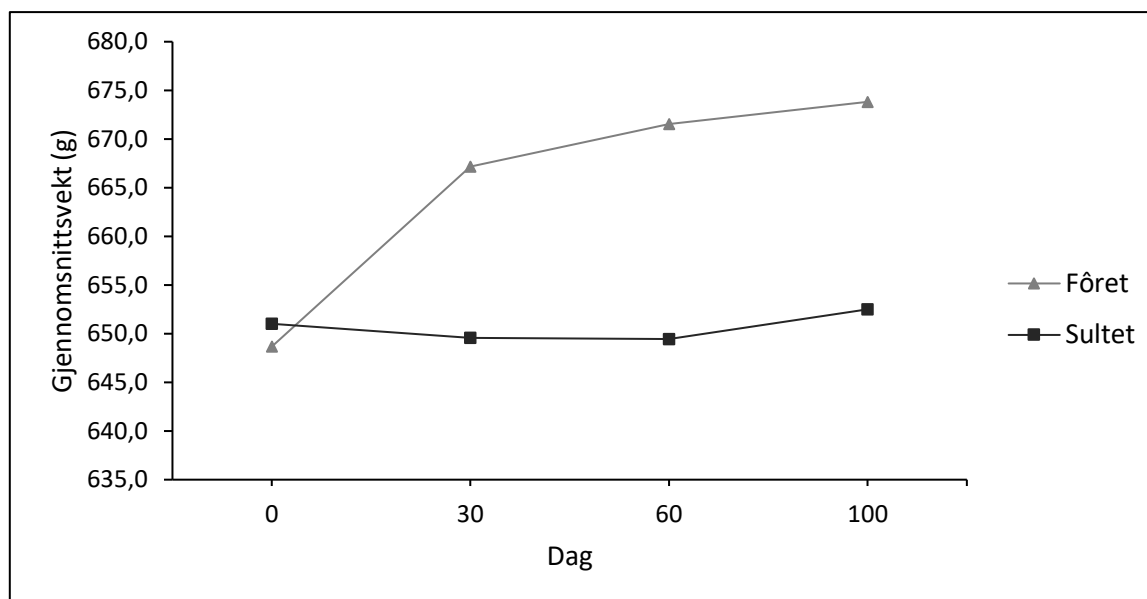
Figur 6 Vakuoleareal fra Snøkrabbe holdt ved 1 °C og 5 °C. Hepatopankreas ved forsøksstart (A) og etter 60 dager ved 1 °C (B) og 5 °C (C)

Forsøk I viste overraskende ingen tegn til negativ adferd. Videre var det ikke målbare biokjemiske forandringer i muskel eller innvoller etter 60 dager uten fôr hverken ved henholdsvis 1 °C og 5 °C. Under fangstbasert akvakultur, for eksempel med torsk, er det pålagt å tilby fisken fôr etter et gitt antall dager (etter 14 dager). Det ble derfor satt opp et nytt forsøk (forsøk II) med og uten vedlikeholdsfôring for å se på om de ulike regimer (fôr/ikke fôr) forbedret dyrenes trivsel.

Det ble observert en nedgang i vakuolisering av hepatopankreas i løpet av forsøksperioden. Dette vises tydelig i figur 5 som viser antallet vakuoler delt på vakuolisert areal. Man kan også se samme tendens i figur 6 som viser eksempler på snitt ved forsøksstart og etter 60 dager.

3.2 Forsøk II

Krabbene hadde en gjennomsnittsvekt på 650 g ved forsøksstart. Etter 100 dager i forsøk hadde fôrgruppen en gjennomsnittsvekt på 674 g, mens den ikke-fôrede gruppen holdt seg tilnærmet uendret i vekt, 653 g. Vektutviklingen i forsøksperiodene er vist i figur 7. Selv om gjennomsnittsvekten var høyere hos fôret gruppe var det ikke nok til å gi signifikante forskjeller i vekt mellom gruppene ved forsøkslutt. Ved forsøksstart var hepatopankreas indeksen (HI) på 6,1 (0,03). Ved forsøkslutt hadde HI gått ned til 4,6 (0,15) og 3,2 (0,05) hos henholdsvis fôret og ikke-fôret gruppe, tabell 10. Ikke-fôret (sultet) gruppe hadde en signifikant lavere HI en fôret gruppe ($P=0,001$).



Figur 7 Vektutvikling hos fôrede og ikke-fôrede snøkrabber gjennom en forsøksperiode på 100 dager

Det totale antallet registrerte skader, tabell 7, var lavt gjennom hele forsøket og det ble ikke registrert forskjell i skader hos de ikke-fôrede og fôrede gruppene. Ser vi videre på fordelingen av skader på de ulike segmentene av krabbenes lemmer, ser vi den anatomiske fordelingen av de ulike skadene, tabell 8.

Tabell 7 Totalt antall skader ved forsøksstart og ny påførte skader ved dag 30, 60 og 100

| Dag | 0 | 30 | 60 | 100 |
|------------|----|----|----|-----|
| Fôret | 83 | 0 | 5 | 4 |
| Ikke-fôret | 79 | 1 | 2 | 5 |

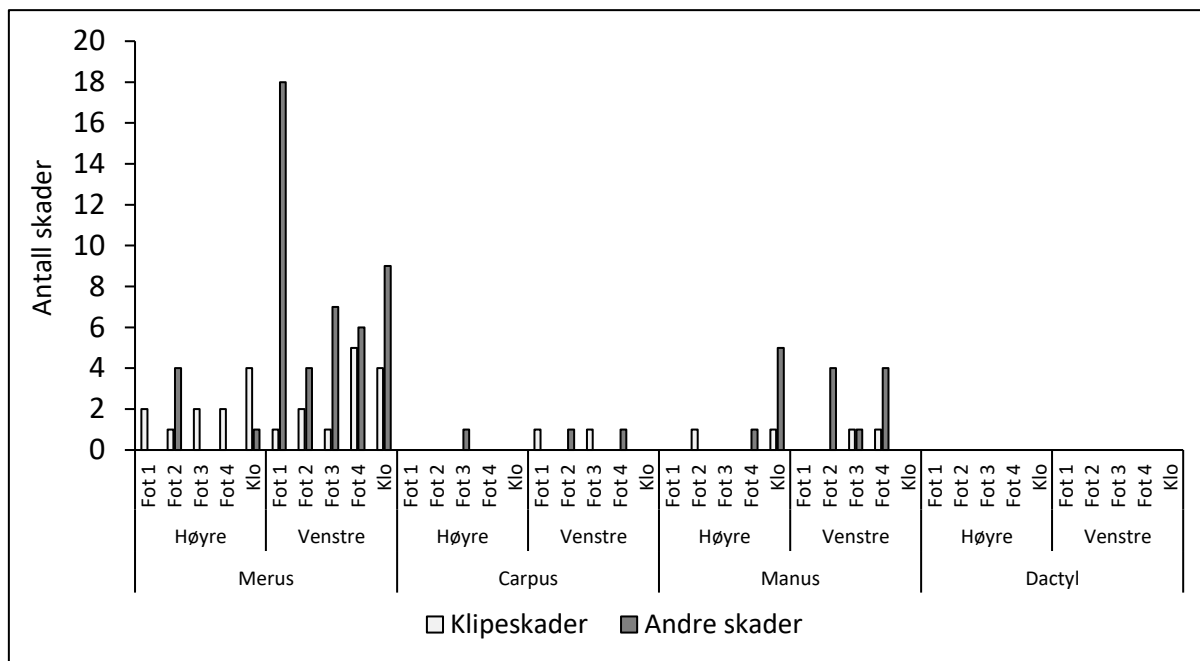
Evalueringen av krabbenes adferd i karene viste at begge fôrgruppene scoret høyt i de tre første kriteriene, med få fot-, ledd- og spisstap i løpet av forsøket. Fôrgruppen startet med 80 % av krabbene med alle klør og føtter intakte (ingen fottap), mens ikke-fôrgruppen startet med 70 % intakte krabber. Etter 100 dager hadde denne prosentandelen sunket med rundt 10 % for begge gruppene, tabell 8. Ett påbegynt fottap (score 2) var tilstede ved dag 0 og ved dag 60 var denne foten tapt (score 4).

Tabell 8 Resultater fra scoring av skade hos førede og ikke-førede snøkrabber. Oppgitt i prosent av antall krabber i gruppen ved de ulike tidspunktene og i antall skader (klippe- og udefinerte skader)

| Gruppe | Dag | Føret | | | | Ikke-føret | | | |
|----------------------|------------------|-------|------|------|------|------------|------|------|------|
| | | 0 | 30 | 60 | 100 | 0 | 30 | 60 | 100 |
| Tap av ben/klo | Ingen | 97,3 | 97,3 | 96,9 | 96,1 | 94,3 | 94,0 | 93,7 | 93,3 |
| | Mild | 1,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | Disinkt | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | Alvorlig | 1,7 | 0,0 | 0,3 | 0,7 | 3,7 | 0,3 | 0,3 | 0,3 |
| | Skadde individ | 20,0 | 0,0 | 3,4 | 7,1 | 30,0 | 3,3 | 3,3 | 3,3 |
| | Uskadde individ* | 80,0 | 80,0 | 75,9 | 67,9 | 70,0 | 66,7 | 63,3 | 60,0 |
| Tap av ben/klo tupp | Ingen | 94,3 | 94,3 | 93,4 | 93,2 | 96,0 | 96,0 | 96,0 | 95,3 |
| | Mild | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | Disinkt | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | Alvorlig | 5,7 | 0,0 | 0,7 | 0,0 | 4,0 | 0,0 | 0,0 | 0,7 |
| | Skadde individ | 23,3 | 0,0 | 6,9 | 0,0 | 20,0 | 0,0 | 0,0 | 3,3 |
| | Uskadde individ* | 76,7 | 76,7 | 69,0 | 67,9 | 80,0 | 80,0 | 80,0 | 76,7 |
| Tap av bensegementer | Ingen | 99,7 | 99,7 | 99,7 | 99,6 | 99,5 | 99,5 | 99,5 | 99,5 |
| | Mild | 0,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,4 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | Disinkt | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,1 |
| | Alvorlig | 0,1 | 0,0 | 0,1 | 0,0 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | Skadde individ | 10,0 | 0,0 | 3,4 | 0,0 | 23,3 | 0,0 | 0,0 | 3,3 |
| | Uskadde individ* | 90,0 | 90,0 | 86,2 | 85,7 | 76,7 | 76,7 | 76,7 | 73,3 |
| Klipeskader | Antall | 19 | 0 | 0 | 2 | 11 | 0 | 1 | 1 |
| | Skadde individ | 11 | 0 | 0 | 2 | 7 | 0 | 1 | 1 |
| | Uskadde individ | 19 | 19 | 18 | 15 | 23 | 23 | 22 | 21 |
| Udefinerte skader | Antall | 35 | 0 | 1 | 0 | 32 | 0 | 0 | 0 |
| | Skadde individ | 6 | 0 | 1 | 0 | 12 | 0 | 0 | 0 |
| | Uskadde individ | 24 | 24 | 22 | 21 | 18 | 18 | 18 | 18 |

* En krabbe døde i løpet av forsøket (dag 60), dette påvirker resultatene for dag 60

Resultatene fra scoringen ved nulltidspunktet viste en signifikant ($P < 0,05$) høyere andel klippe- og udefinerte skader i bensegmentet mer enn i de andre tre segmentene, figur 8.

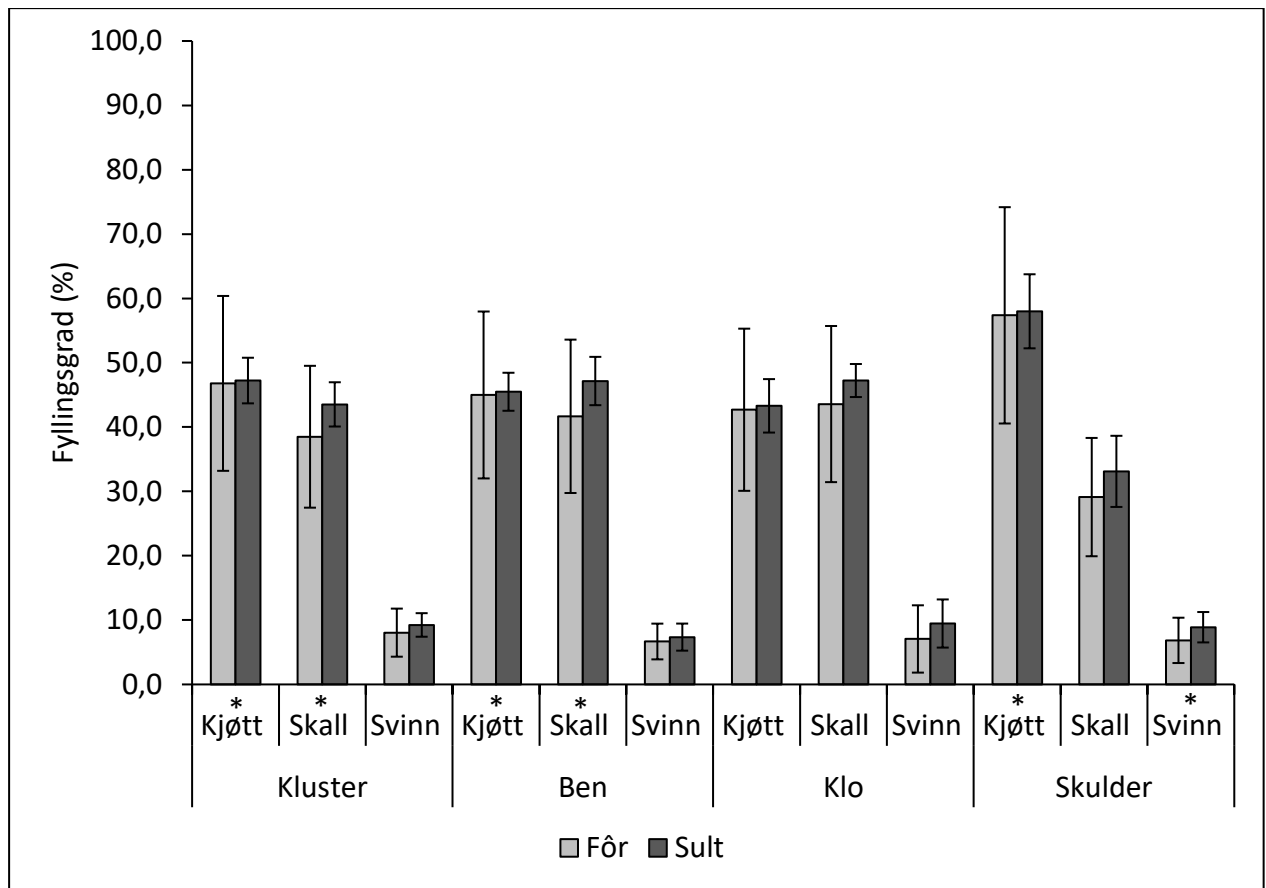


Figur 8 Fordeling av klipe- og udefinerte skader på Snøkrabber registrert ved dag 0

Fyllingsgraden, målt ved dag 100, er vist i tabell 9 og figur 9. Den prosentvise mengden kjøtt og skall i kluster var signifikant forskjellig mellom de to gruppene, $p = 0,01$ og $0,007$. Det samme ble observert for kjøttmengden (%) i føttene, $p=0,027$ og $p=0,006$. Skulderdelen av krabbene viste signifikant forskjell i prosentvis kjøttfylde, $P=0,000134$, og i svinn, $p=0,000012$.

Tabell 9 Fyllingsgrad (g) og HI (%) hos Snøkrabber etter 100 dager med og uten førtilgang. Standardavvik oppgitt som \pm

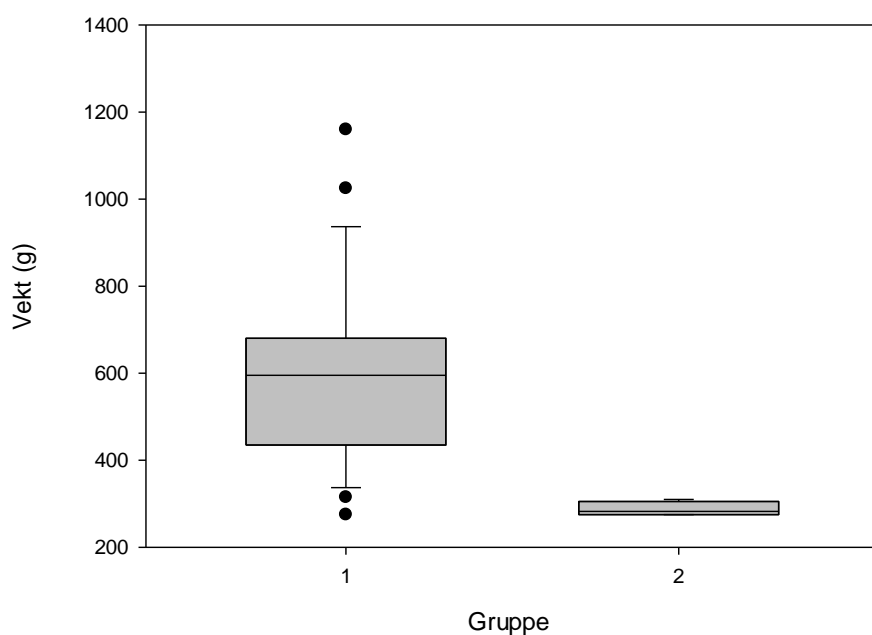
| | | Vekt (g) | Kjøtt (g) | Skall (g) | HI% |
|------------|---------|------------------|-----------------|-----------------|-----|
| Ikke-føret | Kluster | 161,6 \pm 58,6 | 76,5 \pm 29,7 | 69,6 \pm 23,7 | 3,2 |
| | Bein | 75,7 \pm 24,7 | 34,5 \pm 11,9 | 35,4 \pm 11,2 | |
| | Klo | 48,5 \pm 20,6 | 20,9 \pm 9,3 | 22,6 \pm 9,0 | |
| | Skulder | 36,0 \pm 15,0 | 21,1 \pm 9,7 | 11,6 \pm 4,2 | |
| Føret | Kluster | 162,7 \pm 71,0 | 81,1 \pm 35,9 | 66,7 \pm 28,0 | 4,6 |
| | Bein | 77,9 \pm 34,4 | 37,6 \pm 17,5 | 34,6 \pm 14,8 | |
| | Klo | 44,1 \pm 20,4 | 20,0 \pm 9,4 | 20,4 \pm 9,4 | |
| | Skulder | 38,0 \pm 15,6 | 23,5 \pm 10,6 | 11,6 \pm 4,6 | |



Figur 9 Fyllingsgrad hos snøkrabbe som har vært fôret eller ikke fôret i 100 dager. * indikerer signifikante forskjell mellom de to gruppene (fôr/sult)

3.3 Forsøk III

Det ble til sammen gjennomført 8 rømmingsforsøk fra teine. Tabell 10 oppsummerer våre funn. Det ble kun observert to vellykkede rømmingsforsøk hvor snøkrabbene klarte å komme seg ut av teinen. Det ene var i teine utstyrt med agnpose, hvor en krabbe klatret opp etter posen. I det andre tilfelle kom tre krabber seg ut av teinene etter 14 dager. Mellom dag 14 og dag 30 rømte ingen krabber. Mellom dag 30 og 45 rømte det ytterligere en krabbe. Nærmere ettersyn av de tre rømlingene viste at samtlige var små individer som mest sannsynlig presset seg ut gjennom maskene i teinen og ikke klatret ut. Disse var signifikant mindre enn de gjenværende i teinene ($P=0,003$) (figur 10).



Figur 10 Boksplott som viser vektfordeling til krabben i teina (1) og til rømte krabber (2)

I det siste forsøket var agnposen plassert utenfor teinene, for å lokke dem ut. Våre observasjoner viser at krabbene aktivt prøver å rømme, men slik teinen er utformet så klarer kun de minste krabbene (under 300 gram og under 9 cm skallbredde) å komme seg ut (tabell 10). Det ser ut til at hovedutfordringen er at de ikke klarer å passere den hvite plastkraven som omgir inngangspartiet på teinen. Selv om teinen står i skrå posisjon klarer de ikke å komme seg ut av den. Det ble ikke observert dødelighet, aggressiv adferd eller kannibalisme i forsøksperioden i noen av teinene med unntak av det siste langtidsforsøket hvor vi fant 1 død krabbe i teinen etter 45 dager. Disse resultatene samsvarer med forsøk I og II som viser at krabbene er robuste med tanke på levendelagring både i kar og teine.

Tabell 10 Rømmingsforsøkene med ulike eksperimentelle betingelser

| Tid (døgn) | Behandling | Dyr start (n) | Rømt (n) |
|------------|--|---------------|----------|
| 3 | Uten agnpose | 40 | 0 |
| 10 | Uten agnpose/agn i kar | 60 | 0 |
| 21 | Med agnpose | 21 | 1 |
| 21 | Uten agnpose | 21 | 0 |
| 13 | 8° skråning på teine | 19 | 0 |
| 13 | 18° skråning på teine | 19 | 0 |
| 16 | 20° skråning /agn i kar | 20 | 0 |
| 45 | 3 teiner uten agn/agn i kar (a 20 pr. teine) | 90 | 4 |

3.4 Forsøk IV

Det er etablert kontakt med eksperter på *Hematodinium* i USA. Det har i tillegg blitt etablert kontakt med CEFAS (European Union Reference Laboratory for Crustacean Diseases). Det vil fremover være viktig å fokusere på den generelle helsestatusen til krabbene, derfor vil et videre samarbeid med CEFAS være svært nyttig. Videre er det hentet inn eksperthjelp til å vurdere en rekke snitt. Ingen av krabbene vi har studert til nå bærer preg av stor infeksjon sett ved histologi. Det betyr imidlertid ikke at det er fravær av infeksjon. PCR-funn tyder på at noen krabber muligens var infisert av *Hematodinium* sp., men det var trolig for tidlig i infeksjonsforløpet til å detektere ved hjelp av histologi. Av 30 undersøkte krabber var det 6 som gav positivt PCR-produkt og som trolig var tidlig i infeksjonsforløpet. Sekvensering viste delvis overlapp med *Hematodinium* noe som styrker mistanken om at det var DNA fra parasitten *Hematodinium* som ble amplifisert ved PCR reaksjonen. Vi har ingen grunn til å mistenke at *Hematodinium*-infeksjon er et stort problem i våre farvann per dags dato. Vi har nå etablert en rekke verktøy som vil kunne brukes ved mistanke om BCD. Av de etablerte metodene vil spesielt farging av hemolymfe, beskrevet i vedlegg 1 og 2, være svært viktig. Metoden tillater screening av krabber uten å ta livet av den. Den er hurtig og er muligens noe lettere å tolke enn histologi og bør være førstevalget ved mistanke om infeksjon. Dernest bør det vurderes om det skal foretas histologi og PCR.

4 Diskusjon

4.1 Forsøk I

Vanntemperaturen er kjent for å være den dominerende miljøfaktor som styrer adferd, fysiologi og overlevelse av kaldtvannsarter som snøkrabbe (Hardy et al., 1994; 2000). I en tidligere studie fant vi klare resultat på at snøkrabbene er en ekstremt kuldekjær art og at temperaturer over 5 °C bør unngås ved levendelagring over tid (Siikavuopio et al., 2017). Det ble ikke observert dødelighet og våre resultater er i samsvar med tidligere funn (Siikavuopio et al., 2017). Innenfor en periode på 60 dager var det ingen målbare forskjeller mellom gruppene i de velferdsparameterne som ble målt. Det er en tendens til reduksjon i hepatopankreasindeksen over tid selv om den ikke var signifikant forskjellig. Videre påvirkes den biokjemiske sammensettingen i muskel og i HI svært lite under levende lagring. En utfordring med vårt datasett er stor variasjon mellom individene i biokjemisk sammensetting. Det ble tatt ut 5 prøver av henholdsvis muskel og HI ved hvert måletidspunkt som ser ut til å være for liten samplingsmengde for å fange opp mulige forskjeller. De histologiske prøvene viser klare signifikante forskjeller over tid, noe som viser at det skjer en rekke biokjemiske forandringer i HI som våre biokjemiske analyser ikke klarer å fange opp.

Uansett hvor stor variasjon, viser vårt forsøk at det er mulig å mellomlagre snøkrabbe ved både 1 °C og 5 °C opp til 60 dager, gitt at de holdes under betingelsene beskrevet i material og metode. Videre spares betydelige energikostnader ved å lagre dyrene ved 5 °C kontra 1 °C, noe som vil ha stor økonomisk betydning ved levendelagring av krabben.

4.2 Forsøk II

I forsøk II, hvor temperaturen ble holdt under 5 °C, var det bare ett individ som døde i løpet av forsøksperioden. Dette viser evnen snøkrabbe har til å overleve lenge uten tilgang på mat. Noen av skadene som ble registrert i forsøket var allerede påbegynte skader fra før forsøksstart og ikke et resultat av aggressiv adferd mellom krabbene. Evalueringen av adferd viste at begge fôrgruppene scoret høyt i de tre første kriteriene, med få fot-, ledd- og spisstep i løpet av forsøket. Mot slutten av forsøket ble det observert en liten økning i antall klipeskader i begge gruppene.

En av skadene registrert ved forsøksstart var så alvorlig at det førte til tap av gangbein, noe som er sett i tidligere forsøk (Siikavuopio *et al.*, 2016). Påbegynte fottap og senere fottap er muligens krabbens evne til å kvitte seg med skadede føtter (autotomi), som vist hos ullhåndskrabber (He et al., 2016), og ikke nødvendigvis et resultat av aggressiv adferd fra andre krabber. Det kan heller se ut til at snøkrabben er lite aggressiv av natur. Til motsetning til amerikansk hummer, som utviser aggressiv adferd ved hold i kar uten skjulested og ved store individforskjeller (Waddy *et al.*, 1995). De observerte skadene fra dag 0, er et mulig resultat av mekaniske skader ved håndtering under fangst eller fra livet i sjøen. I løpet av forsøket ble det kun registrert en ny udefinert skade. Dette kan tyde på at det var generelt god håndtering og dyrevelferd gjennom hele forsøket. Skader påført ved fangst har negativ innvirkning på dyrevelferd og økonomi. Videre forsøk på dette er viktig for å bedre velferden til dyrene ved fangst. Så langt, til forfatterens kjennskap, er det gjort lite forskning på biologiske effekter av skader, som klotap/av-kloing. Derimot er det gjort en rekke forsøk på effekten klofangst har på ville bestander av for eksempel steinkrabber og taskekrabber. Duermit et al., (2017) viste en lavere gjenfangst av steinkrabber, *Menippe* spp., etter klofangstfiske. Særlig gjaldt dette krabber med store

skader etter av-kloingen, som igjen gir økt dødelighet innen kort tid (Duermit et al. 2015) og kan også påvirke evnen til reproduksjon.

Hovedårsaken til at krabbene i forsøk II klarte seg så lenge uten mat ser ut til å skyldes det svært lave stoffskiftet som gir et lavt energibehov, og store energilager i hepatopankreas (Siikavuopio *et al* 2017). Den observerte forskjellen i HI, ved forsøkslutt, samsvarer med resultater fra fôr-sultforsøk gjennomført på ullhåndskrabbe, *Eriocheir sinensis* (Wen et al., 2006). Etter lengre tid med sulting, kontra fôring, vil HI være lavere hos krabber som har vært sultet. Hepatopankreas, nylig foreslått kalt perigastrisk organ, forgrener seg fra midttarmen og er hovedorganet for opptak og lagring av næringsstoffer, i hovedsak lipider. Organet er spesielt viktig ved sulting hvor lipidene blir en viktig energikilde, etterfulgt av protein fra muskulaturen. Dette samsvarer med våre funn hvor vi ser at Hepatopankreas-indeksen er signifikant lavere i gruppen som har sultet.

Videre ser vi også at den sultede gruppen etter 100 dager også har begynt å bryte ned muskel da muskelmassen hos den sultede gruppen er mindre enn hos den fôrede gruppen. For å holde på muskelmassen bør man vurdere vedlikeholdsføring etter 60 dager jamfør forsøk II.

4.3 Forsøk III

Det ble kun observert to vellykkede rømmingsforsøk hvor snøkrabbene klarte å komme seg ut av teinen. Det ene var i en teine utstyrt med agnpose, hvor en krabbe klatret opp etter posen. I det andre tilfellet kom tre krabber seg ut av teinene etter 14 dager. Samtlige av disse krabbene var små, og med stor sannsynlighet har de klart å presse seg gjennom maskene på teina. Vi observerte ingen dødelighet i noen av teinene i de 7 forsøkene som ble gjennomført (kun i det siste forsøket som varte i 45 dager), noe som tyder på lite stress eller lav negativ sosial adferd hos snøkrabbe når den står fanget i teinene. Det ble også gjort et pilotfeltforsøk av Nofima i november 2017 for å undersøke om krabbene forsvant fra teine under kommersielt fiske. Mest sannsynlig skyldes tap eller nedgang i fangst at predatorer som torsk, flekk- og blåsteinbit kommer seg inn i teinene og forsyner seg av fangst. Vi har sikre observasjoner på at dette kan skje, ved at det ble fanget flekksteinbit i teine under forsøksfiske etter snøkrabbe i november 2017. Ved disseksjon av flekksteinbit fra teinen ble det funnet snøkrabberester i magesekken, som er en indikasjon på predasjon i teine (pers. medd. Gustav Martinsen, Nofima).

På tokt i Smutthullet (76°22 N og 40°23 Ø) med torsketral i månedsskifte oktober/november 2017, ble ett sett med snøkrabbe-teiner tatt under tråling på 230 meters dyp. Settet med teiner manglet iler og blåser viste seg å være tapt, eller gjenglemte. Disse snøkrabbeteinene var norskproduserte (manglet bomullstråd som russiske fiskeredskaper har) og stammer trolig fra krabbefisket som foregikk i Smutthullet fram til sommeren 2015. Norge og Russland ble på et møte på Malta sommeren 2015, enige om at snøkrabbe skal forvaltes som en sedentær (bofast) art. Dette førte til at Russland fikk kontroll over det meste av kontinentalsokkelen i Smutthullet, mens Norge kun disponerer ca 15 % av det sørvestlige området i Smutthullet. Fra Norsk side, har det derfor ikke vært gjennomført noe fiske etter snøkrabbe så langt øst i Smutthullet siden 2015. Kun 10-12 teiner ble berget ombord, mens resten av teinene gikk tapt og forsvant mot bunnen. I de teinene som ble berget ombord, ble det samlet ca 120 kg levende krabber. I tillegg ble det registrert omtrent like mye død krabbe i teinene. Dette indikerer at tapte og gjenglemte teiner representerer et betydelig spøkelsesfiske etter snøkrabbe. Det vil si at de krabbene som dør fungerer som agn og fisker nye krabber. Spøkelsesfiske etter krabben vil i så måte vedvare så lenge teinen ikke er skadet på noen måte, eller blir tatt under fiske med bunntral

etter torsk og reker. Et enkelt tiltak for å unngå dette spøkelsesfisket er å innføre et påbud å sy inn bomullstråd i sidene på teine, som ved tap vil gå i oppløsning og krabbene slippes fri.

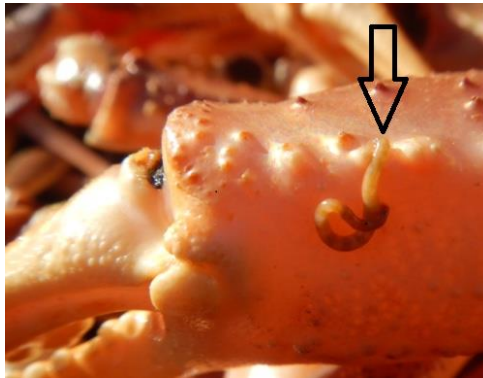


Ett sett med tapte krabbeteiner som har festet seg til trålgearet under torskefiske i Smutthullet.



4.4 Forsøk IV

Ingen av krabbene vi har studert til nå bærer preg av stor infeksjon av *Hematodinium* sp. sett ved histologi. Det betyr imidlertid ikke at det er fravær av infeksjon. PCR-funn tyder på at noen krabber muligens var infisert av *Hematodinium* sp., men det var trolig for tidlig i infeksjonsforløpet til å detektere ved hjelp av histologi. På grunn av at parasitten kan smitte direkte fra infisert krabbe til neste krabbe, bør man helst unngå å kaste restråstoff fra snøkrabbe over bord i rå og ubearbeidet tilstand. Det skal også nevnes at vi også har observert parasitten *Johanssonia arctica* (Hirudinea), sittende fast på snøkrabbe, illustrert i bildet under. Parasitten er kjent fra kongekrabbe i Barentshavet men ikke beskrevet funnet på snøkrabbe i Barentshavet. Det er viktig å fokusere på den generelle helsestatusen til snøkrabbe i Barentshavet og mulige konsekvenser for å være bedre rustet med tanke på forvaltning av denne verdifulle ressursen.



Bildet viser parasitten *Johanssonia arctica* (Hirudinea).

5 Oppsummering

Forsøk I

- Levendelagring av krabbe på opptil 60 dager uten fôring ved 1 °C og 5 °C gir ingen dødelighet, ingen vekttap, ingen skader og ikke målbart stressnivå.

Forsøk II

- Fôring gir ikke forbedret dyrevelferd relatert til økt frekvens av negativ adferd.

Forsøk III

- Dagens snøkrabbeteine er rømmingssikker for krabbe over 9 cm i skallbredde (>300 g).
- Ståtid på teiner på 45 dager fører ikke til økt dødelighet.

Forsøk VI

- Ingen tegn til akutt infeksjon av parasitten *Hematodinium*.
- På grunn av parasittens levesett (direkte smitte mellom krabber) anbefales at alt av restråstoff behandles før gjenutsetting, eller tas på land.

6 Takk

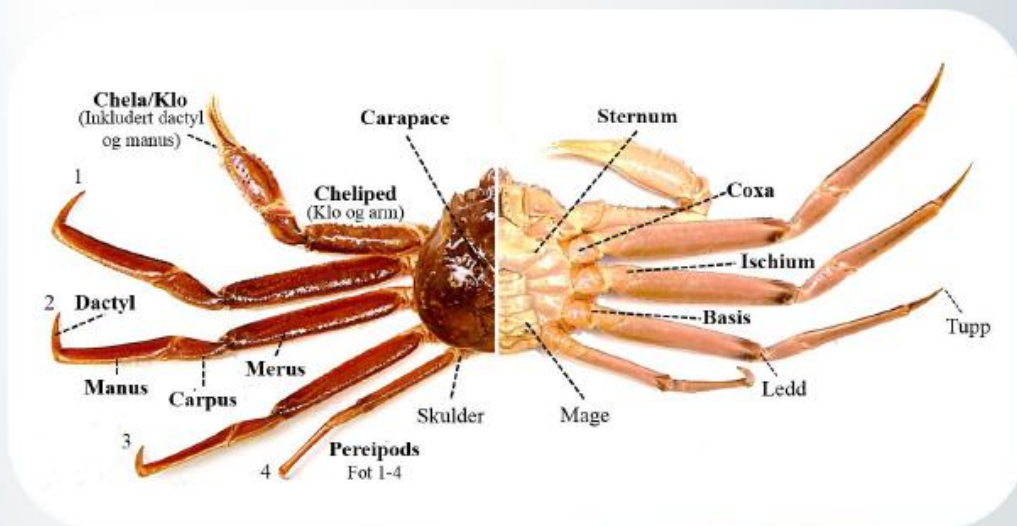
Vi ønsker å takke styringsgruppen, FHF, CapeFish, Opilio AS, Arctic Catch AS og Havbruksstasjon i Tromsø for flott støtte og hjelp i forbindelse med prosjektene. Spesiell takk rettes til Arne Birkeland for deres innsats for å få prosjektet landet. Vi ønsker til slutt å takke Theodore R. Meyers og Pamela Jensen, Division of Fisheries Rehabilitation, Enhancement and Development, Alaska Department of Fish and Game, Alaska, for all hjelp og støtte i forhold til arbeid med parasitten *Hematodinium*.

7 Referanser

- Duemit, E., Kingsley-Smith, P. R. and Wilber, D. H. (2015) The consequences of claw removal on Stone crabs *Menippe* spp. and the ecological and fishery implications. *Fisheries Management*, **35**, 895-905.
- Duemit, E., Shervette, V., Whitaker, D. and Kingsley-Smith, P. R. (2017) A field assessment of claw removal impact on the movement and survival of stone crabs *Menippe* spp.. *Fisheries Research*, **193**, 43-50.
- Hardy D., Munro J. & Dutil J.D. (1994) Temperature and salinity tolerance of the soft-shell and hard-shell male snow crab, *Chionoecetes opilio*. *Aquaculture*, **122**(2), 249-265.
- Hardy D., Godbout, J.D. & Munro J. 2000. Survival and condition of hard shell male adult snow crabs (*Chionoecetes opilio*) during fasting at different temperatures. *Aquaculture*, **189**, 259-275.
- He, J., Wu, X. and Cheng, Y. (2016) Effects of limb autonomy on growth, feeding and regeneration in the juvenile *Eriocheir sinensis*. *Aquaculture*, **457**, 79-84.
- Jensen P.C., Cakiff K., Lowe V., Hauser L. and Morado J.F. (2010). Molecular detection of Hematodinium sp. in Northeast Pacific *Chionoecetes* spp. and evidence of two species in the Northern Hemisphere. *Diseases of aquatic organisms*, 9;89(2):155-66.
- Kuzmin S.A., Akhtarin S.M. and Menins D.T. (1999) The first finding of snow crab *Chionoecetes opilio* (Fabricius), in the Barents Sea. *Canadian translation of Fisheries and Aquatic Science*, No. 5667. 5 pp.
- Pavlov V.A. & Sundet, J.H. (2011) Snow crab. The Barents Sea, ecosystem, resources, management. *Tapir academic press*, 168-171.
- Siikavuopio, S.I., James, P., Olsen, B.R., Evensen, T., Mortensen, A. and Olsen S.H. (2016) Holding wild Snow crab, *Chionoecetes opilio*: Effects of stocking density and feeding on survival and injury. *Aquaculture Research*, DOI: 10.1111/are.12993.
- Siikavuopio, S.I., Whitaker, R.D., Sæther, B-S., James, P., Olsen, B.R., Thesslund, T., Hustad, A. and Mortensen, A. (2017) First observations of temperature tolerances of adult male snow crab (*Chionoecetes opilio*) from the Barents Sea population and the effects on the fisheries strategy. *Marine Biology Research*, 1745-1019.
- Waddy, s. L., Aiken, D. E. and De Kleijn, D. P. V. (1995) Control of growth and reproduction. In: J.R. Factor (Ed.) *Biology of the Lobster, Homarus americanus*. Academic Press, New York.
- Wen, X-H., Chen, L., Ku, Y., Zhou, K. (2006) Effect of feeding and lack food on the growth, gross biochemical and fatty acid composition of juvenile crab, *Eriocheir sinensis*, *Aquaculture*, **252**, 598 – 607.



Protokoll for uttak og farging av hemolymfe fra snøkrabbe



Denne protokollen er en enkel veiledning for påvisning av parasitten Hematodinium i hemolymfe fra snøkrabber.

Parasitten forårsaker sykdommen «Bitter crab disease» i en rekke krabbearter inkludert snøkrabber.

Prosjektet er finansiert av:



FISKERI- OG HAVBRUKSNÆRINGENS
FORSKNINGSFOND

HEMOLYMFEPRØVE

Utstyr: Sprøyte (5ml), kanyle (0.4 x 19 mm)



1

Legg krabben på rygg.



2

Bøy de to bakerste føttene bakover for å strekke ut skulderleddet.

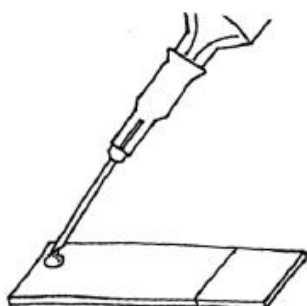


3

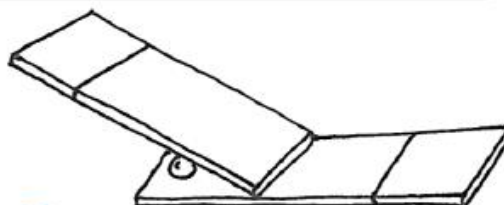
Hold sprøyten parallelt med foten og stikk kanylen halvveis inn i skulderleddet, like under huden. Hold sprøyten i ro og ta prøven (maks 1 ml).

HEMOLYMFEUTSTRYK

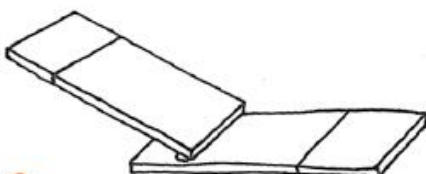
Utstyr: Rene objektglass, metanol, prøverør (50 ml) og objektglassboks.



- 1 Plasser en dråpe (på størrelse med et knappenålshode) på enden av objektglass 1.



- 2 Sett det andre objektglasset på skrå (30-40° vinkel) fremfor dråpen.



- 3 Dra det bakover inn til hemolymfedråpen.



- 4 Med bestemt hand, skyv det fremover langs glasset. Avslutt utstryket $\frac{1}{2}$ cm fra skrivefeltet. Unngå at hemolymfen renner utenfor kantene. Det ekstra objektglasset kastes.



- 5 La utstryket tørke i ca 10 minutter. Rist objektglasset for å redusere tørketiden.



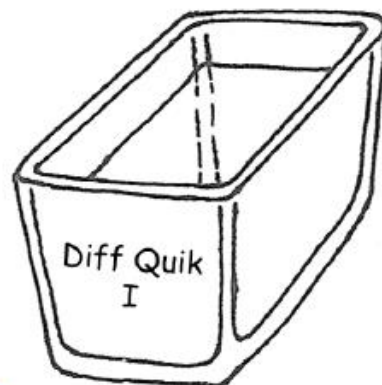
- 6 Fikser utstryket i metanol i 5 minutter. Dette fester utstryket til objektglasset. La utstryket lufttørke etter fiksering. Utstryket lagres i objektglassboks.

FARGING AV HEMOLYMFESTRYK

Utstyr: Diff Quik fargeløsninger (Medion Grifols Diagnostics AG), destillert vann, fargekar og objektglasstativ.

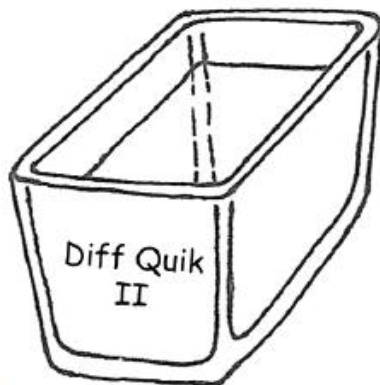


- 1** Dypp utstryket 5 x 1 minutt i Diff Quik Fix.



- 2** Dypp utstryket 5 x 1 minutt i Diff Quik I.

La overskytende væske renne av mellom hvert dypp.



- 3** Dypp utstryket 5 x 1 minutt i Diff Quik II.

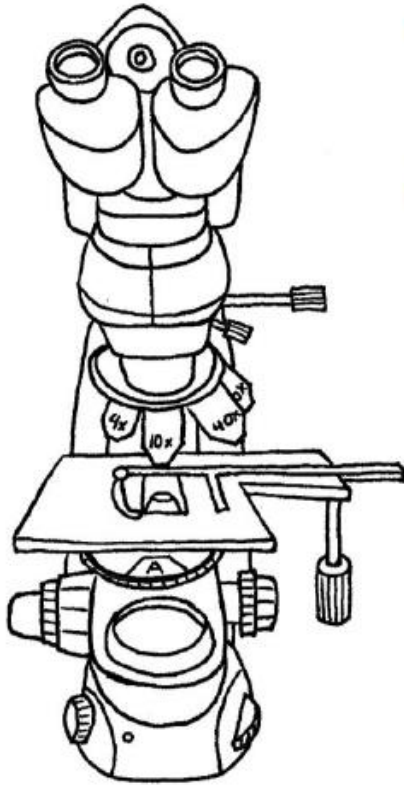
La overskytende væske renne av mellom hvert dypp.



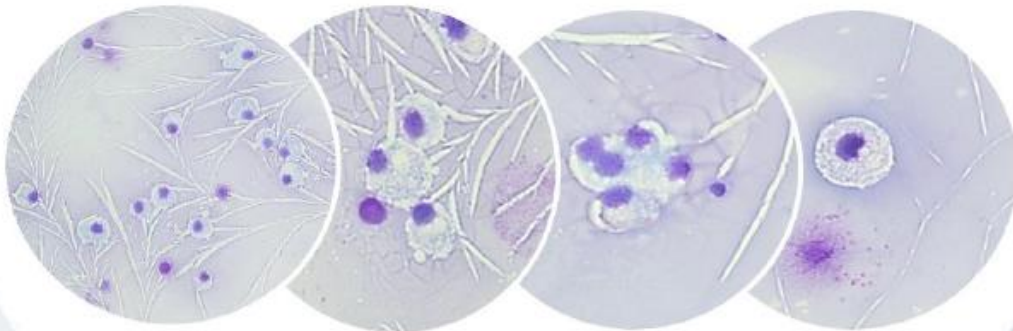
- 4** Vask utstryket i destillert vann og la deretter utstryket lufttørke før mikroskopering.

MIKROSKOPERING

Utstyr: Mikroskop og ferdigpreparerte hemolymfeutstryk.



- 1 Juster mikroskopet i henhold til leverandørens anbefaling.
- 2 Mikroskoper utstyrket. Start med laveste forstørrelse og bruk deretter høyere (40x) for identifisering av mulige parasitter.
- 3 Hematodinium sp. har en rekke livsstadier. Vi forventer å finne trofonter av parasitten ved hjelp av denne metoden. Den skiller seg fra krabbens egne celler med sin skumlignende cytoplasma og tett klumpete kjerne.



Hemolymfeutstryk fått fra Theodore R Meyers

5

Gunhild Seljehaug Johansson, MSc

Forskningsassistent, Produksjonsbiologi, Aqua Divisjonen, Nofima AS,
Muninbakken 9-13, N-9291 Tromsø, Norway

Hanne Johnsen, PhD (Corresponding author)

Scientist, Produksjonsbiologi, Aqua Divisjonen, Nofima AS, Muninbakken
9-13, N-9291 Tromsø, Norway. (hanne.johnsen@nofima.no)

Sten Ivar Siikavuopio, Dr. philos

Senior Scientist, Produksjonsbiologi, Aqua Divisjonen, Nofima AS,
Muninbakken 9-13, N-9291 Tromsø, Norway

Theodore R Meyers, PhD

Division of Fisheries Rehabilitation, Enhancement and Development
(FRED), Alaska Department of Fish and Game, PO Box 3-2000, Juneau, Alaska
99802-2000, USA

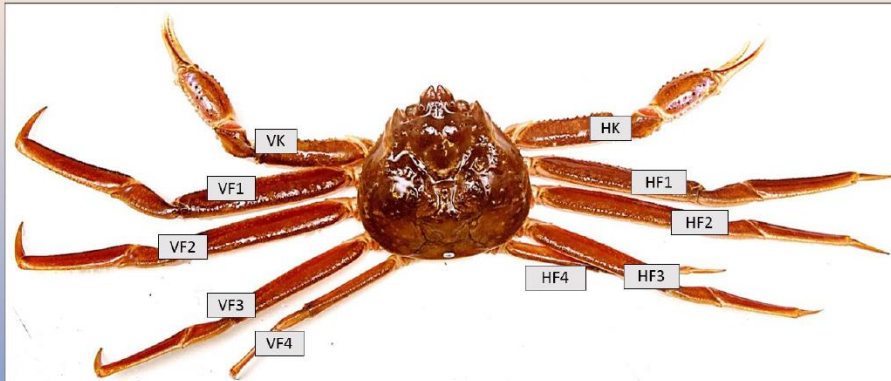
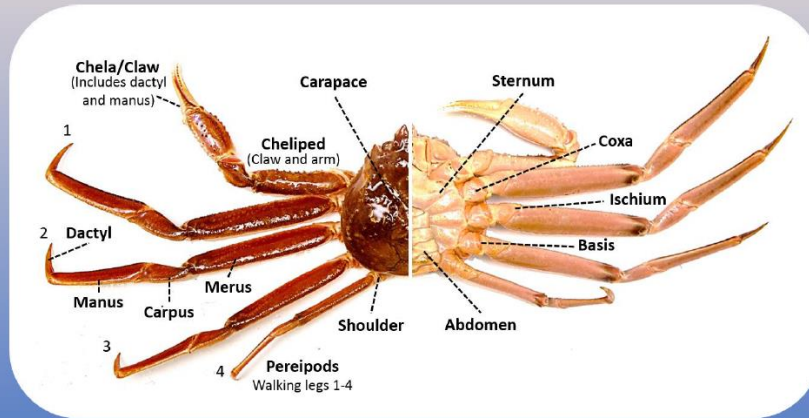


Besøksadresse: Muninbakken 9-13, Breivika, Tromsø

www.nofima.no

Scoring av skader hos Snøkrabber

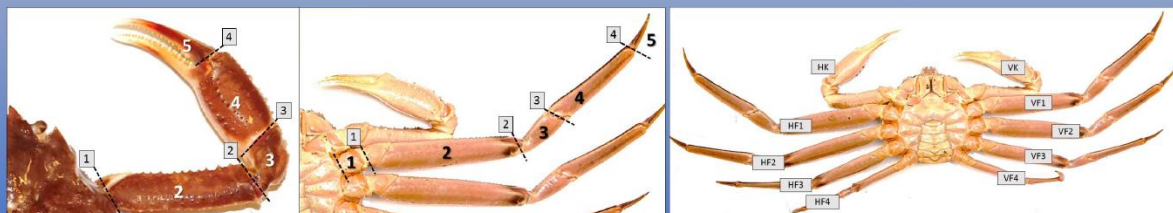
Av: Gunhild Seljehaug Johansson



Definering av foter og ledd for enklere registrering i skjema

| | | | |
|-----|---------------|-----|-------------|
| VK | Venstre klo | HK | Høyre klo |
| VF1 | Venstre fot 1 | HF1 | Høyre fot 1 |
| VF2 | Venstre fot 2 | HF2 | Høyre fot 2 |
| VF3 | Venstre fot 3 | HF3 | Høyre fot 3 |
| VF4 | Venstre fot 4 | HF4 | Høyre fot 4 |

*teller foter forfra



Fottap

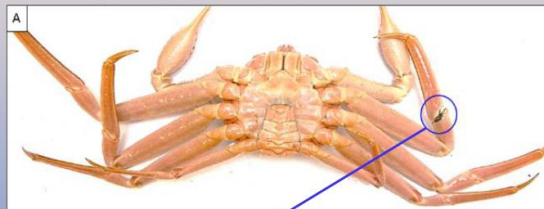
Score 1: Fot inntakt/på | Score 2: Mulig påbegynt fottap | Score 3: Fot halvveis av | Score 4: Fot mangler/av



| STATUS HOS SNØKRABBER | | | | | | | |
|-------------------------------------|--------------------------|---------------------------|---|----------------------------------|---|---|-----------|
| Score foter | | Score leddtap | | Score fot/klo-spiss | | VK Venstre klo HK Høyre klo | |
| 1 fot inntakt/på | 1 ledd inntakt/på | 1 spiss inntakt/på | VK1 Venstre fot 1 | HK1 Høyre fot 1 | Forsøksnr.: | | |
| 2 mulig påbegynt fottap | 2 mulig påbegynt leddtap | 2 mulig påbegynt spisstap | VF2 Venstre fot 2 | HF2 Høyre fot 2 | Date: | | |
| 3 fot halvveis av | 3 ledd halvveis av | 3 spiss halvveis av | VF3 Venstre fot 3 | HF3 Høyre fot 3 | Navn: | | |
| 4 fot mangler | 4 ledd mangler | 4 spiss mangler | VF4 Venstre fot 4 | HF4 Høyre fot 4 | | | |
| <small>*Teller foter korfra</small> | | | | | | | |
| Krabbenr. | #FOTER | #Leddtap | FOTTAP/LEDDTAP (fotkode/leddnr./score) | SPISSTAP (fotkode/leddnr./score) | KLIPESKADER (fotkode/leddnr./antall) | UDEFINERTE SKADER (fotkode/leddnr./antall) | Merknader |
| | | | VF1/1/2 | | | | |
| | | | VF1/1/4 | | | | |

Leddtap

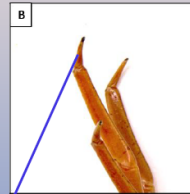
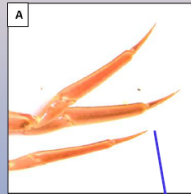
Score 1: Ledd inntakt/på | Score 2: Mulig påbegynt leddtap | Score 3: Ledd halvveis av | Score 4: Ledd mangler/av



| STATUS HOS SNØKRABBER | | | | | | | |
|-------------------------------------|--------------------------|---------------------------|---|----------------------------------|---|---|-----------|
| Score foter | | Score leddtap | | Score fot/klo-spiss | | VK Venstre klo HK Høyre klo | |
| 1 fot inntakt/på | 1 ledd inntakt/på | 1 spiss inntakt/på | VK1 Venstre fot 1 | HK1 Høyre fot 1 | Forsøksnr.: | | |
| 2 mulig påbegynt fottap | 2 mulig påbegynt leddtap | 2 mulig påbegynt spisstap | VF2 Venstre fot 2 | HF2 Høyre fot 2 | Date: | | |
| 3 fot halvveis av | 3 ledd halvveis av | 3 spiss halvveis av | VF3 Venstre fot 3 | HF3 Høyre fot 3 | Navn: | | |
| 4 fot mangler | 4 ledd mangler | 4 spiss mangler | VF4 Venstre fot 4 | HF4 Høyre fot 4 | | | |
| <small>*Teller foter korfra</small> | | | | | | | |
| Krabbenr. | #FOTER | #Leddtap | FOTTAP/LEDDTAP (fotkode/leddnr./score) | SPISSTAP (fotkode/leddnr./score) | KLIPESKADER (fotkode/leddnr./antall) | UDEFINERTE SKADER (fotkode/leddnr./antall) | Merknader |
| | | | VF1/3/3 | | | | |
| | | | | | | | |

Spisstap

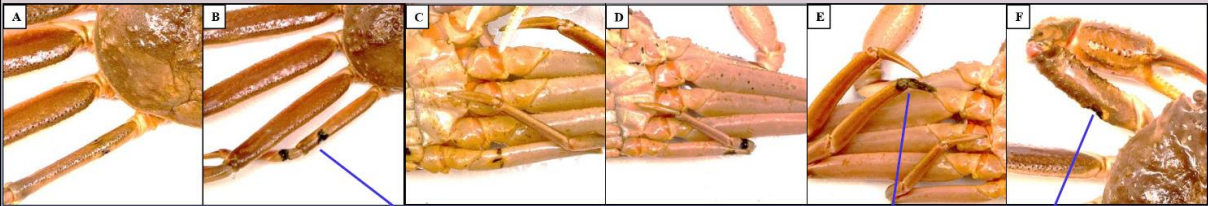
Score 1: Spiss inntakt/på | Score 2: Mulig påbegynt spisstap | Score 3: Spiss halvveis av | Score 4: Spiss mangler/av



| STATUS HOS SNØKRABBER | | | | | | | |
|-------------------------|--------------------------|---------------------------|---|----------------------------------|---|---|-------------|
| Score foter | Score leddtap | Score fot/klo-spiss | VK | Venstre klo | HK | Høyre klo | Forsøksnr.: |
| 1 fot inntakt/på | 1 ledd inntakt/på | 1 spiss inntakt/på | VF1 | Venstre fot 1 | HF1 | Høyre fot 1 | Dato: |
| 2 mulig påbegynt fottap | 2 mulig påbegynt leddtap | 2 mulig påbegynt spisstap | VF2 | Venstre fot 2 | HF2 | Høyre fot 2 | Navn: |
| 3 fot halvveis av | 3 ledd halvveis av | 3 spiss halvveis av | VF3 | Venstre fot 3 | HF3 | Høyre fot 3 | |
| 4 fot mangler | 4 ledd mangler | 4 spiss mangler | VF4 | Venstre fot 4 | HF4 | Høyre fot 4 | |
| | | | *Teller foter forfra | | | | |
| Krabbenr. | #FOTER | #Leddtap | FOTTAP/LEDDTAP (fotkode/leddnr./score) | SPISSTAP (fotkode/leddnr./score) | KLIPESKADER (fotkode/leddnr./antall) | UDEFINERTE SKADER (fotkode/leddnr./antall) | Merknader |
| | | | | HF4/5/1 | | | |
| | | | | HF2, HF3, HF4/5/4 | | | |

Klipeskader og udefinerte skader

Teller antall skader



| STATUS HOS SNØKRABBER | | | | | | | |
|-------------------------|--------------------------|---------------------------|---|----------------------------------|---|---|----------------------|
| Score foter | Score leddtap | Score fot/klo-spiss | VK | Venstre klo | HK | Høyre klo | Forsøksnr.: |
| 1 fot inntakt/på | 1 ledd inntakt/på | 1 spiss inntakt/på | VF1 | Venstre fot 1 | HF1 | Høyre fot 1 | Dato: |
| 2 mulig påbegynt fottap | 2 mulig påbegynt leddtap | 2 mulig påbegynt spisstap | VF2 | Venstre fot 2 | HF2 | Høyre fot 2 | Navn: |
| 3 fot halvveis av | 3 ledd halvveis av | 3 spiss halvveis av | VF3 | Venstre fot 3 | HF3 | Høyre fot 3 | |
| 4 fot mangler | 4 ledd mangler | 4 spiss mangler | VF4 | Venstre fot 4 | HF4 | Høyre fot 4 | |
| | | | *Teller foter forfra | | | | |
| Krabbenr. | #FOTER | #Leddtap | FOTTAP/LEDDTAP (fotkode/leddnr./score) | SPISSTAP (fotkode/leddnr./score) | KLIPESKADER (fotkode/leddnr./antall) | UDEFINERTE SKADER (fotkode/leddnr./antall) | Merknader |
| | | | | | VF4/1,2/2 | VK/1/1 | |
| | | | | | | HF3/5/1 | Hele tappen «råtten» |

