

Stress hos oppdrettet berggylte under transport og overføring til merd

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

Thor Jonassen¹, Karin Pittman², Atle Foss¹, og Mette . Remen¹. ¹:Akvaplan-niva, ²:Institutt for biovitenskap, Universitetet i Bergen
thor@akvaplan.niva.no

Om prosjektet

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

Varighet 01.12.2017 til 20.12.2018

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

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

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

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

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

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

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

Nærmere beskrivelse av prøvetakings- og analysemetode og referanseliste foreligger i sluttrapporten «Toleranse for transportstress og miljøoverganger hos berggylte og rognkjeks» (Akvaplan-niva

rapport nr. 9081-1, Jonassen m.fl. 2019)
 som finnes på prosjektets hjemmeside (<https://www.fhf.no/prosjektdetaljer/?projectNumber=901426>) eller kan fås ved henvendelse til en av forfatterne.

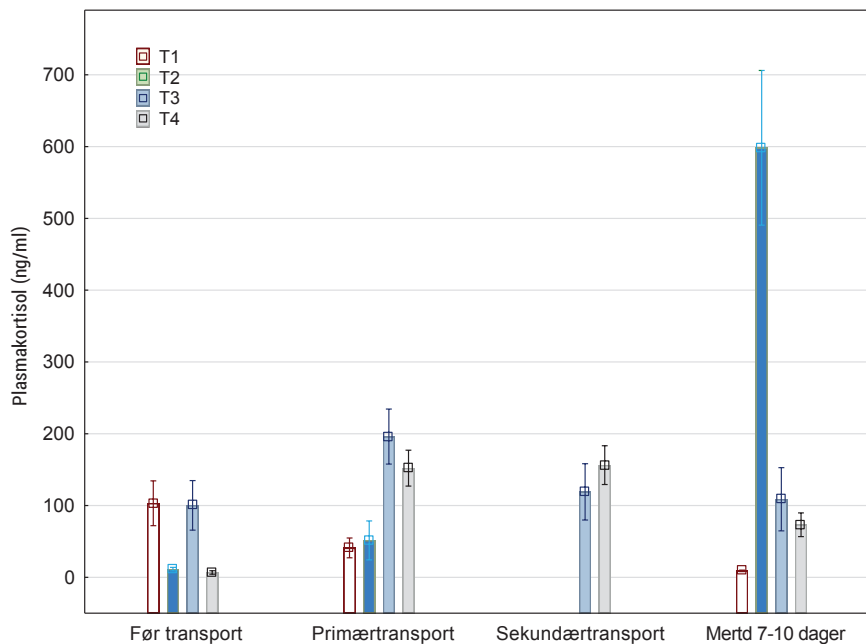
Tabell 1. Transportforhold for fire forskjellige transporter av berggylte.

| Transport oppdrettet berggylt | T1, 28. mai | T2, 29. mai | T3, 10. oktober | T4, 17. oktober |
|--|------------------------------------|------------------------|--------------------------------|--|
| Transportmetode | Spesialbygd brønnbåt | Liten brønnbåt | Bil via liten brønnbåt | Bil via transportkar båt |
| Transporttid, primærtransport | 15 timer (brønnbåt) | 32 timer (brønnbåt) | 8 timer (bil) | 10 timer (bil) |
| Transporttid, sekundærtransport | - | - | 16 timer (brønnbåt) | 10 min (transportkar) + 1 time omlasting |
| Fiskestørrelse (g) | 91 | 70 | 50 | 52 |
| Sultperiode (dager) | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Antall fisk transportert | 10 000 | 34 330 | 11 519 | 17 500 |
| Antall fiskekar bil | - | - | 9 | 11 |
| Antall brønner/fiskekar båt | 3 stk (4, 6 og 13 m ³) | 3 | 3 | |
| Brønnstørrelse bil | | | 2 | 2 |
| Størrelse brønnbåt | 23 | 90 | 90 | 6 stk kar à 1m ³ |
| Fisketetthet under biltransport (kg/m ³) | - | - | 32 | 41 |
| Fisketetthet under båttransport (kg/m ³) | 40 | 9 | 6 | 152 |
| Vannkvalitet under transport | | | | |
| O2-start | 113 | | Bil: 100, Båt: 100 | |
| O2-slutt | 117 | 102-116 | Bil: 105, Båt: 127 | 101-124 |
| pH-start | 7,7 | - | Bil: ?, Båt: 8,8 | |
| pH-slutt | 7,8 | - | Bil: ?, Båt: 9,1 | 7,1 - 7,7 |
| Temp °C start | 12,5 | 12,5 | Kar: 11,5, Bil: 11,6 Båt: 11,9 | 12,2 |
| Temp °C slutt | 15 | 16,9 | Bil: 10, Båt: 11,6 | 12,7 - 14,5 |
| Forhold i merd etter overføring | | | | |
| Temp i merd ved levering (°C) | 14,5 | 16,2 | 11,6 | 12,4 |
| Merdstørrelse | 160 m | 160 m | 157 | 157 |
| Antall laks | 150 000 | 164 000 | 169 000 | |
| Blanding av leppefisk og rognkjeks? | ja | ja | Ja | Ja |
| % innblanding renseskjeks totalt (%) | | 5,50 | 9,2 | 10,2 |
| Antall oppdrettet berggylt | 3 300 | 3 400 | 3 613 | |
| % innblading oppdrettet berggylt | 2,2 | 0,74 | 2,1 | 2,6 |
| % innblanding rognkjeks | | 1,20 | 0,5 (usikkert antall) | 7,6 |
| % dødelighet etter 7-10 dager | 13% | 19% | 1,3 | 1,16 |
| % dødelighet etter utsett | 3 mnd: 37,7% | 3 mnd: 64,6% | mnd: 576%, 2 mnd 15,11% | 1 mnd 4,37% 4 mnd: 20% |
| Temp i perioden med dødelighet | 14,5 - 17,7 °C (mai-aug) | 16,2 - 21 °C (mai-aug) | 11,6 - 9,8 | 12,4 - 7,5 (okt-jan) |

Resultater og diskusjon

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

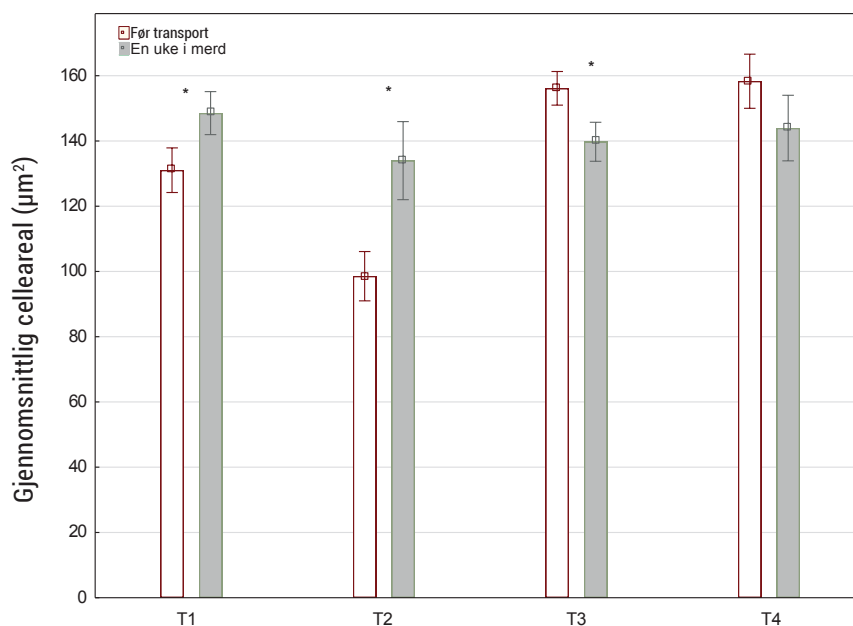
pH og osmotisk stress

Kortisol har en viktig rolle i reguleringen av energiomsetningen (aktivitet) og saltbalansen hos fisk. Endringer i pH og ione-sammensetningen i blodplasma er derfor typiske sekundære stressresponser. Variasjonen i pH og et sett med ioner som inngår i fiskens aktive osmoregulering (Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{2+}) ble derfor analysert fra blodplasma for å kartlegge sekundære stressresponser. Alle gruppene fikk redusert pH etter utsett i sjø sammenlignet med før transport, som tyder på økt aktivitet etter utsett i merd.

Generelt for alle gruppene var det en økning i plasmaioner (Na^+ , Cl^- og K^+) etter overføring fra kar til merd som antyder en generell risiko for økt osmotisk belastning etter overføring til merd. Nivåene er likevel ikke å anse som kritiske eller spesielt belastende vurdert opp mot normale verdier for annen marin fisk og laks.



Berggylte fra T1 før transport etter blodprøvetaking og uttak av skinnprøve.



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

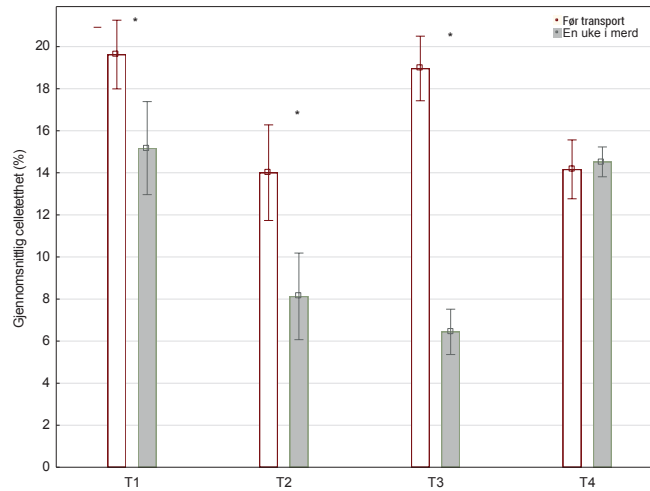
Skinnhelse

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

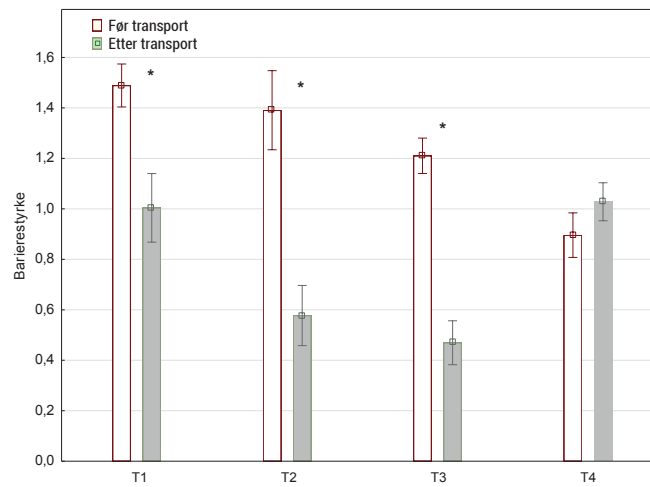
Det er vist at en rekke miljøfaktorer påvirker morfologien og strukturen til slimcellene i huden, og at endringer i slimcellestus kan indikere stress. En kvantitativ analyse av slimcellestus (Quantidoc) basert på måling av størrelse (areal) og tetthet av slimceller (som % av epitelets totale overflate)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

Prøvene fra bergfylte i kar før transport viste relativt stor variasjon i celleareal mellom gruppene, men ingen forskjell i cellediameter etter 7-10 dager i merd (Figur 2). For T1 og T2 medførte en overgang fra kar til merd en økning i cellediameter, og for T3 og T4 en reduksjon, som var signifikant kun for T3 (som hadde bakgrunn fra RAS-anlegg).

For alle gruppene bortsett fra T4 var det en reduksjon i tettheten av slimceller (Figur 3) og barrierestyrken i huden etter overføring fra kar til merd (Figur 4). For T4 var det ingen endring. Respons på skinnhelse hos bergfylte er ikke



Figur 3. Gjennomsnittlig tetthet (%) av slimceller i hud hos oppdrettet bergfylte fra fire forskjellige transporter. Vertikale linjer på søylene indikerer standard feil (SEM). Signifikant forskjell innad i gruppene (enveis ANOVA, $p < 0,05$) er indikert med *.



Figur 4. Barrierestatus i hud hos oppdrettet bergfylte fra fire forskjellige transporter. Vertikale linjer på søylene indikerer standard feil (SEM). Signifikant forskjell innad i gruppene (enveis ANOVA, $p < 0,05$) er indikert med *.

Tabell 2. Regresjonskoeffisient (R) og p-verdier (p) fra regresjonsanalyser mellom slimcellestus og blodfysiologi (analyser av kortisol, pH og ioner fra plasma) hos oppdrettet bergfylte.

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

testet systematisk i forhold til varierende miljø og stress, men endringen fra kar til merd i tre av gruppene tyder på at skinnhelse er en interessant parameter for måling av endringer i robusthet og førstelinjeforsvaret hos berggylte. Slik effekt på størrelse og tetthet av slimceller er vist som respons på en rekke miljøfaktorer hos fisk tidligere, f.eks. pH, salinitet, oksygen og nitrat ved miljøendringer. Videre er det tidligere vist at laks produsert ved 4 °C hadde lavere slimcelletetthet enn laks produsert ved 16 °C. Det er derfor mulig at temperaturendringer ved overføring fra kar til merd har vært medvirkende årsak til endringen i celletetthet og barrierestyrke på berggylte etter transport.

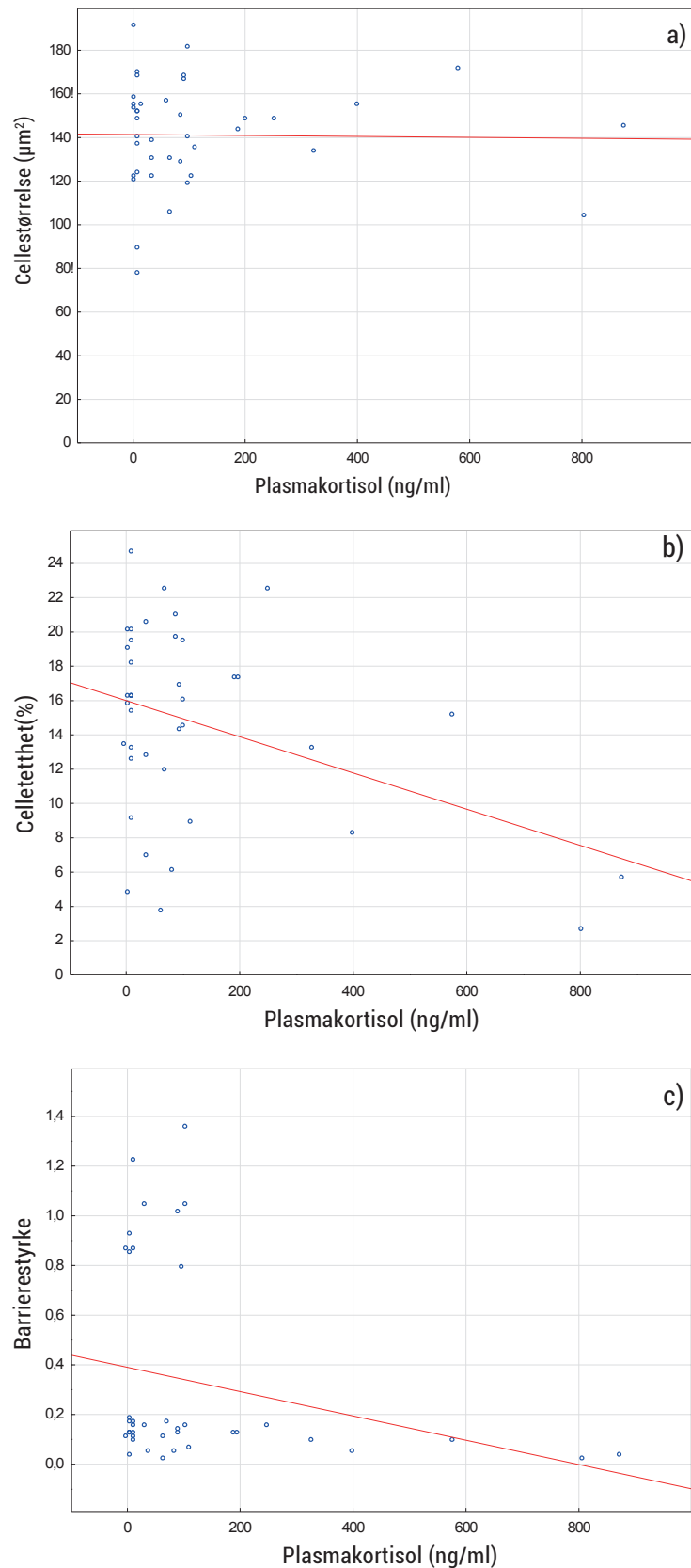
Sammenheng mellom primær stressrespons og skinnhelse

Regresjonsanalyser basert på all prøvene (n = 40) viste en negativ sammenheng mellom plasmakortisol og celletetthet (Figur 5b, $b = -0,39$, $R^2 = 0,15$, $p < 0,05$), men ingen sammenheng mellom plasmakortisol og cellestørrelse (Figur 5a, $b = -0,02$, $R^2 = 0,00$, $p = 0,9$) eller plasmakortisol og barrierestyrke (Figur 5c, $b = -0,25$, $R^2 = 0,06$, $p = 0,12$).

Tilsvarende regresjonsanalyser basert på sammenslåtte data (n=21) fra kun T1 og T2 (fisk av samme opphav, alder og utsettingstidspunkt) viste ingen sammenheng mellom plasmakortisol og cellestørrelse (Figur 6a, $b = 0,14$, $R^2 = 0,02$, $p = 0,55$), men det var et signifikant negativt lineært forhold mellom plasmakortisol og celletetthet (Figur 6b, $b = -0,57$, $R^2 = 0,33$, $p < 0,01$) og plasmakortisol og barrierestyrke (Figur 6c, $b = -0,65$, $R^2 = 0,42$, $p < 0,01$).

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

Sammenhengen mellom slimcellestatus og plasmaioner (Tabell 2) viser en negativ korrelasjon mellom celletetthet og Cl⁻ og K⁺. Dette indikerer økt osmotisk stress ved



Figur 5. Forholdet mellom plasmakortisol og skinnhelse hos oppdrettet berggylte for sammenslåtte data fra gruppene T1-T4.

redusert tetthet av slimceller. Det er en positiv korrelasjon mellom celletetthet og pH.

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

Konklusjoner

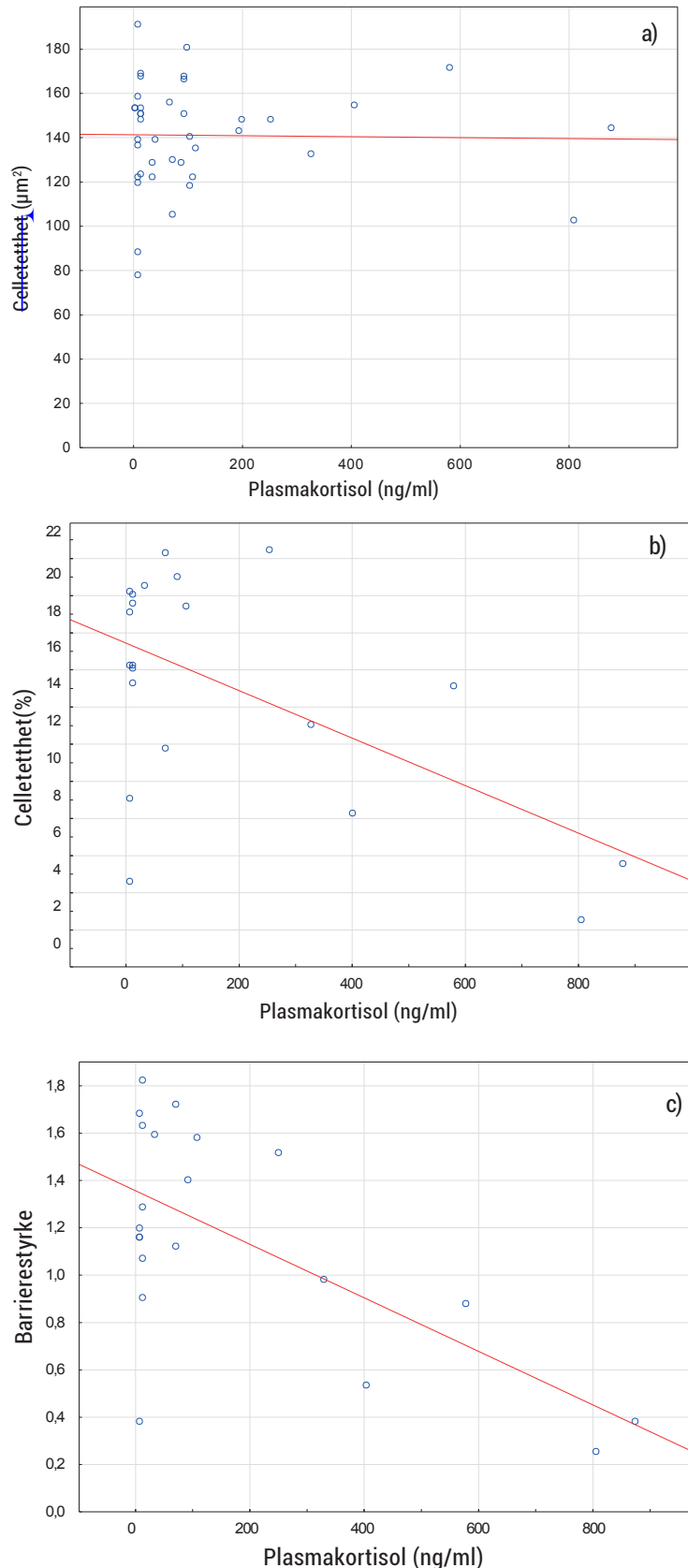
Forholdene på lokaliteten og drift har sannsynligvis større betydning for overlevelse etter utsett i merd enn stressbelastningen forbundet med selve transporten. Miljømessig ser strøm og temperatur ut til å ha stor betydning, og spesielt i kombinasjonen sterk strøm og høye temperaturer. Av driftsmessige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

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

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

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

Analyser av pH og plasmaioner indikerer generelt økt aktivitet og osmotisk



Figur 6. Forholdet mellom plasmakortisol og skinnhelse hos oppdrettet berggylte for sammenslåtte data fra gruppene T1-T4.

belastning for berggylte etter utsett i sjø, men ikke på nivåer vurdert som kronisk belastende.

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

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

Det er behov for utvikling av gode metoder for måling av fiskens robusthet og respons på stress og miljøforhold for dokumentasjon og styring mot bedre fiskevelferd, spesielt i merd hvor slike utfordringer er store. Metodene

kan med fordel inkludere analyser av slimcellestatus som mål på utvikling av barrierestatus, men må verifiseres i flere studier med berggylte under ulike miljøforhold for å gi bedre grunnlag for tolking.



VAKI AS