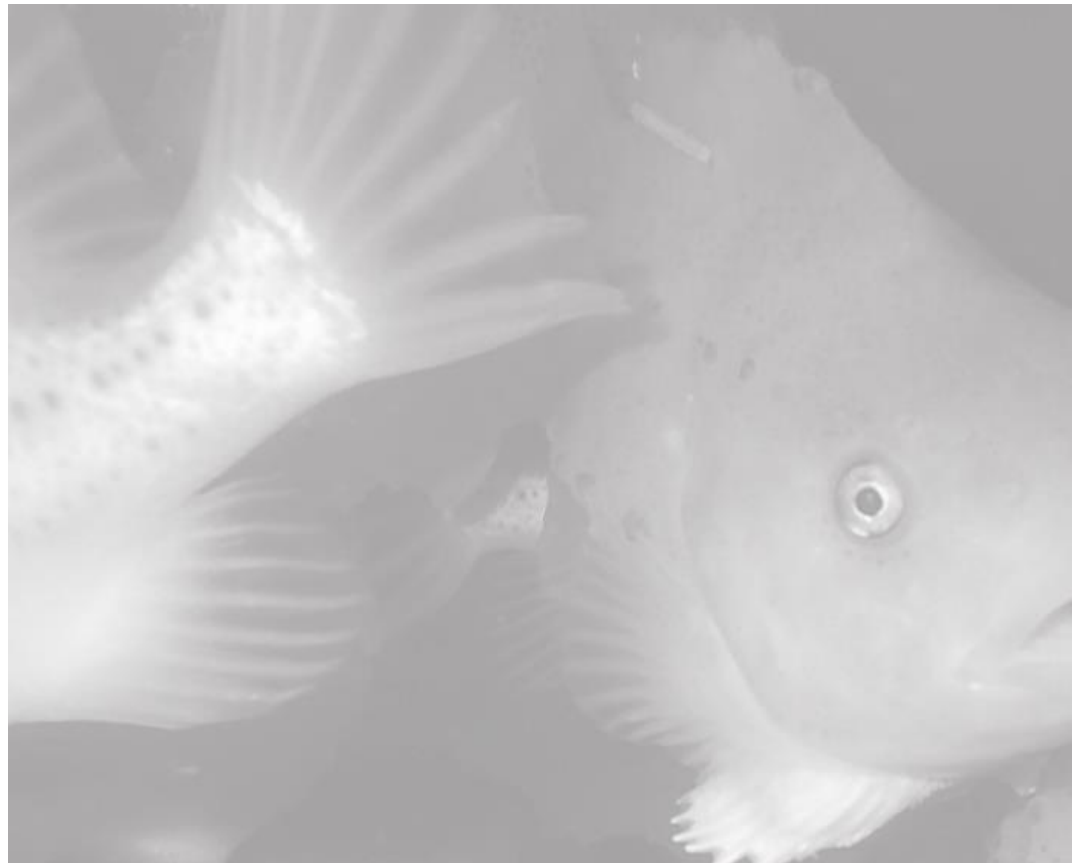
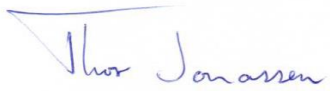
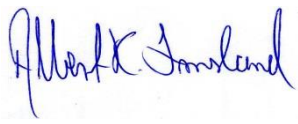


# Sluttrapport:

## Utvikling av transport- og mottaksprosedyrer for rognkjeks basert på kartlegging av miljø og stress



**This page is intentionally left blank**

<b>Rapporttittel / Report title</b> Utvikling av transport- og mottaksprosedyrer for rognkjeks basert på kartlegging av miljø og stress	
<b>Forfatter(e) / Author(s)</b> Mette Remen og Thor Jonassen  <b>Prosjektgruppe/Project group:</b> Aqua Kompetanse: Siri Ag og Erika Kunickiene (feltarbeid)  Akvaplan-niva: Mette Remen, Thor Arne Hangstad, Lauri Kapari, Armand Moe Nes, Karin Bloch-Hansen, Thor Jonassen	<b>Akvaplan-niva rapport nr / report no</b> 7707 - 1
	<b>Dato / Date</b> 27.02.2017
	<b>Antall sider / No. of pages</b> 74
	<b>Distribusjon / Distribution</b> Åpen
<b>Oppdragsgiver / Client</b> FHF	<b>Oppdragsg. referanse / Client's reference</b> 901158
<b>Sammendrag / Summary</b> Rapporten presenterer data på vannkvalitet og utvikling i primær (plasmakortsol) og sekundære (osmolalitet, plasma-pH, plasmaioner, laktat og glukose) stressresponser hos rognkjeks fra 15 kommersielle transportere i felt (Del I) samt fem kontrollerte simulerte transportforsøk (Del II). Forhold som endringer i temperatur, transporttid, fiskestørrelse, fisketetthet, oksygenmetning, håndtering (flytting mellom kar) og sekundærtransport ble undersøkt i forsøk samt diskutert i forhold til observerte variasjoner under transportere i felt. I tillegg ble eventuelle seineffekter på vekst og overlevelse 30 dager etter kontrollerte transportforsøk undersøkt, samt en test for allostatisk overbelastning (Stimulering- og suppressjon av HPI-aksen) gjennomført etter 30 dager (Del II). Hovedkonklusjonen understøttet av undersøkelser fra både felt og forsøk er at håndtering i forbindelse med transport er hoved-stressor, mens lengre transportere gir god mulighet for fisken å "stresse ned". Største utfordring for kommersielle transportere er omlasting fra primærtransport (bil) til sekundærtransport kombinert med at sekundærtransporten ofte har ustabil vannmiljø og er for kort for restituering slik at en etter sekundærtransporten har akkumulert et betydelig stressnivå når fisken overføres til merd. Høyt stressnivå ved utsett i merd øker risikoen for utvikling av kronisk stress og økt dødelighet. Studiene viser også klart at en ikke vet nok om rognkjeksens fysiologiske respons på miljøendringer og stress. Kunnskapen fra feltundersøkelsene og de fem simulerte transportene ble brukt i en veileder for håndtering og transport av rognkjeks (Del III) publisert på lusedata.no.	
<b>Prosjektleder / Project manager</b> Thor Jonassen  	<b>Kvalitetskontroll / Quality control</b> Albert Imsland  

# INNHALDSFORTEGNELSE

1 BAKGRUNN .....	5
2 INTRODUKSJON.....	6
3 DEL I: ANALYSER FRA 15 KOMMERSIELLE TRANSPORTER .....	7
3.1 Gjennomføring .....	7
3.2 Resultater.....	8
3.2.1 Vannkvalitet under transport: .....	8
3.2.2 Oksygen .....	9
3.2.3 Karbondioksid og pH.....	10
3.2.4 Ammoniakk (TAN).....	11
3.2.5 Totalt organisk karbon (TOC) .....	11
3.3 Effekter av håndtering og transport.....	12
3.3.1 Stressadferd.....	12
3.3.2 Primær stressrespons.....	12
3.3.3 Sekundære stressrespons .....	14
3.3.4 Forberedelse og opplasting .....	19
3.4 Konklusjoner og anbefalinger .....	26
3.5 Referanser .....	27
4 DEL II: ANALYSER FRA TRANSPORTSIMULERINGSFORSØK.....	29
1. Metode .....	29
1.1 Forsøksoppsett.....	29
1.2 Forberedelser til transportsimulering.....	30
1.3 Prøvetaking .....	31
1.4 Måling av kronisk stress .....	32
1.5 Måling av vekst og dødelighet.....	32
1.6 Plasmaanalyser .....	32
1.7 Statistiske analyser .....	33
2 Resultater og diskusjon.....	33
2.1 Vannkvalitet under transport .....	33
2.2 Akutte effekter av normal transport.....	36
2.3 Akutte effekter av ulike transportbetingelser. ....	40
2.4 Langvarige effekter av ulike transportforhold .....	45
3 Sammendrag .....	47
3.1 Konklusjoner- akutte effekter av transportbetingelser.....	47
3.2 Konklusjoner- langtidseffekter .....	47
3.3 Anbefalinger .....	48
4 Referanser.....	48
5 DEL III: VEILEDER FOR HÅNDBLING OG TRANSPORT .....	50
5.1 Bakgrunn og formål: .....	50
5.2 Spesielle forhold: .....	50
5.3 Beskrivelse .....	51
5.4 Vedlegg: .....	68
6 LEVERANSER FRA PROSJEKTET .....	73
7 MÅLOPPNÅELSE OG NYTTEVERDI FRA PROSJEKTET.....	74

© 2016 Akvaplan-niva AS. Rapporten kan kun kopieres i sin helhet. Kopiering av deler av rapporten (tekstutsnitt, figurer, tabeller, konklusjoner, osv.) eller gjengivelse på annen måte, er kun tillatt etter skriftlig samtykke fra Akvaplan-niva AS.

# 1 Bakgrunn

---

Prosjektet ble gjennomført av Akvaplan-niva i samarbeid med Aqua Kompetanse på oppdrag fra Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF) v/ Eirik Sigstadstø gjennom prosjektet "Utvikling av transport- og mottaksprosedyrer for rognkjeks basert på kartlegging av miljø og stress" (prosjektnummer 901158). Styringsgruppen for prosjektet var Olav Breck (Marine Harvest), Kjetil Heggen (Lerøy Seafood), Lars Jørgen Ulvan (Nordland Rensefisk), Halvard Hovland (Havlandet Marin Yngel) og Espen Lie Dahl (SalMar). Referansegruppen bestod av Jarle Tveiten (Jarle Tveiten Transport), Martin Haugmo Iversen (Nord Universitet) og Mark Powell (NIVA og UiB).

Hovedmålet var å gi anbefalinger av prosedyrer for transport og mottak av rognkjeks som best mulig ivaretar fiskevelferd og kvalitet på rognkjeks basert på undersøkelser av vannkvalitet og stressrespons under kommersielle transporter og kontrollerte simulerte transportforsøk. Prosjektet hadde følgende delmål: 1. Å kartlegge variasjonen i miljødata og tilhørende stressresponser på fisk fra ulike fisketransporter, 2. Å simulere transporter under forskjellige miljøforutsetninger og oppfølging av fisk i kar for å måle seneffekter av transportstress (vekst og dødelighet), 3. Å utveksle praktiske erfaringer for å sikre god implementering av nye prosedyrer.

Forventet nytteverdi: Den belastningen fisken påføres utgjør et dyrevelferdsproblem samtidig som det påfører oppdretter økonomiske tap og muligens redusert lusekontroll ved at stresset og skadet fisk er mindre effektive lusespisere. Innføring av prosedyrer som reduserer stress forventes å redusere disse problemene, og vil spare oppdretter for kostnader knyttet til behandling og kontroll av lakselus. Med det omfanget rognkjeks brukes i dag vil forbedringen ha stor økonomiske betydning. Kunnskapen fra prosjektet kan i tillegg gi grunnlag for videreutvikling og forbedring av tekniske løsninger knyttet til transport, og gi både transportør, oppdretter og tilsynsmyndighetene viktig kompetansegrunnlag.

## 2 Introduksjon

---

Det er stor variasjon i robusthet og overlevelse på rognkjeks overført til laksemerd for å spise lakselus og noe av variasjonen tror en kan være relatert til transport og håndtering av fisken før utsett. En har også svært liten kontroll og erfaring med hvordan rognkjeks overlever og tilpasser seg etter transporten, og observasjon av dødelighet i merd og antallskontroll med rognkjeks har ofte lite fokus. Kort- og langtidseffekter av transport og fiskens fysiologiske tilstand og robusthet før utsett i merd er i svært liten grad dokumentert, og grunnlaget for etablering av protokoller for transport, håndtering og mottakskontroll er derfor lite fundert.

Vitenskapskomiteen for mattrygghet har understreket at det generelt for fisketransport er behov for mer oppmerksomhet rundt fiskevelferd (Annon, 2008), med spesielt fokus på bl.a. fiskeart, størrelse, håndtering, vannkvalitet, transporttid og temperatur. Den belastningen fisken påføres utgjør et dyrevelferdsproblem samtidig som det påfører oppdretter økonomiske tap og muligens redusert lusekontroll ved at stresset og skadet rognkjeks er mindre effektive lusespisere.

Stress er en viktig respons mot trusler og tilpasning til miljøendringer, og fisk har generelt god evne til tilpasninger. Stress er negativt først når det forekommer over lang tid på nivåer fisken ikke kan takle.

Stressresponsen vil variere med belastningen og en kan karakterisere forløpet der en først får en umiddelbar alarmreaksjon (primærrespons) med bl.a. mobilisering av stresshormonet kortisol som utløser en sekundær respons med bl.a. energimobilisering og endringer i permeabiliteten i gjelleepitel, og til slutt (tertiærrespons), dersom stresspåvirkningen er større enn det fisken klarer å takle (overstiger evnen til å tilpasse seg til/regulere) vil den nå utmattelse med misstilt tilpasninger, svekket immunforsvar og økt mottakelighet for sykdommer og død som resultat (Iwama m. fl. 1997).

Upubliserte data fra Universitet i Nordland presentert på FHF-rensefisk-konferanse 28.-29. april 2015 (Dr. Martin Haugmo Iversen) viser at rognkjeks (15-30 g) under kronisk stress gir klar respons på plasmakortisol. Selv om nivåene er lave sammenlignet med annen fisk kan de likevel 4-6 dobles i forhold til verdiene på ustresst fisk. Kartlegging av stressrespons på karakteristiske miljøforhold under transport er derfor mulig med samme tilnæringsmåte som for annen fisk, og vil gi en bedre forståelse for hva som har betydning for praktisering av god dyrevelferd, hva slags stressreaksjon en kan forvente seg av de enkelte håndteringsmetodene og miljøforholdene under transport.

Feltundersøkelser vil kunne kartlegge primær stressrespons på transport (plasmakortisol). Kombinert med kontrollerte simuleringer av transportforhold og oppfølging av seineffekter på f.eks. vekst og overlevelse vil en også få informasjon om sekundære og tertiær stressrespons som er vanskelige å fange opp i felt. Denne informasjon vil en utnytte for å beskrive gode transport- og mottaksprosedyrer som ivaretar kvaliteten på rognkjeks.

Denne sluttrapporten består derfor av tre deler:

- I. Analyser fra feltundersøkelse fra 15 kommersielle transportere
- II. Analyser fra fem kontrollerte simulerte transportforsøk
- III. Veileder for håndtering og transport av rognkjeks

## 3 Del I: Analyser fra 15 kommersielle transporter

---

### 3.1 Gjennomføring

Totalt 15 kommersielle transporter av liten rognkjeks (18-64 g) for utsett i merd med laks ble fulgt opp i perioden oktober 2015 til september 2016 (Tabell 1). For alle transportene ble det tatt blodprøver av 6 fisk før opplasting til primærtransport (transportkar på bil eller båt, eller i brønnbåt), etter primærtransport (før lossing) og etter sekundærtransport som gikk fra kai til merd i transportkar på båt eller i liten brønnbåt (11 m<sup>3</sup>). To transporter gikk direkte til merd (ingen sekundærtransport). I tillegg ble det for to transporter også tatt blodprøver av 6 fisk før sulting (hhv. 2 og 3 dager før transport) og for tre transporter blodprøver av 6 fisk 30-45 min. etter opplasting på bil. Plasma fra blodprøvene ble analysert for stresshormonet kortisol samt osmolalitet, pH, plasmaionene Mg<sup>+</sup> og Ca<sup>2+</sup> samt laktat og glukose. I tillegg ble vannkvalitet (O<sub>2</sub>, pH og temperatur) målt ved slutt av primærtransport og det ble tatt vannprøver for analysering av TAN (totalammoniakk), CO<sub>2</sub>, TOC (total organisk karbon) og turbiditet fra 8 transporter (Tabell 2) etter primærtransport. Fra en del av transportene ble det også hentet inn data fra mottakskontroll og dødelighet i merd 30 dager etter levering. Ved hvert prøvetidspunkt ble fiskevekt og lengde registrert og tiden nøye notert. Prøvetakingen blir utført av forskjellige personer, men etter en felles protokoll for blodprøvetaking, sentrifugering og uttak av plasma. Alle plasmaprøvene ble lagret på flytende nitrogen eller tørris. Det forekom enkelte uhell ved prøvetaking eller lagring av prøver, eller at kvaliteten på prøvene ble vurdert å ikke være god nok (primært for lite prøvemateriale). Slike prøver er ekskludert fra analysene.

#### Analyser

Analyser av plasmakonsentrasjoner av kortisol, glukose, laktat, ioner (Mg<sup>2+</sup> og Ca<sup>2+</sup>) og plasma osmolalitet/pH ble utført av Havforskningsinstituttet (Forskningsstasjon Matre ved Karen Anita Kvestad). Ved forsendelse ble prøvene holdt frosset i en cryocontainer mettet med flytende nitrogen, og deretter oppbevart ved -80 °C til analysene ble gjennomført.

Konsentrasjon av kortisol ble målt ved bruk av analysekit RE52061 Enzyme Immunoassay ([www.ibl-international.com](http://www.ibl-international.com)), med analyseområde 20-800 ng/ml. Elisa-platen ble avlest ved bruk av Tecan Sunrice plateleser. Analyse av plasma pH ble utført ved bruk av Radiometer pHM 92 og pH-plasma-elektrode Modell PHC 3395-8 ([www.nmas.no](http://www.nmas.no)). Kalibrering og kontroll ble utført med standardløsninger fra leverandør. Osmolalitet ble utført på Fiske Micro-Osmometer, med tilhørende standardløsninger og kontroller ([www.aicompanies.com](http://www.aicompanies.com)). Konsentrasjoner av plasma ioner, glukose og laktat ble målt ved bruk av Maxmat PI II. Det ble brukt standarder og kontroller tilhørende instrumentet. På grunn av lite prøvevolum (og et instrumentelt behov for et minstevolum i prøverør) ble disse prøvene fortynnet før kjøring.

#### Statistiske analyser

Statistiske analyser ble utført ved hjelp av Statistica. En-veis ANOVA og lineær regresjon ble brukt for å teste effekt av de forskjellige transportforholdene på plasmaparameterne.

Signifikansnivå ( $\alpha$ ) ble satt til 0.05 i alle analyser.

## 3.2 Resultater

### 3.2.1 Vannkvalitet under transport:

Vannkvaliteten varierte mellom de forskjellige transportene (Tabell 1), og spesielt mellom de forskjellige stadiene av transportene (primær og sekundærtransport). I transportkar på bil hvor en har god styring og regulering av oksygen samt lufting av transportvannet hadde en god kontroll på oksygennivået, CO<sub>2</sub> og pH, bortsett fra i ett tilfelle hvor oksygenmetningen var høy gjennom hele transporten (T2: 120%) og CO<sub>2</sub>-nivået målt fra vannprøver på slutten av transporten (14 timer) var høyt (29 mg/L).

Tabell 1. Oversikt over transportforhold for de 15 kommersielle transportene fulgt opp i prosjektet.

Transportforhold	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15
Transportmåte:	Bil	Bil	Bil	Kar på båt	Bil	Bil	Bil	Bil	Bil	Bil	Bil	Bil	Brønnbåt	Bil	Bil
Transporttid:	15	14	13,5	1	22	28	21	18	21	18	8	13	5	14	15
Fiskestørrelse (g):	40	30	40	18,6	24	27	48,5	31	20	50	43	18,6	64	39	53
Tankvolum:	2	2	2	2,1	2,3	2,3	2	2	2	2	2	2	11	2	2
Fisketetthet (kg/m <sup>3</sup> ):	32	36	35	35	29	29	46	20	14	35	23	35	34	44	47
Sulting (dager):	2	3	3	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1,5	2	2
Sekundærtransport	ja	ja	ja	nei	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	nei	ja	ja
Sedasjon ved overføring?	ja	nei	ja	-	-	-	nei	ja	nei	nei	ja	nei	-	-	ja
Transportmåte sekundærtan.	Brønnbåt	Kar på båt	Brønnbåt	-	Kar på båt	Kar på båt	Kar på båt	Kar på båt	Kar på båt	Brønnbåt	Kar på båt	Brønnbåt	-	Kar på båt	Kar på båt
Transporttid sekundærtransp.	5	1,5	3,5		1	2	<0,5	1	1	<1	1,5	1		<0,5	2
Tetthet sekundærtransp.	83,6		55,3							16,5	37,5	46	75,6	34	

Generelt setter endringer i vannkvalitet de største begrensningene for lukket transport, og den faktoren som påvirker mest er fiskens metabolisme (forbrenning). Uten vannutskifting skjer det en akkumulering av metabolitter som totalammoniakk (TAN) og CO<sub>2</sub>, økning i partikler fra avføring og slim o.l. (TOC = total organisk karbon) og reduksjon i pH. Andelen TAN som foreligger i giftig form som fritt ammoniakk (NH<sub>3</sub>) øker med økende pH. PH er påvirket av akkumuleringen av CO<sub>2</sub>, som skilles ut av fisken raskere enn TAN, men akkumuleres seinere siden god utlufting av vannet lufter ut en stor andel CO<sub>2</sub>. Redusert pH (ved økt CO<sub>2</sub>) bidrar til å redusere andelen giftig ammoniakk. For praktisering av god fiskevelferd under transport er det viktig med god kunnskap om hva som forårsaker variasjoner i vannkvalitet og hvordan de påvirker fisken.

Kontroll med vannkvalitet under lukket transport er først og fremst avhengig av god forberedelse som tilstrekkelig sulting, lav tetthet i kar, temperaturregulering av vannet o.l. Reguleringsmulighetene under lukket transport på bil er justering av O<sub>2</sub>, som bør ligge stabilt på 100%, og regulering av lufting av vannet. Reduseres pH raskt bør luftingen økes.



### 3.2.2 Oksygen

Det var større utfordringer med variasjon i oksygen under sekundærtransport i kar på båt med direkte tilsetning av oksygen gjennom diffusor uten regulering og styring sammenlignet med primærtransport. F.eks. var oksygenmetningen 150% i T7 og 45% i T11 under sekundærtransporten (Tabell 2). Slike svingninger er erfaringsmessig vanlig i små transportenheter (600 – 2700 L kar) dersom en ikke har opplegg for lufting eller mulighet for vannutskifting/sirkulasjon med oksygenert vann.

Både overmetning og undermetning av oksygen kan gi dårlig fiskevelferd. Høy oksygenmetning vil kunne gi gjelleskader, oksidativt stress som gir seg utslag i dødelighet etter transport. Videre øker giftigheten av ammoniakk med redusert oksygenivå. I motsetning til oss mennesker regulerer fisk oksygenopptaket i forhold til oksygeninnhold i blodet, og ikke i forhold til CO<sub>2</sub>. Høy oksygenmetning vil derfor redusere fiskens respirasjonsrate og dermed redusere utluftingen av CO<sub>2</sub> fra blodet (Wedemeyer 1996) og føre til hyperkapnia og acidose (reduisert pH i blodet).

En har ikke artsspesifikk kunnskap om vannkvalitetstoleranse for rognkjeks og grenseverdier, men hos laks er det kjent at oksygenmetning på 140 - 150 % i landbaserte anlegg med ferskvann kan gi redusert tilvekst, økt dødelighet og senere redusert sykdomsmotstand i sjø. I ferskvann har det også vært observert redusert respirasjonsfrekvens og akkumulering av CO<sub>2</sub> i blod som følge av hyperoksygenering (oppsummert i Terjesen m.fl. 2013). For transport av laks anbefales det et oksygenivå på 100 % metning (Rosten og Kristensen 2011). Tilsvarende nivåer bør praktiseres under transport av rognkjeks inntil en får mer kunnskap på oksygentoleranse.

Tabell 2. Miljøforhold under de 15 kommersielle transportene fulgt opp i prosjektet.

Miljø under primærtransport:	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15
TAN (µg N/L) slutt		2500	1500		1900	4700	2900	1250	530	1530	530		194		
Fritt NH <sub>3</sub> (µg N/L)		2,06	3,18		1,29	4,79	12,44	3,14	1,62	3,28	1,74		3,04		
CO <sub>2</sub> (mg CO <sub>2</sub> /L) slutt		29	11		23	15	9	8	7	12	7		5		
TOC slutt		5,2	3,6		7,0										
Turbiditet slutt (FNU)			0,61			<0,3	2,2	1,3	0,49	1,5	0,48		<0,30		
O <sub>2</sub> -start (%)	109	120	90	120	130	105	-	100	-	85	-	-	78	100	90
O <sub>2</sub> -slutt (%)	106	120	100	115	109	105	117	105	107	104	100	-	86	105	115
pH start	7,89	7,32	7,49		7,42	7,5									
pH slutt	7,24	6,93	7,43		7,06	7,2	7,72	7,41	7,55	7,3	7,54	7,2	8	7,11	6,71
temp °C start	9,9	10,6	9,6	8,9	8,1	5,5	7,3	7,6	7,6	7,6	7,3	8	7,4	10,5	9
temp °C slutt	9,9	9,5	6,9	9	3,3	4,4	7,4	9,6	11,2	10,8	9,2	7,9	15,9	10,5	11,9
Miljø under sekundærtransport:	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15
temp °C	8,5					5,6	7,2	12,3	13	10,8	11,4	14,5		12,2	11,9
O <sub>2</sub> start (%)						97	150	103	97	104	45	87		90	
O <sub>2</sub> slutt (%)															
pH i transportkar						8,19	7,54	7,91	7,55	7,3	7,54	7,89		6,48	8
TAN (µg N/L) slutt								341	160	400	340				
Fritt ammoniakk (NH <sub>3</sub> )								4,01	0,83	1,16	1,72				
CO <sub>2</sub> (mg CO <sub>2</sub> /L) slutt								0,68	0,69	1	2,3				
Turbiditet slutt (FNU)								0,53	0,41	<0,30	0,68				
temp °C merd ved utsett	8,5	8	5,9	8,3	6,6		6,4	13,8	-	11,6	12	12	15	13,1	13
O <sub>2</sub> -merd (%)				88,3	91		116	103		105		106	92	95	89
Dødelighet etter utsett i sjø per 30 dager	1,6 %	10 %	12 %	10 %	5 %	-	-	-	21 %	18 %	-	"høy"	3 %	2 %	-

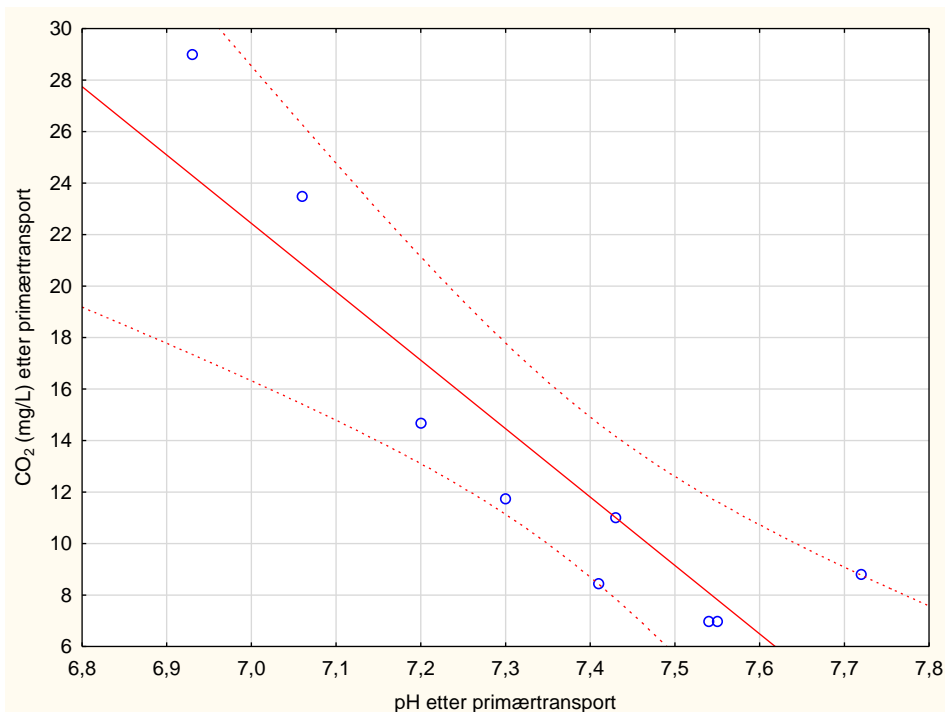
### 3.2.3 Karbondioksid og pH

Forholdet mellom oksygenopptak og utskillelse av CO<sub>2</sub> er omtrent i forholdet 1:1. CO<sub>2</sub> vil derfor fort bli den mest kritiske faktoren under lukket transport, men kan stabiliseres ved effektiv utlufting av vannet.

Høye verdier av CO<sub>2</sub> vil påvirke vekst, syre-basen likevekten, ione-reguleringen hos fisk, gi nyreskader, og redusert oksygenbindingsevnen i hemoglobin. Svært høy CO<sub>2</sub> kan føre til fiskedød og giftigheten av CO<sub>2</sub> antas å være større ved lavere oksygenmetning (Wedemeyer 1997). Laksefisk synes mer sensitiv for CO<sub>2</sub> ved lave temperaturer enn ved høye (Fivelstad m. fl. 2007).

I feltundersøkelsen ble fritt CO<sub>2</sub> målt fra vannprøver på slutten av 9 primærtransporter og varierte fra 5 til 29 mg/L. Det var ingen sammenheng mellom CO<sub>2</sub> og transporttid (lineær regresjon,  $r^2 = 0,0061$ ,  $p = 0,85$ ), fiskebiomasse (lineær regresjon,  $r^2 = 0,1118$ ,  $p = 0,42$ ), eller temperatur (lineær regresjon,  $r^2 = 0,0087$ ,  $p = 0,853$ ), men det ble som forventet observert en klart avtakende CO<sub>2</sub>-konsentrasjon med økende pH (lineær regresjon,  $r^2 = 0,7911$ ,  $p < 0,01$ , Figur 1). Årsaken til denne sammenhengen er at CO<sub>2</sub> oppløst i vann er i likevekt med karbonsyre (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) slik at økende konsentrasjon av CO<sub>2</sub> fører til surere vann (reduisert pH). Ved pH 7,1 var konsentrasjonen av CO<sub>2</sub> 20 mg/L. Anbefalte grenseverdier for CO<sub>2</sub> ligger generelt i størrelsesorden 20 mg/L (Portz m. fl. 2006) til 10 mg/L (Fivelstad, m. fl. 1999). Det er grunn til å tro at toleransen for CO<sub>2</sub> avhenger av øvrig vannkvalitet.

Høyest målt CO<sub>2</sub> var i transport T2 som gikk over 14 timer og endte opp med en konsentrasjon på 29 mg/L og pH på 6,93. Årsaken til høy CO<sub>2</sub> og lav pH er sannsynligvis utilstrekkelig lufting av transportvannet.



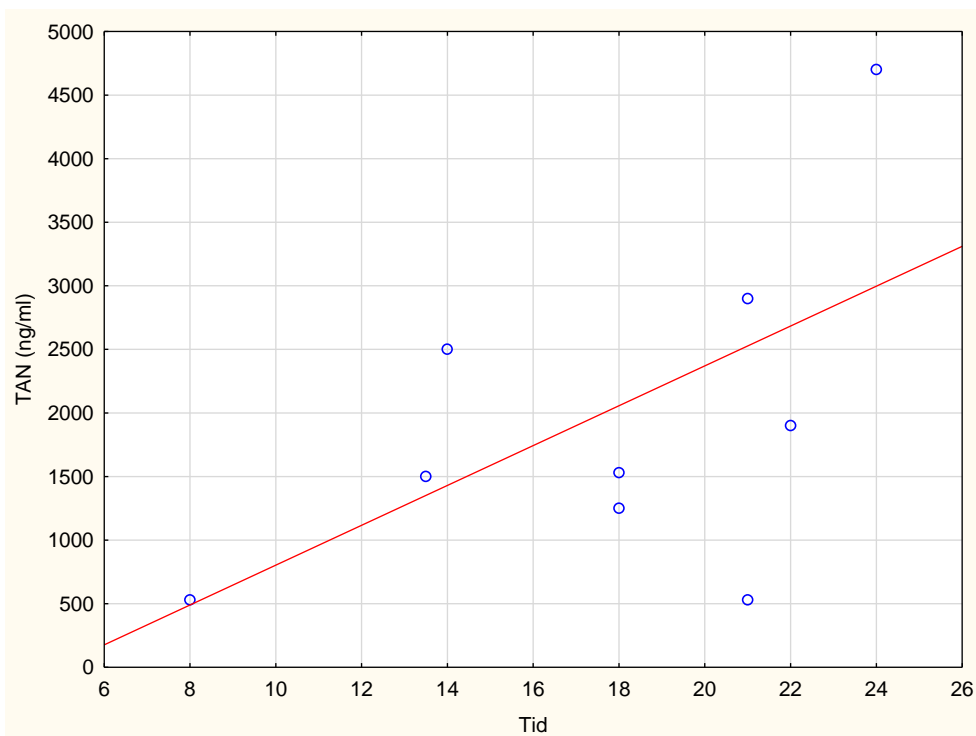
Figur 1. Sammenheng mellom pH og konsentrasjonen av fritt karbondioksid (CO<sub>2</sub>) registrert fra 9 lukkede transportere av rognkjeks med oksygenering og lufting. Stiplet linje indikerer 95% konfidensintervall (lineær regresjon,  $r^2 = 0,7911$ ,  $p < 0,01$ ).

### 3.2.4 Ammoniakk (TAN)

Fisk har vanskelig for å kvitte seg med ammoniakk i sjøvann når konsentrasjonen i vannet er høy. Fritt uionisert ammoniakk ( $\text{NH}_3$ ) er den mest giftige formen av ammoniakk og gir blant annet skader på gjellene og osmoregulatoriske forstyrrelser. For laks er anbefalt maksimalverdier i oppdrett 12-25  $\mu\text{g/L}$  fritt ammoniakk under langtidseksponering (i oppdrett), men toleransen varierer bl.a. mellom arter og med livsstadium og vannkvalitet (referert i Terjesen m. fl. 2013). Toleransen for rognkjeks er ikke kjent.

I feltundersøkelsen så man generelt en akkumulering av TAN med økende transporttid (Tabell 2), selv om denne sammenhengen, sannsynligvis på grunn få datapunkter og støy (andre faktorer som spilte inn), ikke var statistisk signifikant (lineær regresjon,  $r^2 = 0,3324$ ,  $p = 0,13$ , Figur 2).

Samtidig med økt TAN var det en reduksjon i pH som reduserte andelen giftig fritt ammoniakk ( $\text{NH}_3$ , Tabell 2). Høyeste konsentrasjon av  $\text{NH}_3$  ble kalkulert til 12,44  $\text{ng/ml}$  (T8), som ligger rundt grenseverdiene gitt for laks i oppdrett.



Figur 2. Akkumulering av TAN over tid registrert fra 9 lukkede transporter av rognkjeks med oksygenering og lufting (lineær regresjon,  $r^2 = 0,3324$ ,  $p = 0,13$ ).

### 3.2.5 Totalt organisk karbon (TOC)

Det ble i noen transporter målt TOC (total organisk karbon) eller turbiditet (uklarheten i vannet) for å vurdere belastningen av organisk eller finpartikulært materiale (Tabell 2) som i lukkede transporter gjerne stammer fra fiskeavføring og slim. Dette kan føre til tilklogging av gjellene og kan tenkes å gi økte problemer med oksygenopptak, osmoregulering og gjelleinfeksjoner. Verdiene for begge disse parameterne (TOC og turbiditet) var lave (Tabell 2).

En har ikke kunnskap om toleransegrenser for TOC på rognkjeks, men generelt der en observerer slim- og skumdannelse i kar etter transport vil en anbefale å følge spesielt med på gjellhelse både ved mottakskontroll og ved seinere oppfølging i sjø.

### **3.3 Effekter av håndtering og transport**

#### **3.3.1 Stressadferd**

I motsetning til laks inntar rognkjeks en trykkeposisjon når den stresses hvor den suger seg fast til et substrat og ser ut til å "fryse" all bevegelse. Dette er en utfordring i forhold til håndtering (sortering osv.) og flytting av rognkjeks. Adferden minner om trykkeadferden som ikke er uvanlig å observere hos annen bunnlevende fisk som f. eks. piggvar og flyndrearter. Hos piggvar skjer det i tillegg en kraftig nedregulert hjerterytme når den trykker (pers. med. Prof. Per E. Enger, UiO).

Den adferdsmessige responsen på stress hos rognkjeks gjør det vanskelig å skille stress fra en hvileadferd uten at en tyr til fysiologiske analyser av fisken. Det gjør det lett å overs eller feiltolke stressrespons og stressorer, og en risikerer at en aksepterer metoder og miljøbetingelser som ikke burde vært akseptert med hensyn på fiskevelferd.

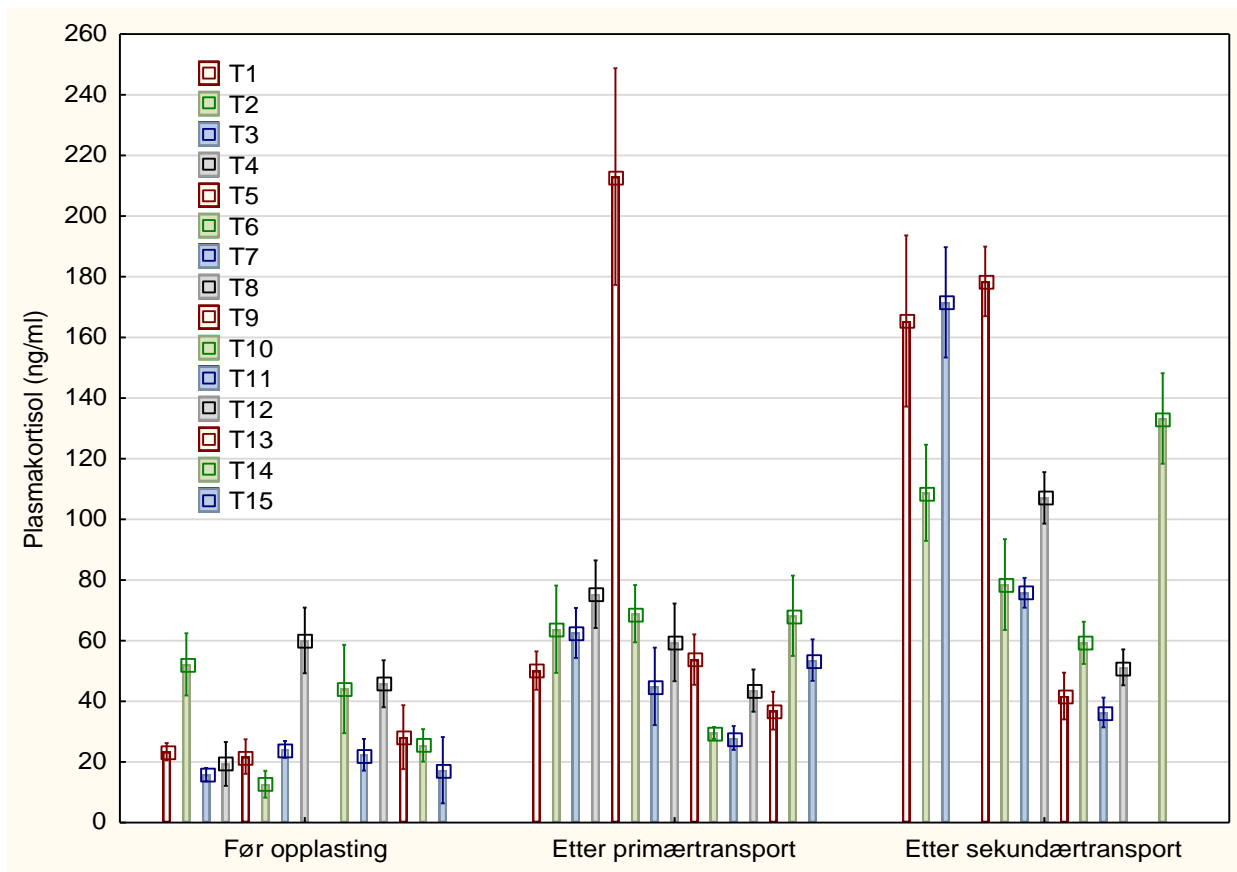
En er derfor avhengig av god kjennskap til rognkjeksens spesielle adferdsmønster for å sikre god fiskevelferd, og på dette området kan en i liten grad benytte erfaringer fra laks.

#### **3.3.2 Primær stressrespons**

Endringer i plasmakortisol ble brukt som kvantitativt mål på fiskens primære stressresponsen på ulike miljøendringer og håndtering. Effekten av den primære stressresponsen er bl.a. mobilisering av energireserver, endringer i immunfunksjonen og økt permeabilitet i cellemembraner som påvirker osmoreguleringen.

Det var stor variasjon i transportforholdene i de 15 undersøkte transportene (Tabell 1), bl.a. i forhold til fiskestørrelse, transporttid, fisketetthet og håndtering, og er sannsynligvis hovedgrunnen til varierende utslag i stressrespons mellom gruppene målt som endringer i plasmakortisol (Figur 3).

Miljøet i lukket transporten spiller også en rolle siden vannkvaliteten (pH, CO<sub>2</sub>, TAN, TOC) generelt forverrer seg med tiden. Spesielt store miljøendringer kan være med å forklare den spesielt høye toppen i plasmakortisol registrert for transport T5 etter primærtransporten (Figur 3), hvor pH falt fra 7,42 til 7,06 og temperaturen falt fra 8,1 til 3,3 °C.

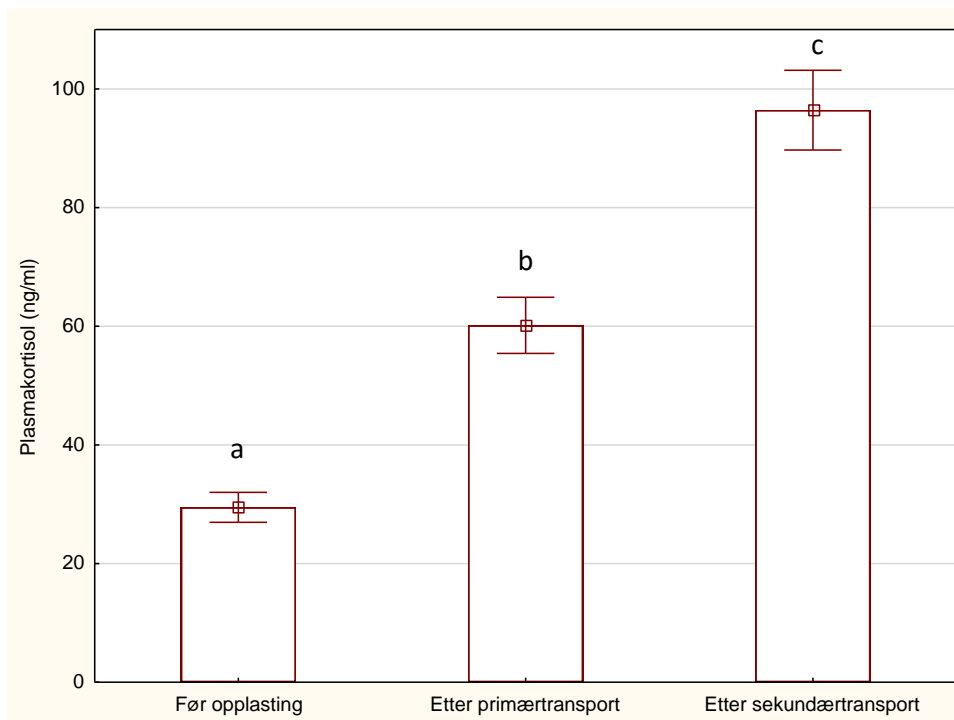


Figur 3. Variasjon i plasmakortisol (ng/ml) hos rognkjeks gjennom tre faser av transporten. Søyler med samme farge representerer fisk fra samme transport. Totalt 15 kommersielle transportere (T1-T15). Vertikale linjer på søylene indikerer standard feil ( $\pm$ SEM).

Generelt var det en økning i stress (plasmakortisol) utover i transportforløpet (Figur 4) hvor man etter sekundærtransporten endte opp med en tredobling i plasmakortisol sammenlignet med nivåene før transport.

Det er kjent at stress bygger seg opp når fiske utsettes for gjentatte stressorer innenfor en begrenset tidsperiode. En får akkumulert stress slik at den totale stressresponsen (økt plasmakortisol) blir større enn hver enkelt stressor skulle tilsi (kumulativt stress). Slik opphopning av stress kan unngås dersom fisken får tid til å stresse ned mellom hver stressor. Uten tid til å stresse ned kan neste stressor som ikke er dødelige når den opptrer som enkelttilfeller vise seg å bli dødelig (Finstad m.fl. 2003; Iversen & Eliassen 2009; Iversen & Eliassen 2012; Wendelaar Bonga 1997).

En har et klart potensiale for denne risikoen når rognkjeks overføres til merd hvor den igjen møter nye miljøendringer som sannsynligvis vil utgjøre en ytterligere stressfaktor. Om fisken klarer å respondere på dette tilleggs-stresset og etter hvert gjenopprette fysiologisk likevekt (homeostase) avhenger av om fisken har ytterligere evne til å respondere og kompensere (har mer å gå på i forhold til å regulere inn den fysiologiske ubalansen). Klarer den ikke det (utvikler kronisk stress som endrer fiskens fysiologiske likevekt), vil den til slutt dø. Det rapporteres i noen tilfeller høy dødelighet hos rognkjeks etter utsett, men det er komplisert å følge den opp etter utsett i sjø for å undersøke om dette er knyttet til kronisk stress bygd opp under transport eller har andre årsaker.



Figur 4. Gjennomsnittlig konsentrasjon av plasmakortisol (ng/ml) for 15 grupper av rognkjeks à 6 fisk per gruppe og prøvetidspunkt gjennom tre faser av transporten. Vertikale linjer på søylene indikerer standard feil ( $\pm$ SEM). Forskjellige bokstaver indikere signifikante forskjeller mellom transportstadiene (en-veis ANOVA,  $p < 0,05$ ).

### 3.3.3 Sekundære stressresponser

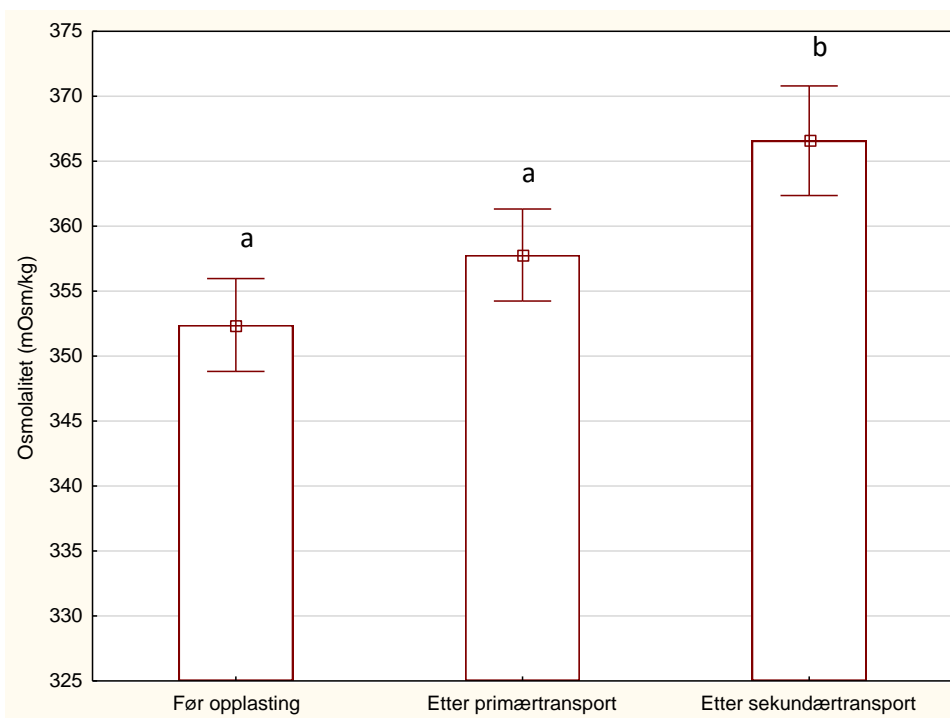
#### Osmolalitet:

Osmolaliteten gir et bilde på hvordan fiskens saltbalanse påvirkes og angir mengden løste partikler per kg væske målt som mOsm per kg. Salinitet og osmolalitet er blant de viktigste miljøfaktorene for fisk, og gjennom aktiv regulering av vann og saltioner via bl.a. nyrer, tarm og gjeller holder fisk i sjøvann generelt osmolaliteten i blodet på rundt 330-340 mOsm per kg (McCormick & Saunders 1987).

En av de primære fysiologiske rollene til kortisol er reguleringen av hydromineral balanse og energiomsetningen i blodet. Endringer i bl.a. plasma-osmolalitet er derfor ofte trekk i en sekundær stressrespons (Veiseth et al. 2006). Kraftige stressreaksjoner vil generelt redusere kapasiteten for osmoregulering og en får økt osmolalitet hos fisk i sjøvann (dehydrering).

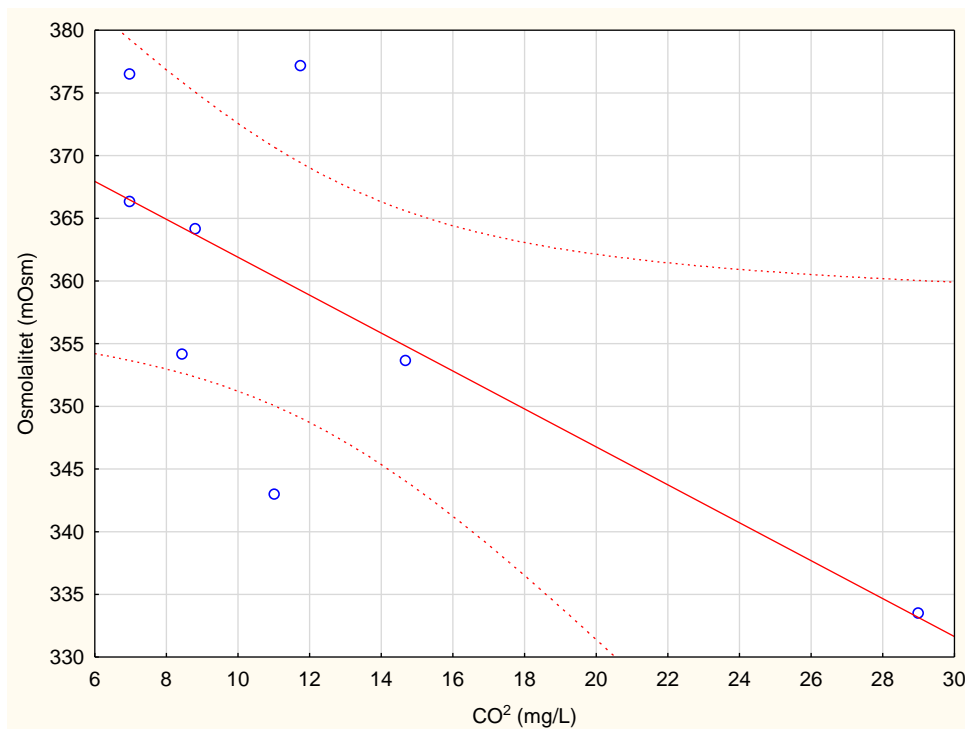
Analyser av sammenslåtte data fra alle de 15 undersøkte transportene viste at osmolalitet på samme måte som plasmakortisol økte utover i transportforløpet, med en signifikant høyere osmolalitet etter sekundærtransport sammenlignet med før opplasting og etter primærtransporten (en-veis ANOVA,  $p < 0,05$ , Figur 5). I tillegg var det etter noen transporter observert fisk med sår og finneslitasje som vil være spesielt utsatt for osmotisk stress.

Dette betyr at rognkjeksene ved overføring til merd er utsatt for osmotisk stress som må kompenseres skal fisken kunne overleve. Osmotisk stress over lengre tid vil forårsake dødelighet (McCormick & Saunders 1987). En har ikke data fra sjø for å følge opp utviklingen i osmotisk stress.



Figur 5. Gjennomsnittlig konsentrasjon av osmolalitet (mOsm/kg H<sub>2</sub>O) for 15 grupper av rognkjeks a 6 fisk per gruppe og prøvetidspunkt gjennom tre faser av transporten. Vertikale linjer på søylene indikerer standard feil ( $\pm$ SEM). Forskjellige bokstaver indikere signifikante forskjeller mellom transportstadiene (en-veis ANOVA,  $p < 0,05$ ).

Det var ingen sammenheng mellom vannkvalitet (TAN, fritt CO<sub>2</sub>, pH) og plasmakortisol eller vannkvalitet og osmolalitet, bortsett fra for CO<sub>2</sub> som viste en signifikant lineær relasjon til osmolalitet ( $r^2 = 0,5962$ ,  $p < 0,05$ , Figur 6). Datagrunnlaget er begrenset og med relativt stor påvirkning fra transport T2 med høy CO<sub>2</sub>, men det antyder at høy CO<sub>2</sub> under transport kan påvirke fiskens osmoreguleringsevne.



Figur 6. Det var en lineær sammenheng mellom osmolalitet og  $CO_2$  ( $r^2 = 0,5962$ ,  $p < 0,05$ ). Stiplet linje viser 95% konfidensintervall.

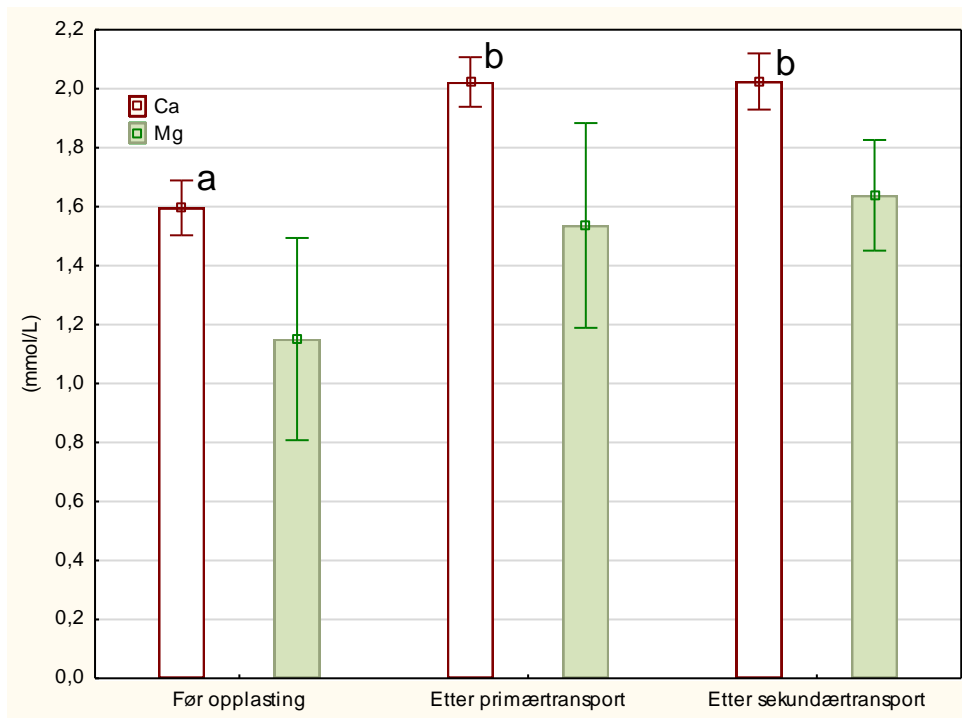
#### Divalente plasmaioner ( $Mg^{2+}$ og $Ca^{2+}$ ):

På samme måte som osmolalitet gir endringer i magnesium ioner ( $Mg^{2+}$ ) og kalsium ioner ( $Ca^{2+}$ ) i blodplasma et bilde på osmotisk stress, og er påvirket av økt permeabilitet i gjelleepitelet ved økt nivå av kortisol (Arends m.fl. 1999). Kompensering av dette skjer ved utskillelse av divalente ioner over nyrene.

Det var en klar økning i både  $Mg^{2+}$  og  $Ca^{2+}$  etter både primær- og sekundærtransporten sammenlignet med nivåene før opplasting til primærtransport (Figur 7), men denne økningen var signifikant kun for  $Ca^{2+}$  (en-veis ANOVA,  $p < 0,05$ ). Dataene indikerer en sekundær stressrespons hos rognkjeks etter transport hvor ionebalansen forstyrres.

En vet ikke hva som er normalverdier for rognkjeks, men beinfisk vil vanligvis regulere  $Mg^{2+}$  til under 2 mM, og verdier under 1 er ikke uvanlig. Hos laks har forhøyet konsentrasjon av  $Mg^{2+}$  før utsett i sjø vært koplet til både stress og forhøyet dødelighet etter utsett (Iversen & Eliassen 2009, 2013). Økt stress under simulert transport av torsk ved høy tetthet ga økt konsentrasjon av  $Mg^{2+}$  sammenlignet med ustresset gruppe (Staurnes m.fl. 1994).





Figur 7. Utvikling i bivalente ioner ( $Ca^{2+}$  og  $Mg^{2+}$ ) hos rognkjeks utover i transportforløpet. Forskjellige bokstaver indikere signifikante forskjeller mellom transportstadiene (en-veis ANOVA,  $p < 0,05$ ). Vertikale linjer på søylene indikerer standard feil ( $\pm SEM$ ).

### Plasma-pH:

Gjennomsnittlig plasma-pH registrert i de 15 kommersielle transportene økte dramatisk fra relativt normale hvilenivåer (ca. 7,5) før opplasting til svært høy pH etter både primær- og sekundærtransporten (ca. 8,1). Til sammenligning ble det i simulerte transportforsøk (Del II i denne rapporten) vist en økning i pH fra 7,58 til 7,8 etter 8 timer transport. Forskjellen mellom dataen fra felt og i forsøk kan være at transporttiden var lengre og  $CO_2$ -konsentrasjonen i transportvannet generelt høyere i de kommersielle transportene.

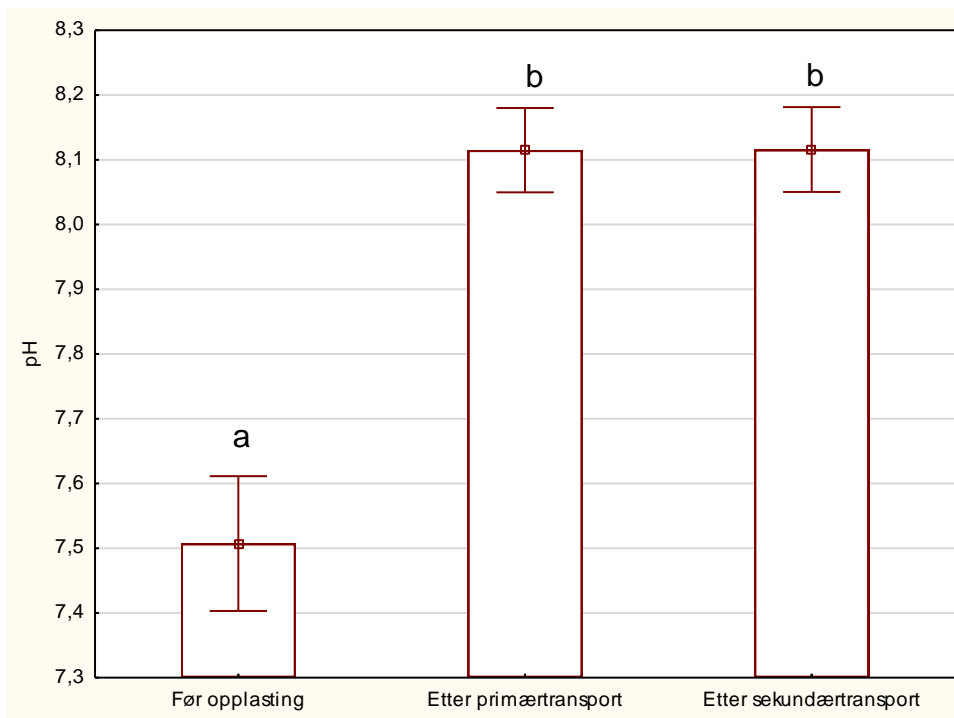
En potensiell negativ effekt av denne pH-økningen er at giftigheten av TAN øker med økende pH (andelen giftig fritt ammoniakk øker), dvs. økt plasma pH gir økt følsomhet for ammoniakk.

Laks vil ved kraftig stress og utmattelse få redusert pH, sannsynligvis påvirket av økt  $CO_2$  i blodet. Tilsvarende vil skje ved hyperoksi der respirasjonsraten går ned og  $CO_2$  akkumuleres i blodet. Det var ikke observert store overmetninger av oksygen under transport som kan forklare dette.

En mulig forklaring på økningen i pH kan være at rognkjeks kompensere for en initiell reduksjon i plasma-pH som respons på økt  $CO_2$  i transportvannet. Alternativt, dersom redusert respirasjonsrate er en del av rognkjeksens "trykke-respons" ved stress vil dette kunne føre til akkumulering av  $CO_2$  i blodet (pga. redusert utlufting over gjellene) som fisken er avhengig av å kompensere på en effektiv måte.

En slik situasjon vil vanligvis kompenseres med økt opptak av bikarbonat ( $HCO_3^-$ ) som bufrer blodet. Den høyere pH vil da medføre økt fysisk oppløst  $CO_2$  (forskyvning av likevekten mellom karbondioksid og karbonsyre) som kan diffundere ut via gjellene. Slik bufring skjer ofte til forhøyet pH nivå i forhold til normal pH, og pH kan være forhøyet så lenge fisken er eksponert for forholdet (Wood & Jackson 1980).

En annen løs hypotese, dersom en ser den høye plasma-pH i sammenheng med den økte osmolariteten, er at bikarbonat ( $\text{HCO}^{3-}$ ) er viktig osmolytt hos rognkjeks, og at pH påvirkes gjennom osmoreguleringen.



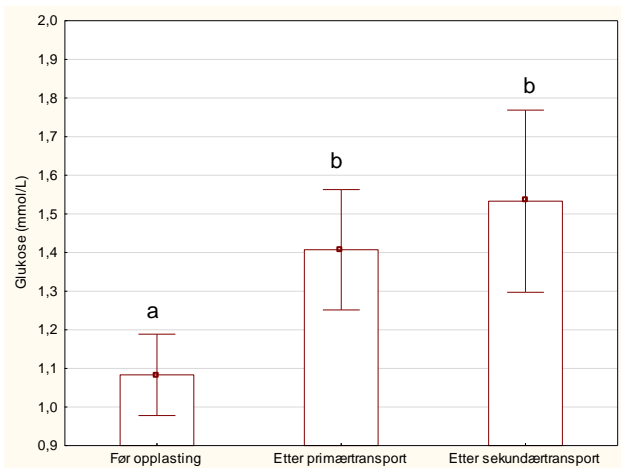
Figur 8. Utvikling i plasma-pH hos rognkjeks utover i transportforløpet. Forskjellige bokstaver indikere signifikante forskjeller mellom transportstadiene (en-veis ANOVA,  $p < 0,01$ ). Vertikale linjer på søylene indikerer standard feil ( $\pm\text{SEM}$ ).

#### Glukose og laktat:

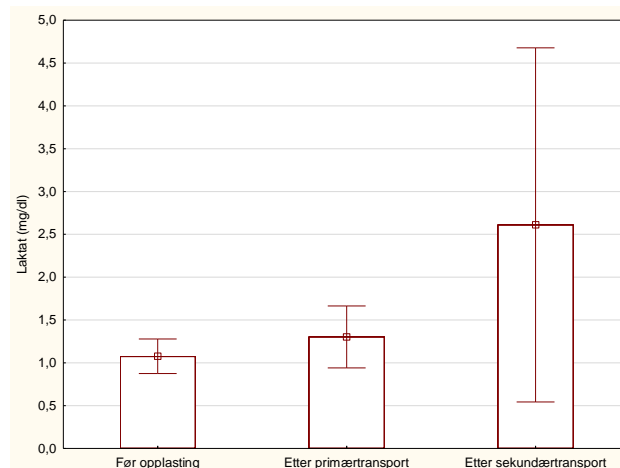
Det var et signifikant forhøyet glukosenivå etter både primær- og sekundærtransporten sammenlignet med nivået før opplasting til primærtransport (en-veis ANOVA,  $p < 0,05$ , Figur 9), mens laktat viste en liten, men usikker tendens til økning etter sekundærtransporten (Figur 10). Generelt ligger både glukose- og laktatnivåene for rognkjeks i denne undersøkelsen lavt sammenlignet med en rekke andre fiskearter utsatt for forskjellige typer stress (oversikt gitt i Espmark m.fl. 2012).

Energimobilisering er en viktig sekundær stressrespons og fører til økt glukosenivå i blodet. Det observeres ikke alltid en klar sammenheng mellom stressnivå (kortisol) og glukosekonsentrasjonen, men dette kan ha med variasjon i metabolismen eller forbrenningsraten av glukose (Mommesen m.fl. 1999) som kan variere med f. eks den adferdsmessige responsen på stress (svømmeaktivitet o.l.).

Glukose er et uttrykk for lengre vedvarende aerob muskelaktivitet. Hos laks har høye glukoseverdier vanligvis opprinnelse i lengre tids forhøyet aktivitet og stress. Tilsvarende kan en økning i glukoseverdiene hos rognkjeks under transport forklares med en økning i svømmeaktiviteten eller annen type muskelaktivitet.



Figur 9. Utvikling i glukose hos rognkjeks utover i transportforløpet. Forskjellige bokstaver indikere signifikante forskjeller mellom transportstadiene (en-veis ANOVA,  $p < 0,05$ ). Vertikale linjer på søylene indikerer standard feil ( $\pm SEM$ ).

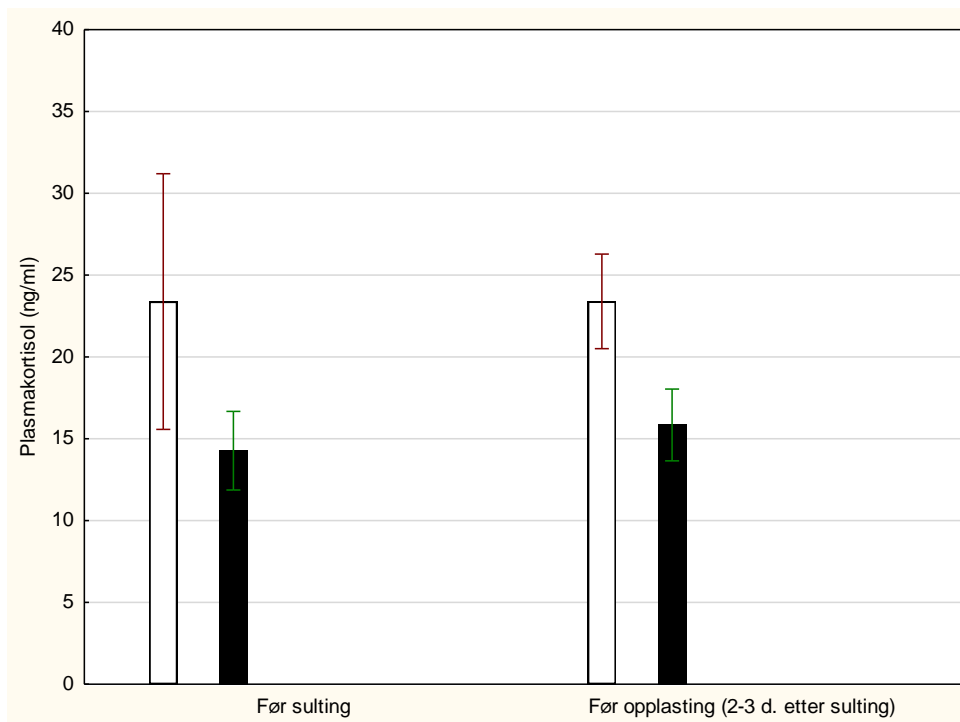


Figur 10. Utvikling i laktat hos rognkjeks utover i transportforløpet. Vertikale linjer på søylene indikerer standard feil ( $\pm SEM$ ).

### 3.3.4 Forberedelse og opplasting

#### Sulting:

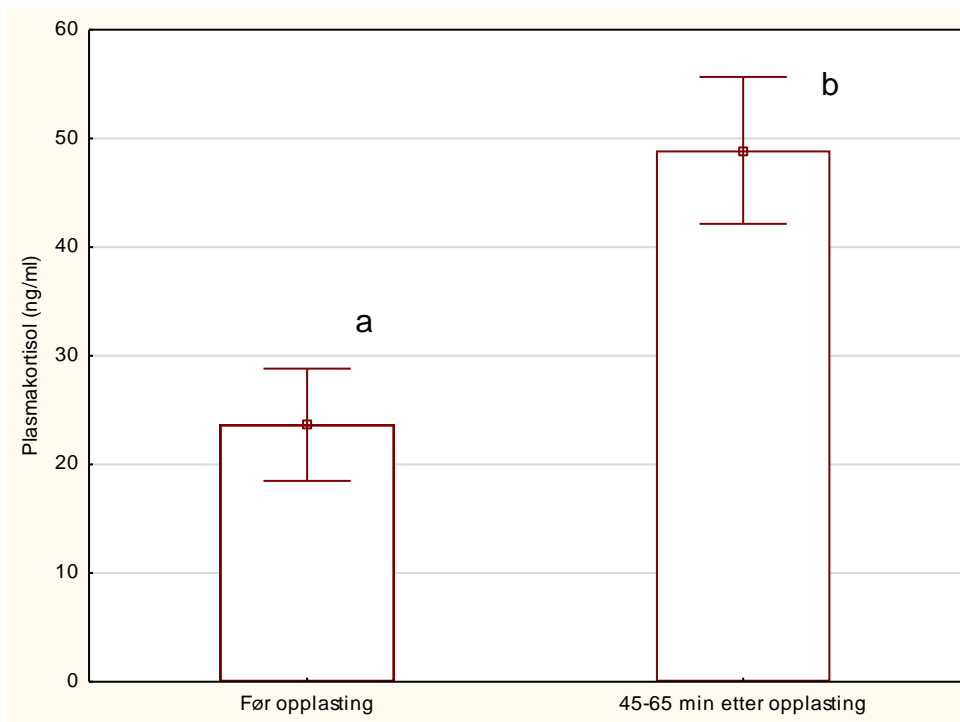
Det er vanlig å sulte fisk før transport for å redusere miljøbelastningen fra avføring i transportkaret, i tillegg til at metabolismen og dermed utskillelsen av ammoniakk nedreguleres. Det er et vanlig problem med aggresjonen og finnebiting på sulten fisk, men dette kan reduseres ved å holde den i mørke i perioden den ikke fôres. For transport T1 og T3 ble plasmakortisol målt før sulting og henholdsvis 2 og 3 dager etter sulting i mørke ved ca. 8 °C uten at det påvirket stressnivået (to-veis ANOVA,  $p < 0,01$ , Figur 11).



Figur 11. Gjennomsnittlig konsentrasjon av plasmakortisol (ng/ml) for 2 grupper av rognkjeks ( $n=6$ ) før og etter sulting. Hvit søyle = gruppe T1, 2 dager sulting, sort søyle = gruppe T3, 3 dager sulting. Vertikale linjer på søylene indikerer standard feil ( $\pm$ SEM). Det var ingen økning i plasmakortisol etter sultperioden for noen av gruppene (en-veis ANOVA,  $p > 0,05$ ).

#### Trenging og pumping:

Overføring av rognkjeks fra leveringskar til transportkar på bil skjedde ved bruk av fiskepumpe via fisketeller. Måling av kortisol for T13, T14 og T15 før opplasting og ca. 30-45 minutter etter opplasting viste at denne prosedyren medførte en dobling av plasmakortisol fra gjennomsnittlig 24 ( $\pm$  22) til 49 ( $\pm$  29) ng/ml (to-veis ANOVA,  $p < 0,01$ ). Dette indikerer at selve opplastingen utgjør en stor del av stresset akkumulert i primærtransporten.



Figur 12. Gjennomsnittlig konsentrasjon av plasmakortisol (ng/ml) for 3 grupper (T13, T14 og T15) av rognkjeks ( $n=18$ ) før og etter opplasting i transportkar på bil. Forskjellige bokstaver indikere signifikante forskjeller mellom transportstadiene (en-veis ANOVA,  $p < 0,01$ ). Vertikale linjer på søylene indikerer standard feil ( $\pm SEM$ ).

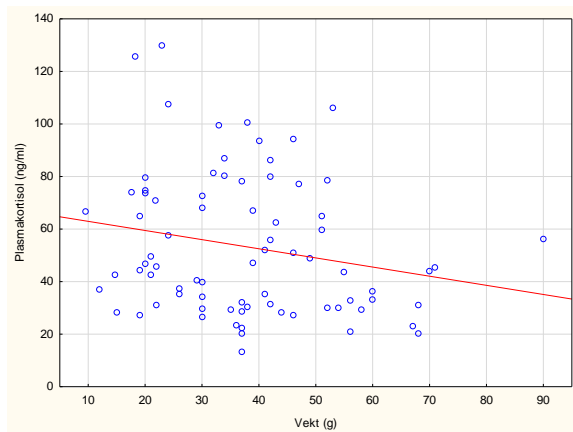
#### Betydning av fiskestørrelse:

Innenfor størrelsesintervallet for den transporterte fisken i denne undersøkelsen (ca. 20-60 g) var det en klar, men ikke signifikant tendens til høyere plasmakortisol målt etter primærtransporten for liten enn for stor fisk (lineær regresjon,  $r^2 = 0,0442$ ,  $p = 0,065$ ) som antyder at stor rognkjeks tålte transportstress bedre enn liten fisk (Figur 13).

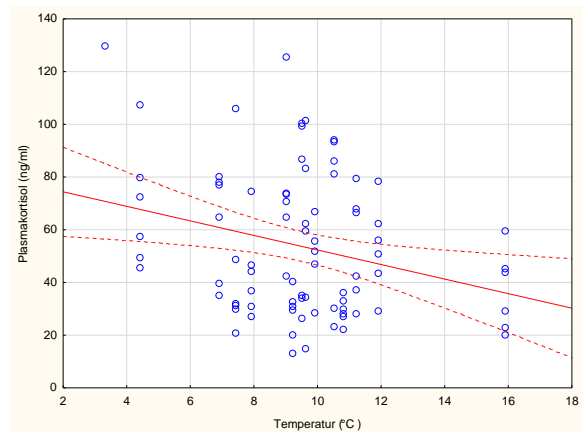
Generelt har stor fisk større toleranse for transportstress og dårlig vannkvalitet enn liten fisk (Rosten m.fl. 2004).

#### Betydningen av temperatur:

Transporttemperaturen varierte fra 3,3 til 15,9 °C mellom de 15 undersøkte transportene (Tabell 2), og den reduserte konsentrasjonen av plasmakortisol med økende temperatur tyder på at toleransen for transportstress økte med økende temperatur innenfor dette temperaturintervallet (lineær regresjon,  $p < 0,05$ , Figur 14).



Figur 13. Størrelsesrelatert stressrespons målt som plasmakortisol hos rognkjeks under primærtransport ( $n = 78$ ,  $r^2 = 0,0442$ ,  $p < 0,065$ ).



Figur 14. Temperaturrelatert stressrespons målt som plasmakortisol hos rognkjeks under primærtransport ( $n = 78$ ,  $r^2 = 0,0751$ ,  $p < 0,05$ ). Stiplet linje indikerer 95% konfidensintervall.

Rognkjeksene så også ut til å tåle brå overganger fra lav til høy temperatur, som var tilfelle ved omlasting av T12 direkte fra 7,9 °C til 14,5 °C og for direktetransporten med liten brønnbåt (T13) hvor fisken ble overført fra yngelanlegg på 7,4 °C direkte til 14,8 °C i brønnbåt (Figur 3).

Motsatt var det for transporten T5 som gikk over 22 timer midtvinters. Den startet på 8,1 °C og endte opp på 3,3 °C og en plasmakortisol etter primærtransporten som var tre ganger høyere enn alle andre transportert (Figur 3). Dette gir en indikasjon på at slike endringer fra høy til lav temperatur kan gi betydelig økning stress for rognkjeks, noe som er spesielt relevant for lange transportert vinterstid og ved utsett på lave sjøtemperaturer.

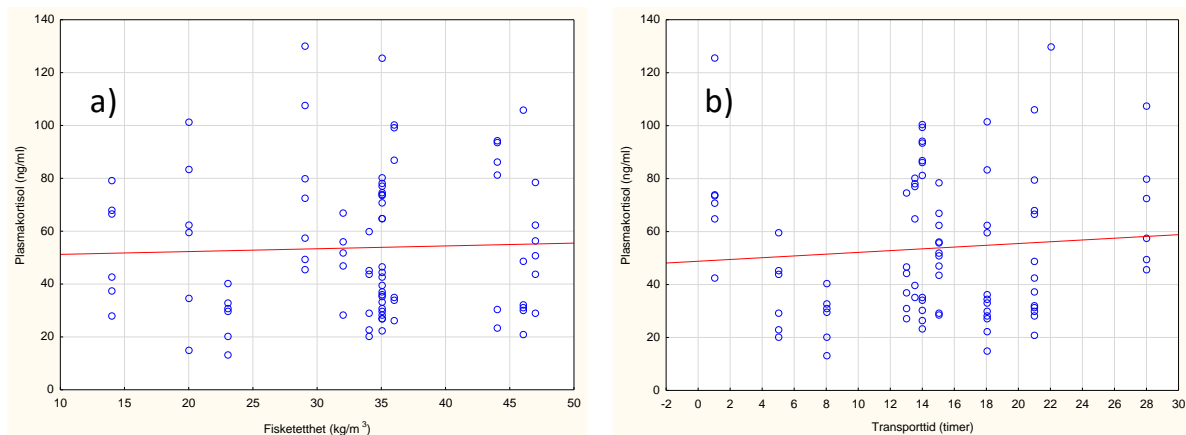
Temperatur spiller inn på transporttiden både gjennom påvirkning av metabolismen og toleransen for ammoniakk. Metabolismen og utskillelsen av TAN øker med økende temperatur, samtidig som giftigheten av ammoniakk på fisk er høyere ved lav temperatur enn ved høy. Generelt har en tryggere marginer for transport ved lav temperatur enn ved høy (innenfor fiskens toleransegrenser for temperatur) fordi fisken da skiller ut mindre ammoniakk, men vær også obs på at toleransen for ammoniakk reduseres med redusert temperatur.

Det kan oppstå sesongavhengige situasjoner under transport der en enten får uønskede høye temperaturer sommerstid som er problematiske i forhold til akkumulering av ammoniakk, og tilsvarende om vinteren med lave temperaturer der toleransen for ammoniakk reduseres. En stor del av temperaturvariasjonen mellom de 15 undersøkte transportene er sannsynligvis knyttet til sesongvariasjoner, spesielt de lengre transportene og transportene i brønnbåt

### Betydningen av fisketetthet:

Økt fisketetthet innenfor de relativt konservative tetthetsbegrensingene som ble praktisert under primærtransportene ( $14\text{--}47\text{ kg/m}^3$ ) ga ikke noen økning i stressnivået (lineær regresjon, Figur 15a). Heller ikke økt transporttid fra 1 til 28 timer påvirket stressrespons målt ved transportslutt (lineær regresjon, Figur 15b).

Oppfølgingen av de 15 kommersielle transporter av rognkjeks tyder på at det er etablert en praksis for transport av rognkjeks på  $20\text{--}60\text{ g}$  ved tettheter fra  $30\text{--}50\text{ kg/m}^3$  på inntil 20 timer (og i noen tilfeller mer) hvor vannkvaliteten under transport og stressresponsen på fisken ser ut til å være akseptabel og på linje med det som er vist i kontrollerte forsøk med rognkjeks hvor en så endring (forverring) i vannkvalitet med økende biomassetetthet og varighet av transporten, men dette så ikke ut til å påvirke fiskens fysiologiske tilstand negativt.



Figur 15. A) Tetthetsrelatert stressrespons målt som plasmakortisol hos rognkjeks under primærtransport ( $n = 78$ ,  $r^2 = 0,0013$ ,  $p =$  ikke signifikant). B) Sammenheng mellom stressrespons målt som plasmakortisol og transporttid (primærtransport) hos rognkjeks under primærtransport ( $n = 78$ ,  $r^2 = 0,0069$ ,  $p =$  ikke signifikant).

### Omlasting og sekundærtransport fra bil til merd:

De fleste av transportene foregikk i to etapper, først på bil frem til kai hvor fisken ble omlastet til båt for videre transport ut til merd. Den ekstra håndteringen med omlasting etter primærtransporten samt forholdene under den korte sekundærtransporten ga additivt stress (Figur 3 og Figur 4). Spesielt kritisk er det at selve sekundærtransporten vanligvis var svært kort (Tabell 1) med begrenset tid til å nedregulere stressresponsen før ny håndtering for overføring til merd. Selve sekundærtransporten som vanligvis varte fra en halv til to timer skjedde også i flere tilfeller under betydelig høyere tetthet enn under primærtransporten (opptil  $83\text{ kg/m}^3$ ) og oksygenforholdene varierte mye (Tabell 1).

Risikomomenter knyttet til sekundærtransporten er den ekstra behandlingen fisken får ved omlasting samt den korte tiden for å roe seg ned (reduere stress) før ny håndtering ved overføring til merd. Det kumulativt stresset gir økt risiko for dødelighet etter utsett i sjø, og slimtap og sår påført under håndtering kan gi osmotsisk stress og innfallsport for infeksjoner.

Det er vist for laks at transporttid har stor betydning for nedregulering av stress etter håndtering, og to timer transport vært for lite (Iversen & Eliassen 2009). Er transporttiden for kort kan evnen til å takle ekstra stress ved utsett i merd bli redusert, og kan påvirke sykdomsresistens, sjøvannstoleranse, vekst og overlevelse etter utsett i sjø (oppsummert i Iversen 2013).

Ofte observerer en at metode og utrustningen under sekundærtransport av rognkjeks ikke er god nok til å ivareta god vannkvalitet og fiskevelferd, samt at fisketettheten kan bli høy. Dårlig vannkvalitet og stor fluktasjoner i vannkvalitet vil sannsynligvis forsterke stresset knyttet til sekundærtransporten.

#### Effekt av sedasjon med Aqui-S:

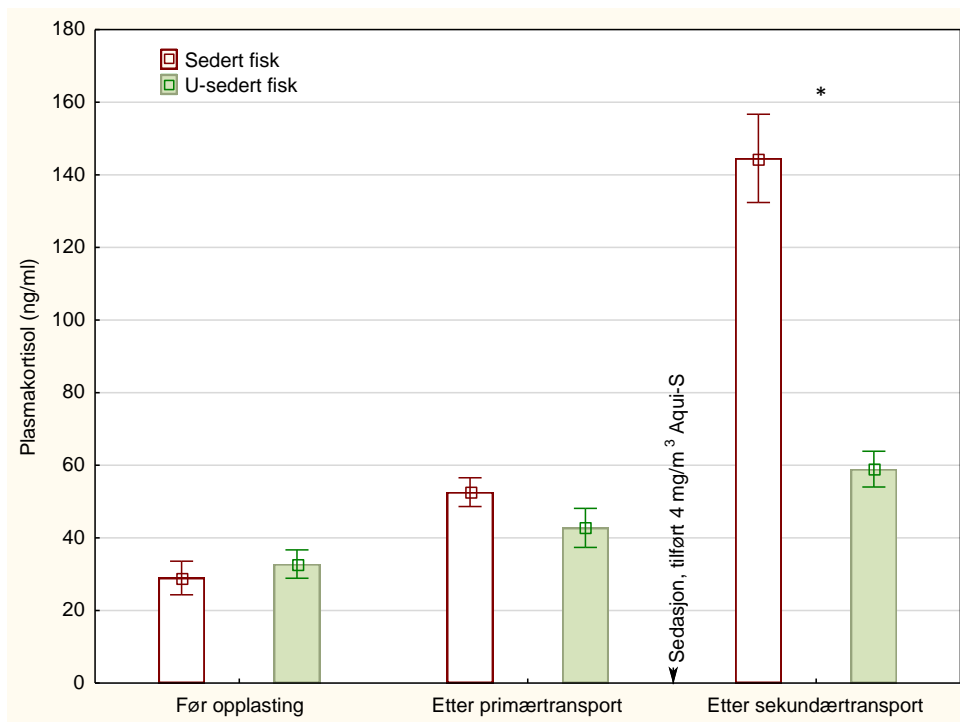
I forbindelse med noen av transportene ble det benyttet en svak dose med Aqui-S (4 mg/L, aktivt substans isoeugenol) for sedasjon for å unngå at rognkjeksene festet seg på karvegger og i transportslangen ved omlastingen fra bil til båt. Sammenligning av plasmakortisol etter sekundærtransporter med og uten Aqui-S viste et signifikant høyere stressnivå på sedert fisk (to-veis ANOVA,  $p < 0,01$ ,  $144,5 (\pm 47)$  ng/ml) sammenlignet med usedert fisk ( $59 (\pm 21)$  ng/ml, Figur 16). Uttesting av Aqui-S (5 mg/L) som sedasjonsmiddel på rognkjeks (Iversen 2016) har vist at sedasjonsmidlet i seg selv gir en forhøyet plasmakortisol sammenlignet med ustresset kontrollgruppe så lenge som 72 timer etter behandling.

For korte sekundærtransporter er det en risiko for at sedasjonen fortsatt kan ha virkning etter overføring til merd og dermed påvirker tilvenningen til det nye miljøet. Om dette kan ha negative konsekvenser for tilpasning og overlevelse i merd bør undersøkes nærmere.

På laks har en litt ulike erfaringer. Lave doser Aqui-S ( $5 \text{ mg/m}^3$ ) var knyttet til økt stress og dødelighet (Espmark m.fl. 2015). Det var spekulert i om dette var relatert til lavere adaptasjon til gjentatt håndtering og dermed lavere toleranse for stress ved utsett sammenlignet med usedert laks, eller at sedasjon i seg selv utløste dødeligheten ved påvirkning av osmoreguleringen.

Ved bruk av samme metode på smolt under lasting og lossing ble det funnet at Aqui-S dempet stressresponsen (Iversen og Finstad, 2009; Iversen og Eliassen, 2009).





Figur 16. Effekt av sedasjon (Aqui-S, 4 mg/m<sup>3</sup>) på stress (plasmakortisol) i forbindelse med overføring av rognkjeks fra primærtransport til sekundærtransport. Plasmakortisol for sammenslåtte grupper av sedert og u-sedert rognkjeks etter sekundærtransport er hhv. 144,5 ng/ml (n = 15, SD = ± 47) og 59 ng/ml (n = 18, SD = ± 21). Søylar på samme prøvetidspunkt merket \* indikerer signifikant forskjell i plasmakortisol (to-veis ANOVA, p < 0,01). Vertikale linjer på søylene indikerer standard feil (SEM).

#### Langvarige effekter av håndtering og transport:

Akkumulert dødelighet de første 30 dagene etter utsett ble samlet inn fra ni av mottaksanleggene og varierte fra 1,6 til 21 % (Tabell 2). Det er vanskelig ut fra dette materialet å se noen sammenheng mellom transportstress og eventuelt kronisk stress og tilvenningsproblemer i sjø som fører til økt dødelighet.

Hovedårsaken er det svært begrensede og usikre datagrunnlaget. I tillegg er det generelt vanskelig å samle gode dødelighetsdata fra fullskala kommersielle anlegg, og det er nærmest umulig å med sikkerhet relatere det til kun ett enkeltforhold som for eksempel transportstress.

Likevel kan en basert på den kraftige økningen i både primær stressrespons (plasmakortisol) og sekundære stressrespons, spesielt osmolalitet og pH, observert like før overføring til merd (etter sekundærtransporten) forvente at risikoen for seinvirkninger i sjø er stor. Dette vil da være som resultat av kumulativ stressbelastning som overgår det fisken klarer å respondere på og tilpasse seg til når fisken på toppen av dette møter nye utfordringer (miljøtilpasninger) i merden. En slik tilleggsbelastning som kommer på toppen av det som er akkumulert etter sekundærtransporten vil øke risikoen for kroniske stress som til syvende og sist kan medføre økt dødelighet.

Optimalisering av forholdene for rognkjeks etter overgang til merd er derfor viktig, hvor det bl.a. bør tas hensyn til strøm- og værforhold i merd ved utsett, plassering av skjul, føring og redusere påvirkningen fra lusebehandlingen av laksen osv.

### 3.4 Konklusjoner og anbefalinger

1. Vannkvaliteten nådde ikke grenseverdier som en forventer har vært problematiske for transportene undersøkt i felt, basert på kunnskap og anbefalte grenseverdier hos laks. For å sikre vannkvaliteten for rognkjeks må det utvikles artsspesifikk kunnskap om grenseverdier for rognkjeks.
2. Hos rognkjeks er det visuelt vanskelig å skille stress fra hvileadfærd. Det er derfor lett å overs eller feiltolke stressorer og stressrespons, og en risikerer at en aksepterer metoder og miljøbetingelser som ikke burde vært akseptert med hensyn på fiskevelfærd. En er avhengig av god kjennskap til rognkjeksens spesielle adferdsmønstre og kan i liten grad benytte erfaringer fra laks.
3. Det anbefales å sulte fisk i svak belysning eller mørke før transport for å redusere miljøbelastningen under transport. Sulting 2-3 dager i mørke ga ikke økt stress.
4. Overføring av rognkjeks fra leveringskar til transportkar på bil medførte en dobling av plasmakortisol og indikerer at selve opplastingen utgjør en stor del av stresset akkumulert i primærtransporten.
5. Toleransen for transportstress økte med økende temperatur, og det anbefales ikke å transportere eller overføre rognkjeks til med ved svært lave temperaturer (lavere enn 4 °C).
6. Fisketetthet mellom 14-47 kg/m<sup>3</sup> ga ikke noen økning i stressnivået for transporter på inntil 20 timer.
7. Ved planlegging og gjennomføring av transport av rognkjeks bør en legge opp til en logistikk som ikke medfører omlasting eller gjentatte håndteringer av fisken uten at den får god tid til å stresse ned mellom hver håndtering.
8. Det bør settes samme krav til vannkvalitet under sekundærtransport som under primærtransport på bil, samt overvåking og kontroll med vannkvalitet
9. En trenger mer kunnskap før en kan gi anbefalinger på bruk av Aqui-S for sedasjon, spesielt i forbindelse med omlasting av rognkjeks fra primærtransport til sekundærtransport der en har indikasjoner på negative effekter.
10. For å redusere risikoen for kronisk stress og dødelighetsutvikling i merd bør en ha fokus på tiltak for optimalisering av forholdene for rognkjeks etter overgang til merd. Det må bl.a. tas hensyn til strøm- og værforhold i merd ved utsett, plassering av skjul, føring og redusere påvirkningen fra lusebehandlingen av laksen osv.

### 3.5 Referanser

- Annon, 2008. Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare of the Norwegian Scientific Committee of Food Safety, 14 May 2008. Transportation of fish within a closed system. VKM Rapport nr. 07/806, 63 pp.
- Arends, R.J., Mancera, J.M., Munoz, J.L., Wendelaar Bonga, S.E., Flik, G. (1999). The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement. *Journal of Endocrinology*, 163, 149–157.
- Espmark, Å. M., Humborstad, O.-B., Midling, K. Ø. (2012). Pumping av torsk og laks, forhold som påvirker velferd og kvalitet. NOFIMA-rapport 6/20012, 20 sider.
- Espmark, Å.M., Kolarevic, J., Aas-Hansen, Ø., Nilsson, J. (2015). Pumping og håndtering av smolt. NOFIMA Rapport 6/2015, 72 sider.
- Finstad, B., Iversen, M., Sandodden, R. (2003). Stress reducing methods for releases of Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts in Norway. *Aquaculture*, 222(14), 203-214.
- Fivelstad, S., Olsen, A.B., Kløften, H., Ski, H., Stefansson, S. (1999). Effects of carbon dioxide on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts at constant pH in bicarbonate rich freshwater. *Aquaculture*, 78, 171-187.
- Fivelstad, S., Waagbø, R., Stefansson, S., Olsen, A.B. (2007). Impacts of elevated water carbon dioxide partial pressure at two temperatures on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr growth and haematology. *Aquaculture*, 269 (1-4), 241–249.
- Iversen, M. & Eliassen, R. A. (2009). The Effect of AQUI-S® Sedation on Primary, Secondary, and Tertiary Stress Responses during Salmon Smolt, *Salmo salar* L., Transport and Transfer to Sea. *Journal of the World Aquaculture Society*, 40(2), 216-225.
- Iversen, M. & Eliassen, R. A. (2012). Stressovervåking av settefiskproduksjonen Mainstream Norway AS 2009 - 2011. Stresskartlegging av laksesmolt (*Salmo salar* L.), og effekten av stressreducerende tiltak på stressnivå, dyrevelferd og produksjonsresultatet. UiN rapport nr 05/2012, 54 sider.
- Iversen, M. & Eliassen, R. A. (2013). The effect of allostatic load on hypothalamic–pituitary–interrenal (HPI) axis before and after secondary vaccination in Atlantic salmon postsmolts (*Salmo salar* L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(2), 527-538.
- Iversen, M., Eliassen, R.A., Finstad, B., 2009. Potential benefit of clove oil sedation on animal welfare during salmon smolt, *Salmo salar* L. transport and transfer to sea. *Aquaculture Research* 40, 233-241.
- Iversen, M. (2013). Stress and its impact on animal welfare during commercial production of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Dissertation for the degree of Philosophiae Doctor (PhD) PhD in Aquaculture no. 9 (2013) Faculty of Bioscience and Aquaculture, University of Nordland, 104 sider.
- Iversen, M. (2016). Effekten av akutt stress på berggylt og rognkjeks. Presentasjon, FHF-Rensefiskkonferanse, Gardermoen, 8-9 februar 2016. <http://kyst.no/nyheter/sedasjon-av-berggylte-og-rognkjeks-for-reducerer-stress-og-ddelighet/>
- Iwama, G., Pickering, A., Sumpter, J., Schreck, C. (1997). *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge University

- Press, Cambridge. McCormick, S.D., Saunders, R.L. (1987). Preparatory Physiological Adaptations for Marine Life of Salmonids: Osmoregulation, Growth, and Metabolism. American Fisheries Society Symposium, 1, 211-229.
- Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W. (1999). Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 9, 211-268.
- Nytrø, A.N. (2013). The effect of temperature and fish size on growth of juvenile lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.). Master's Degree Thesis in Fisheries Science, Universitetet i Tromsø, 80 sider.
- Portz, D., Woodley, C., Cech, J. (2006). Stress-associated impacts of short-term holding on fishes. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 16, 125-170.
- Rosten, T., Kristensen, T. (2011). Best practice in live fish transport. NIVA-rapport 6102, 22 sider.
- Staurnes, M., Rainuzzo, J.R., Sigholt, T., Jørgensen, L. (1994). Acclimation of Atlantic Cod (*Gadus morhua*) to Cold-Water – Stress-Response, Osmoregulation, Gill Lipid Composition and Gill Na-K-ATPase Activity. Comparative Biochemistry and Physiology, 109A(2), 413-421.
- Terjesen, B.F., Rosten, T.W., Ulgenes, Y., Henriksen, K., Aarhus, I.J., Winther, U. (2013). Betydningen av vannmiljøet ved produksjon av laksefisk i lukkede systemer i sjø. Vann, 1, 14-27. <http://vannforeningen.no/dokumentarkiv/betydning-av-vannmiljoet-ved-produksjon-av-laksefisk-i-lukkede-systemer-i-sjo/>
- Veiseth, E., Fjæra, S.O., Bjerkeng, B., Skjervold, P.O. (2006). Accelerated recovery of Atlantic salmon (*Salmo salar*) from effects of crowding by swimming. Comparative Biochemistry and Physiology 144B, 351-358.
- Wedemeyer, G.D. (1996). Physiology of fish in intensive culture systems. Chapman & Hall, New York, USA, 232 sider.
- Wendelaar Bonga, S.E. (1997). The stress response in fish. Physiological Reviews, 77(3), 591-625.
- Wood, C.M. & Jackson, E.B. (1980). Blood acid-base regulation during environmental hyperoxia in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Respiration Physiology, 42(3), 351-372.

## 4 Del II: Analyser fra transportsimuleringsforsøk

---

### 1. Metode

#### 1.1 Forsøksoppsett

Måling av transportstress under kontrollerte betingelser ble gjort ved Kraknes Forskningsstasjon i Tromsø i perioden mars-oktober 2016. Det ble utført **tre langtidsforsøk** og to **korttidsforsøk** der rognkjeks ble utsatt for simulert transport med ulike transportbetingelser. De fem variablene var **fisketetthet, transporttid, temperatur, fiskestørrelse og oksygenivå**. Målet var å undersøke om variasjon i transportbetingelsene førte til variasjon i fiskens respons, i form av stressparametere (plasmakonsentrasjoner av kortisol, ioner, glukose, laktat og plasma pH/osmolaritet) og vekst- og dødelighetsrate i løpet av 28 dager etter transport. Akutte effekter på stressparametere i løpet av transporten ble undersøkt i alle 5 forsøk og vekst, dødelighet og kronisk stress ble undersøkt i langtidsforsøkene.

Ut ifra informasjon fra feltundersøkelser ble det satt opp et standard oppsett som ble definert som "normal transport". Dette ble definert som transport med 30 kg rognkjeks/m<sup>3</sup>, 8 timers varighet, 8 °C, 100% O<sub>2</sub> og fiskestørrelse på 30 g (se Tabell 1). Selve simuleringen besto i å sette forsøkskarene (110 L med lokk) på ei bevegelig tralle som ble kjørt frem og tilbake i 3 × 3 min med 1 min pause hver halvtime ved hjelp av en elektromotor (se Fig. 1). Det ble også brukt lufting og oksygenering (mål: 100% O<sub>2</sub>) i alle transportkar, i tråd med praksis i kommersielt oppdrett.

I de fem forsøkene som ble gjort, ble én variabel endret om gangen, for å undersøke betydningen av variasjon i dette parameteret for rognkjeksas toleranse for transportforholdene. (se Tabell 1). I hvert forsøk ble 2 fiskegrupper utsatt for "normal transport", 2 fiskegrupper ble utsatt for "behandling" (økning i én av de nevnte variablene), og 1 fiskegruppe ble kun håvet over i nytt holdekar (kontroll).

I ett av forsøkene (Forsøk 3), undersøkte vi også effekten av sekundærtransport (simulering av båt fra landbase til sjøanlegg), ved å overføre én gruppe (høy temp) til nytt transportkar etter endt simulering av primærtransport, og gjennomføre en 1.5 timers transport med normale transportbetingelser, men uten lufting. Respons etter 1.5 t ble sammenlignet med respons hos normal/kontroll-gruppe, som ble håvet over til oppfølgingskar.

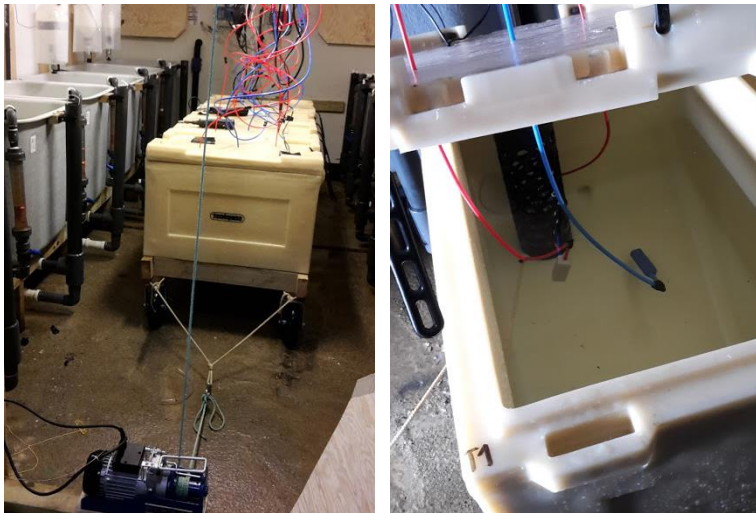


Fig. 1. Transportsimuleringstralla og innside av transportkar med luftestein, oksygendiffusor og varmekolbe (sistnevnte var kun installert i Forsøk 3). Oppfølgingskar sees i bakgrunnen.

Tabell 1. Oversikt over forsøksoppsett.

Type forsøk	Forsøk nr.	Gruppe	Tid (t)	Tetthet (kg/m <sup>3</sup> )	Temp. (°C)	Størrelse (g)	O <sub>2</sub> (%)
Alle forsøk	Alle	Normal transport	8	30	8	30	100
	Alle	Kontroll	8	7	8	30	100
Langtids-oppfølging	1	Økt tid	<b>20</b>	30	8	30	100
	2	Økt tetthet	8	<b>60</b>	8	30	100
	3	Økt temp. + sekundærtransport	8	30	<b>12</b>	30	100
Korttids-oppfølging	4	Økt størrelse	8	30	8	<b>60</b>	100
	5	Økt O <sub>2</sub> %	8	30	8	30	<b>150</b>

## 1.2 Forberedelser til transportsimulering

Rognkjeks ble kjøpt fra Senja Akvakultursenter og transportert til Kraknes Forskningsstasjon i kar på bil. Fisken ble akklimatisert til forsøksstemperatur (ca. 8 °C) i 3000 L kar med kontinuerlig lys/fôring i minst 2 uker. Fiskens størrelse og vekst avgjorde når forsøk ble igangsatt (se Tabell 2). Gjenstående fisk og kontrollgruppefisk fra Forsøk 3 ble brukt i gruppen med økt størrelse i forsøk 4.

To dager før transportsimulering ble fisken veid og målt, og jevnt fordelt på 5 stk 245 L kar ("sultekar"). I Forsøk 2 ble 7 kar brukt pga. doubling av tetthet i 2 transportkar. For å oppnå en mest mulig riktig snittstørrelse og forsøksbiomasse ble et definert størrelsesintervall brukt, og antallet fisk ble justert for å oppnå ønsket tetthet. Dette med unntak av Forsøk 1, der fisken ble bulkveid inn i sultekarene. Det ble ikke tilbudt fôr og lyset var av i perioden før transportsimuleringen, i henhold til praksis i næringa. På forsøksdagen ble fiskegruppene håvet over i sine fem respektive forsøkskar etter uttak av nullprøver.

Tabell 2. Oversikt over forsøksperiode, gjennomsnittlig ( $\pm$ SD) vekt (V) og lengde (L) ved start og slutt (hhv. T<sub>1</sub> og T<sub>2</sub>) og antall fisk brukt i forsøket (N). I forsøk 4 ble det brukt 2 ulike størrelsesgrupper (a og b).

Forsøk nr.	Forsøksperiode		V		L		N
			(g)		(cm)		
	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	
1	20.04.16	16.05.16	32*	54 $\pm$ 13	*	10.7 $\pm$ 0.9	625
2	19.05.16	15.06.16	27 $\pm$ 7	50 $\pm$ 13	8.3 $\pm$ 2.2	10.2 $\pm$ 0.9	920
3	06.07.16	03.08.16	34 $\pm$ 6	60 $\pm$ 11	9.1 $\pm$ 0.7	10.9 $\pm$ 0.7	538
4a	31.08.16	-	31 $\pm$ 5	-	-	-	351
4b	31.08.16	-	72 $\pm$ 5	-	-	-	102
5	27.08.16	-	32 $\pm$ 4	-	-	-	577

\* Fisken ble bulkveid inn i sultekar ved start i Forsøk 1.

### 1.3 Prøvetaking

Miljøparametre (T, O<sub>2</sub>, pH) ble målt hvert 30. minutt underveis og vannprøver fra alle grupper ble tatt ved transportens slutt og sendt til NIVA for å bestemme konsentrasjoner av TAN (total ammonium nitrogen), CO<sub>2</sub>, TOC (total organisk karbon) og pH.

Det ble tatt blodprøver før, underveis (etter 1 og 4 t), ved slutt (8 t) og etter transport (ca. 22 t etter endt transport) for å kartlegge fysiologisk respons til transportforholdene, med hensyn på stress og regulering av indre homeostase. Prøver ble tatt ved 0, 4 og 8 t i alle forsøk, og ved 1 og 32 t i 3 av 5 forsøk (2, 4 og 5) av kostnadmessige hensyn.

Det ble lagt vekt på å unngå forstyrrelser før det første prøveuttaket for å oppnå gode resultater for nullprøvene (før stress). Ved alle blodprøveuttak ble 6 fisk raskt håvet ut og umiddelbart overført til en bøtte med bedøvelse (Metomidat, 15 mg/l). Hepariniserte sprøyter ble brukt for å ta blodprøver fra hjertet (0.2-0.5 ml). Alle prøver var tatt og satt på sentrifugering (6 min, 6000 rpm) innen 15 min fra håvetidspunktet. Plasma ble overført til nye eppendorfrør, umiddelbart fryst i CoolBox (www.biocompare.com), lagt i -80 °C fryser innen 2 timer og oppbevart der inntil forsendelse. Etter blodprøvetaking ble fisken overført til nummerte kammer med overdose bedøvelse (Finquel, 200 mg/l), og vekt, lengde og eventuelle ytre lyter ble registrert.



Fig. 2. Bilder fra forsøk. Venstre: Oppfølgingskar. Midten: Sentrifugerte blodprøver. Høyre: blodprøvetaking.

## 1.4 Måling av kronisk stress

I Forsøk III ble det undersøkt om transport fører til en kronisk stressrespons ved bruk av en stresssensitivitetstest beskrevet for laks av Iversen og Eliassen (2013). Testen undersøker om evnen til stressregulering (regulering av kortisolproduksjon) er endret ved å injisere fisken med standardiserte mengder hypofyseinhiberende (dexamethason; kortisolanalogue) og -stimulerende (ACTH) hormoner.

De tre gruppene fra Forsøk III (kontroll, normal og økt temperatur+ sekundærtransport) ble overført til oppdrettskar under optimaliserte miljøbetingelser etter transport og fulgt opp i 28 dager for registrering av tertiære stressresponser (vekst og dødelighet, se 1.5). Ved avslutning (dag 29) ble 18 fisk fra hver av de tre gruppene, totalt 52 fisk, tatt ut til stresssensitivitetstest.

Det ble tatt blodprøver av 6 fisk fra hver gruppe umiddelbart for å måle baseline kortisolkonsentrasjoner i plasma. Dette ble gjort etter metode beskrevet i 1.3. Etter dette ble 12 fisk fra hver gruppe injisert intraperitonealt med 1 mg/kg dexamethason (Sigma-Aldrich) i etanol/fosfat-bufret saltløsning (PBS) (1:3; 1 µg/µl) og deretter overført til hvert sitt forsøkskar, totalt tre kar. Etter 24 timer ble seks fisk fra hvert kar ble enten gitt en intraperitoneal injeksjon av 0,5 ml/kg adrenokortikotrop hormon (ACTH, 45 µg/ml, fragment 1-24; Sigma-Aldrich), eller 0,5 ml/kg PBS for å måle effekten av suppresjon (dexamethason+PBS) eller stimulering (dexamethason+ACTH) av HPI-aksen. De seks fiskegruppene ble overført til seks identiske oppfølgingskar med lik vannkvalitet. To timer etter ACTH/PBS-injiseringen ble det tatt blodprøver all av fisk for analysering av plasmakortisol etter metode beskrevet i 1.3. Deretter blir fisken avlivet.

## 1.5 Måling av vekst og dødelighet

Etter transportsimuleringen i Forsøk I-III ble hver fiskegruppe delt i to, bulkveid og overført til 2 oppfølgingskar (245 L, til sammen 10 kar) for å kartlegge vekst og dødelighetsrate i 26-28 dager. Det var kontinuerlig lys og utfôring (overfôring, 3% av biomasse/dag), 95-105% O<sub>2</sub> og 7.9-9.0 °C i oppfølgingskarene. Dødelighet, temperatur og oksygenmetning ble registrert på daglig basis. Ved forsøkets slutt ble vekt og lengde registrert for all fisk og gjennomsnittsvekt per kar ved start og slutt ble brukt til å beregne spesifikk vekstrate (SGR, % av biomasse per dag) for perioden (n=4 for normal/behandlingsgrupper og n=2 for kontroll). SGR ble beregnet ut i fra følgende formel:

$$SGR = 100(e^g - 1),$$

hvor  $g = \ln(V_2) - \ln(V_1) / t_2 - t_1$ , og hvor  $V_1$  er snittvekt ved start av vekstperioden ( $t_1$ ) og  $V_2$  er snittvekt ved slutt ( $t_2$ ) (Houde og Scheckter 1981).

## 1.6 Plasmaanalyser

Analyser av plasmakonsentrasjoner av kortisol, glukose, laktat, ioner (Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, K<sup>+</sup>) og plasma osmolalitet/pH ble utført av Havforskningsinstituttet (Forskningsstasjon Matre ved Karen Anita Kvestad). Ved forsendelse ble prøvene holdt frosset i en cryocontainer mettet med flytende nitrogen, og deretter oppbevart ved -80 °C til analysene ble gjennomført.

Konsentrasjon av kortisol ble målt ved bruk av analysekit RE52061 Enzyme Immunoassay ([www.ibl-international.com](http://www.ibl-international.com)), med analyseområde 20-800 ng/ml. Elisa-platen ble avlest ved bruk av Tecan Sunrice plateleser. Analyse av plasma pH ble utført ved bruk av Radiometer pHM 92 og pH-plasma-elektrode Modell PHC 3395-8 ([www.nmas.no](http://www.nmas.no)). Kalibrering og kontroll ble utført med standardløsninger fra leverandør. Osmolalitet ble utført på Fiske Micro-



Osmometer, med tilhørende standardløsninger og kontroller ([www.aicompanies.com](http://www.aicompanies.com)). Konsentrasjoner av plasma ioner, glukose og laktat ble målt ved bruk av Maxmat PI II. Det ble brukt standarder og kontroller tilhørende instrumentet. På grunn av lite prøvevolum (og et instrumentelt behov for et minstevolum i prøverør) ble disse prøvene fortynnet før kjøring.

## 1.7 Statistiske analyser

Statistiske analyser ble utført ved hjelp av Statistica. To-veis faktoriell ANOVA ble brukt for å teste effekt av tid (0, 1, 4, 8 eller 32 t) og behandling (kontroll, normal transport og eksperimentell transport) på plasmaparametrene, samt en eventuell interaksjonseffekt mellom de to faktorene. En-veis ANOVA ble brukt for å teste effekt av behandling på SGR. Påviste effekter av behandling i ANOVA ble etterfulgt av Newman-Keuls post-hoc test for avdekke statistisk signifikante forskjeller mellom gruppene på de ulike prøvetakingstidspunktene. Signifikansnivå ( $\alpha$ ) ble satt til 0.05 i alle analyser.

## 2 Resultater og diskusjon

### 2.1 Vannkvalitet under transport

Miljømålingene under transport viser at vannets **temperatur** og **oksygenmetning** var relativt stabile i løpet av de 5 transportene, med unntak av Forsøk III og V da nettopp temperatur og oksygenmetning var forsøksvariabler (Fig. 3).

Målingene viser også at **pH** i transportvannet sank i løpet av de første 2-4 timene, men stabiliserte seg deretter. Laveste pH målt underveis var 7,3 og ble målt i transportkar med økt tetthet ( $60 \text{ kg/m}^3$ , Fig. 3). Redusert pH i lukket transport er et resultat av fiskens  $\text{CO}_2$ -utskillelse.  $\text{CO}_2$  reagerer med vann og danner karbonsyre ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ), en syre som potensielt kan avgi 2  $\text{H}^+$ -ioner, og dermed senke pH. Disse reaksjonene inngår i en likevekt. Etter en initiell fase i transporten, der  $\text{CO}_2$  reagerer med vann og pH gradvis synker, kan det etableres en ny likevekt, der pH er lavere og vannets  $\text{CO}_2$  innhold høyere enn det vanligvis er i sjøvann. I tråd med dette ble det funnet at pH var lavest i de to transportene med høyest  $\text{CO}_2$ -konsentrasjon, dvs. transporter med økt tetthet og transporttid (Tabell 3). I transporten med økt transporttid, var pH stabil og litt økende i løpet av de siste 12 timene av transporten (Fig. 3). Økt utlufting kunne ha bidratt til å redusere effekten av økt fisketetthet og transporttid på vannets pH og  $\text{CO}_2$ -konsentrasjon. En moderat reduksjon i pH er imidlertid gunstig under transport, fordi dette fører til at en mindre andel av ammoniakk foreligger i den mest giftige, uioniserte formen  $\text{NH}_3$ .

Det finnes per dags dato ikke etablerte grenseverdier for  $\text{CO}_2$  og pH-toleranseområdet til rognkjeks. Ut i fra etablerte, øvre grenseverdier for  $\text{CO}_2$ -toleranse med tanke på vekst for laks (10-20 mg/l; Thorarensen og Farrell 2011) og for oppdrettsfisk generelt (30-40 mg/l; Wedemeyer 1996) kan det antas at  $\text{CO}_2$ -konsentrasjonen alene ikke overstiger toleransegrensen for rognkjeks. Den moderate stressresponsen målt i dette studiet kan også tyde på de målte verdiene er innenfor grensene for hva som kan tolereres i en kortere periode (se 2.2 og 2.3). Målrettede studier for å etablere grenseverdier for rognkjeks er imidlertid nødvendig for å bekrefte dette.

Målingene av **ammoniak** i vannet (total ammonium nitrogen, TAN, dvs.  $\text{NH}_3\text{-N} + \text{NH}_4^+\text{-N}$ ) ved transportens slutt, viser som forventet at økt fisketetthet og transporttid fører til økt akkumulering, sammenlignet med normaltransport (Tabell 3). Økt temperatur førte også til en økning i TAN, noe som kan ha sammenheng med temperaturens effekt på fiskens

metabolisme. Siden  $\text{NH}_3$  er den mest giftige formen for ammoniakk, oppgis toleransegrenseverdier ofte som  $\text{NH}_3\text{-N}$ -konsentrasjon. Det finnes ikke etablerte grenseverdier for rognkjeks, men for laksefisk i sjøvann, er det anbefalt at konsentrasjonen av  $\text{NH}_3\text{-N}$  ikke overstiger 12-25  $\mu\text{g/l}$  (Terjesen m.fl. 2013). Konsentrasjonene i transportvannet var langt under dette (Tabell 3).

Tabell 3. Resultater fra analyser av vannprøver tatt ved start og slutt av transportsimuleringer i Forsøk I-V. Verdier er gjennomsnitt av to målinger og feilmargin er standardfeil (SE).

Forsøk	Gruppe	pH	TAN mg N/l	$\text{NH}_3\text{-N}$ $\mu\text{g/l}$	$\text{CO}_2$ mg/l	TOC mg C/l
I-V	Før start	7.8±0.1	0.0±0.0	0.0±0.0	2.0±0.1	1.3±0.2
I-V	Kontroll	7.9±0.0	0.0±0.0	0.2±0.0	2.5±0.2	1.1±0.1
I-V	Normal transport	7.5±0.1	0.5±0.0	1.3±0.1	6.4±0.5	3.1±0.3
I	Økt transporttid	7.4±0.0	1.6±0.1	4.4±0.1	8.6±2.8	4.9±0.1
II	Økt tetthet	7.1±0.0	1.3±0.0	2.3±0.1	7.5±0.3	8.2±0.3
III	Økt temperatur	7.8±0.0	0.8±0.0	3.3±0.1	4.9±0.3	3.4±0.0
IV	Økt størrelse	7.6±0.0	0.3±0.0	0.7±0.0	5.8±0.6	2.5±0.2
V	Økt oksygen	7.5±0.0	0.5±0.0	1.1±0.0	6.4±0.8	3.7±0.2

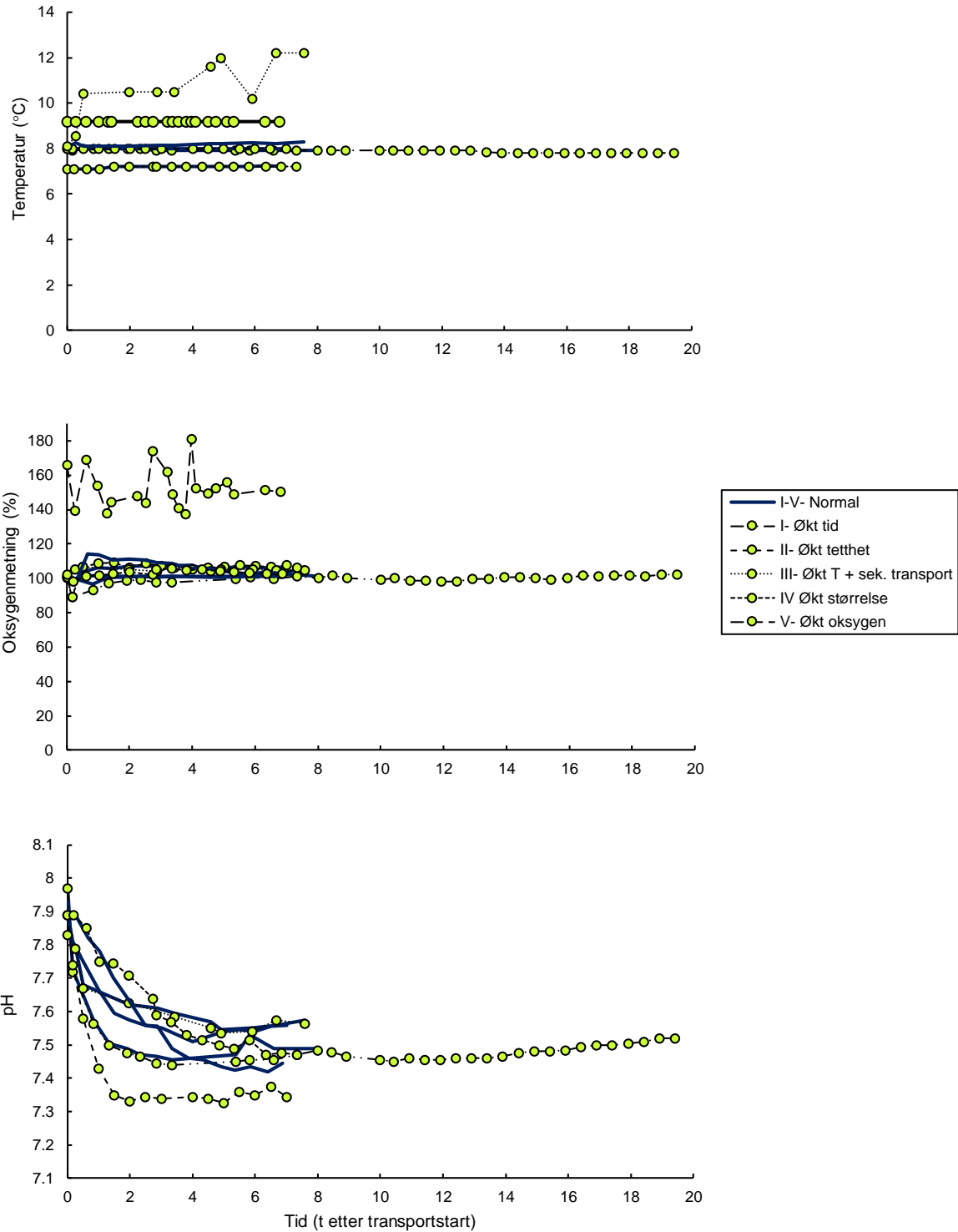


Fig. 3. Gjennomsnitt ( $n=2$  per punkt) av temperatur, oksygen og pH målt i vannet i normal- og behandlingsgrupper i løpet av transportsimuleringen i Forsøk I-V.

Økt fisketetthet ga også høyere **TOC** (total organic carbon), noe som kan skyldes observert slimdannelse i disse karene. Partikler, slim og skum i vannet kan potensielt være et problem med tanke på gjellefunksjon. Det ble ikke gjort undersøkelser av gjellefunksjon i dette studiet.

## 2.2 Akutte effekter av normal transport

### 2.2.1 Plasmakortisol

Resultatene fra transportforsøkene viser at normal transport, som definert i Tabell 1, fører til en stressrespons hos rognkjeks. Plasmakonsentrasjonen av stresshormonet **kortisol** økte i snitt fra 27 til 83 ng/ml i løpet av den første timen. Etter dette sank kortisolnivået gradvis til 53 ng/ml i løpet av 8 timers transport (Fig. 2A), på tross av at vannkvalitetsendringen i løpet av transporten (Tabell 3).

En økning i plasmakortisol ble også observert etter 1 t i kontrollgruppa, som kun ble utsatt for en forflytning mellom to identiske kar med identiske forhold. Sett i forhold til normaltransportgruppa var økningen moderat (57 ng/ml), og kortisolnivået sank raskt i løpet av de neste timene (Fig. 2A). Ett døgn etter transportslutt hadde kortisolnivået returnert til førstressnivå i begge grupper.

Sammen tyder disse resultatene på at håndteringen ved overføring er en hovedstressor under normal transport. Øvrige forhold ved transporten ser ut til å forsterke og forlenge stressresponsen. Potensielle stressorer i transportkaret kan f.eks. være begrenset tilgang til hvilesubstrat, sosiale interaksjoner pga. økt tetthet, vannets bevegelse, vannkvalitet (TAN/CO<sub>2</sub>/TOC↑, pH↓), oksygenering eller lufting. Resultater fra dette prosjektet kan tyde på at økningen i tetthet har bidratt (se 2.3). De andre faktorene er det for lite kunnskap om til å kunne anslå deres potensielle bidrag til den observerte responsen.

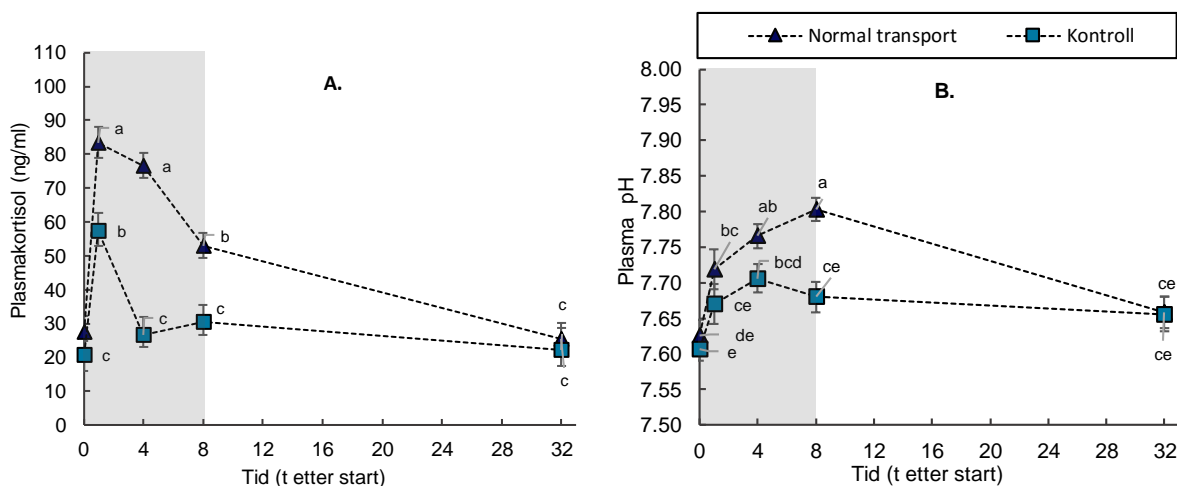


Fig. 2A-B. Gjennomsnitt ( $\pm$ SE) av A) plasmakonsentrasjoner av kortisol (ng/ml, til venstre) og B) plasma pH (til høyre) hos rognkjeksgrupper utsatt for simulering av "normal" transport (se Tabell 2) og hos fisk som kun blir utsatt for overføring til et nytt, identisk kar (kontroll). Skravert felt indikerer transportperioden. Ulike bokstaver indikerer statistisk signifikant forskjell i gruppesnitt (To-veis faktoriell ANOVA, etterfulgt av Newman-Keuls' post-hoc test,  $\alpha=0.05$ ).

Plasmakortisolkonsentrasjonene som er blitt målt 1 time etter overføring til transportkar er i overensstemmelse med andre studier som er blitt gjort på rognkjeks. Rognkjeks har relativt lave kortisolkonsentrasjoner i plasma som følge av standardiserte stressorer, sett i forhold til andre relevante arter i norsk fiskeoppdrett (Martin Iversen, presentasjon ved Rensefiskkonferansen 2015). Dette har blitt satt i sammenheng med denne artens adferdsrespons. Rognkjeks forholder seg relativt rolig under stress, har i liten grad fluktnespons, og setter seg gjerne ekstra godt fast i underlaget (M. Remen, pers. obs.). Det er mulig at en mer dempet stressrespons har utviklet seg i takt med denne adferden.

En dempet stressrespons kan være gunstig for fisk i oppdrett, fordi produksjonen medfører hyppige forstyrrelser som røktning, sortering, transport og så videre (Øverli m.fl. 2006). Selv om stressresponsen i utgangspunktet er en adaptiv respons som skal hjelpe dyret med å re-etablere sin likevekt i møte med en stressor (Barton m.fl. 2002), vil hyppig firing av en sterk stressrespons ha en kostnad i akvakultursammenheng (Barton og Iwama 1991). Stress kan blant annet føre til redusert immunforsvar, redusert evne til ioneregulering og redusert appetitt (Wendelaar Bonga 2011, Bernier og Craig 2005, Remen m.fl. 2012). Det er for tidlig å konkludere med at rognkjeks er stresstolerant, bare på grunnlag av de relativt lave kortisolnivåene. Det finnes ikke kunnskap om kortisolmetabolisme (produksjon og nedbrytning) eller kortisolreseptortetthet hos rognkjeks, og det er foreløpig begrenset kunnskap om sammenhengen mellom målte kortisolnivå i plasma og sekundære/ tertiære stressresponser. Inntil man har mer kunnskap på dette området anbefales det at rognkjeks håndteres med like stor skånsomhet som andre arter i oppdrett.

### 2.2.2 Plasma pH

Det ble også observert en økning i plasma pH under transporten. I normaltransportgruppa var økningen gradvis i løpet av 8 timers transport, men returnerte til før-stressnivå i løpet av ett døgn etter transport. I kontrollgruppa økte pH mindre og økningen var kun statistisk signifikant etter 4 t (Fig. 2B). Utviklingen i plasma pH i disse to gruppene gjenspeiler i stor grad utviklingen i plasmakortisol. Dette kan tyde på at økningen er relatert til sekundære stressresponser.

Økt plasma pH som direkte effekt av stress er et uvanlig resultat. I arter som laks, torsk, sea bass og sea bream er det observert at pH synker som følge av stress (Bagni m.fl. 2007, Misimi m.fl. 2008, Veiseth m.fl. 2006). Redusert pH i plasma kan oppstå som følge av økt  $[\text{CO}_2]$ /reduert pH i transportvann, eller som følge av fluktforsøk og anaerob metabolisme i muskulaturen (Barton og Iwama 1991, Turner m.fl. 1983). Redusert pH i blod kan imidlertid kompenseres for, i form av retensjon av  $\text{HCO}_3^-$  eller økt utskillelse av  $\text{H}^+$  via gjeller, tarm eller nyrer (Perry og Gilmour 1996). Ekskresjon av syre ( $\text{H}^+$ ) aktiveres vanligvis innen 20-30 minutter, og kan være svært effektiv (review av Evans m.fl. 2005). Det er også vist at en initiell reduksjon i ekstracellulær pH kan overkompenseres for, slik at pH blir høyere enn den var i utgangspunktet (Wood og Jackson 1980). Det er derfor mulig at den observerte økningen i plasma pH i transportforsøkene er et resultat av en svært effektiv kompensasjon som følge av en initiell (ikke observert) reduksjon i plasma pH. Syre-basereguleringen er imidlertid koblet til respirasjon, nitrogenekskresjon osmo- og ioneregulering. Med den begrensede kunnskapen man per i dag har om disse fysiologiske prosessene hos rognkjeks, og hvordan stress påvirker dem, må dette sees på som en løs hypotese. Det er vist at ferskvann kan akkumuleres i mage/tarm hos rognkjeks (Franzen m.fl. 2015) og at denne arten har vev som inneholder lave nivå av ioner som en av flere mekanismer for å oppnå nær nøytral oppdrift (Davenport og Kjørsvik 1986). Det er derfor grunn til å tro at rognkjeksas regulering av sin indre fysiologiske likevekt skiller seg fra andre kjente oppdrettsarter som er studert i mer detalj.

### 2.2.3 Plasma osmolaritet og ionekonsentrasjoner

De målte **kloridkonsentrasjonene** i plasma var synkende fra transportstart til 1 døgn etter transport (Fig. 3B). En synkende kloridkonsentrasjon kan være et resultat av syre-baseregulering, som nevnt i avsnittet over. Når pH i blod synker, kan dette bufres ved at utskillelsen av  $\text{HCO}_3^-$  reduseres, og ionebalansen kan opprettholdes ved at  $\text{Cl}^-$  i utskilles i større grad (Perry og Gilmour 1996). Ellers er stress gjerne forbundet med økt passiv influx av ioner og vanntap hos marine fiskearter, hvis graden av stress er så alvorlig at evnen til å opprettholde hydromineralbalansen svekkes (Wendelaar Bonga 1996). Siden det ikke ble funnet signifikante endringer i plasma **osmolaritet** i samme fiskegruppe (Fig. 3A), kan dette tyde på at rognkjeks

er i stand til å opprettholde hydromineralbalansen selv om kloridkonsentrasjonen er redusert, potensielt pga. økte  $\text{HCO}_3^-$ -konsentrasjoner (se 2.2.2).

Andre parametere (**glukose, laktat,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$** ) var ikke påvirket av transportbetingelsene (Fig. 3C-H). Forhøyede glukose -og laktatverdier etter stress er vanlig hos atletiske arter som laksefisk, som følge av at glukose mobiliseres og forbrukes (anaerobt) under forsøk på flukt (f.eks Turner m.fl. 1983, Tudorache m.fl. 2010). Hos arter med lavere grad av adferdsrespons, som rognkjeks, kan resultatet av økte kortisolkonsentrasjoner avvike fra dette mønsteret. Hos piggvar er det vist at glukose- og laktatnivå er upåvirket av stress, men at nivået av frie fettsyrer øker (Waring m.fl. 1996). I tillegg er det vist at ulike flyndrearter akkumulerer laktat i muskulaturen, uten nevneverdige økninger i plasmakonsentrasjonen (Wood m. fl. 1977 og 1982, Turner m.fl. 1983). Dette viser at det kan være stor variasjon i ulike arters sekundærrespons ved stress. Vi trenger mer basiskunnskap om de sekundære stressresponsene hos rognkjeks for å kunne tolke disse resultatene.

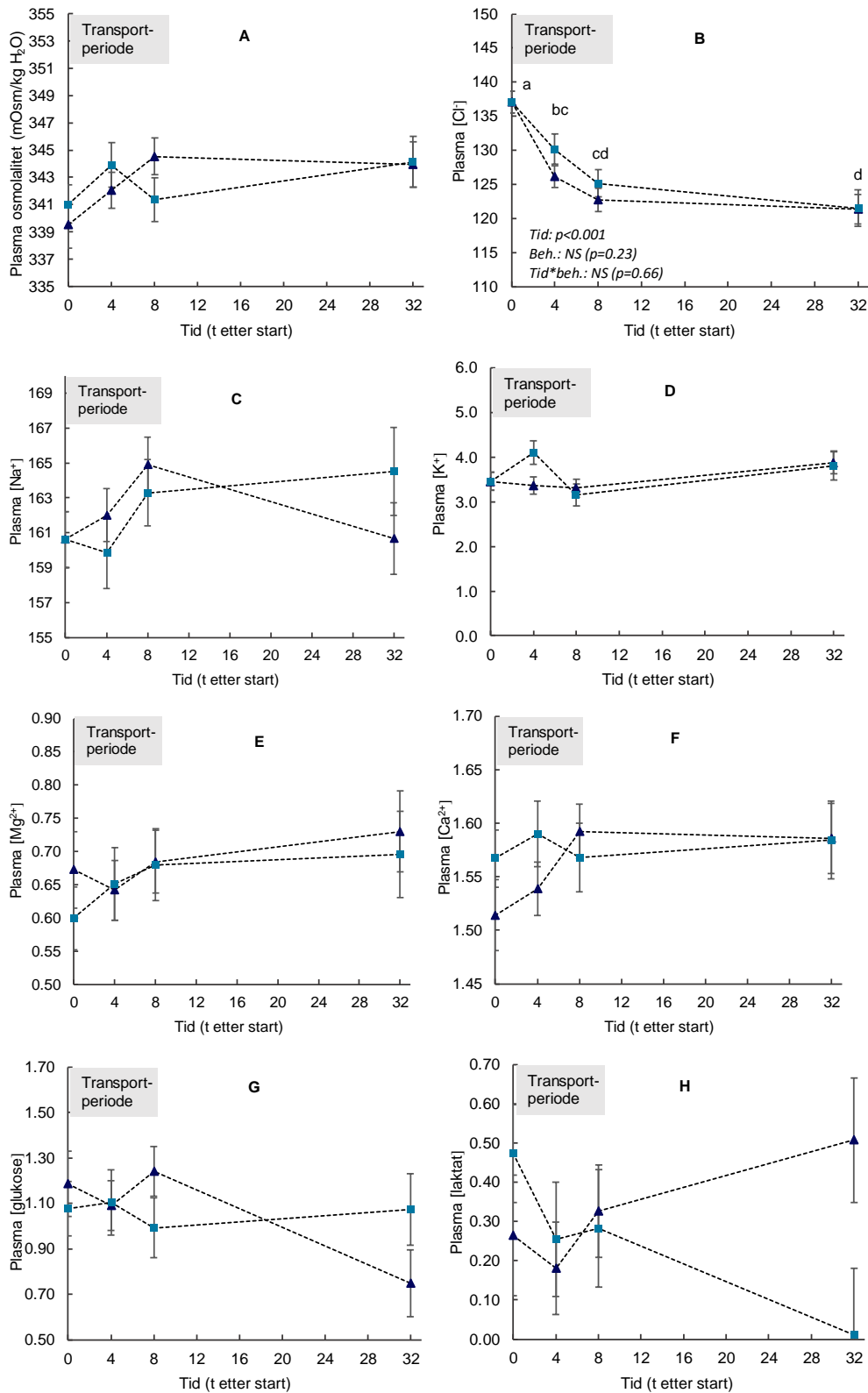


Fig. 3 A-H. Gjennomsnitt ( $\pm$ SE) av plasma A) osmolaritet (mOsm/kg H<sub>2</sub>O), B-F) ionekonsentrasjoner (mmol/l, hhv. Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>), G) laktat- (mg/dl) og H) glukosekonsentrasjoner (mmol/l). Ulike bokstaver indikerer statistisk signifikant forskjell i gruppesnitt (To-veis faktoriell ANOVA, etterfulgt av Newman-Keuls' post-hoc test,  $\alpha=0.05$ ).

## 2.3 Akutte effekter av ulike transportbetingelser.

### 2.3.1 Effekter av primærtransport med ulike betingelser

Effekten av de ulike transportbetingelsene på parametre målt i blod, er presentert i Figur 4A-E og Tabell 4 og 5. Blant de undersøkte forsøksvariablene, var det bare økt *fisketetthet* og økt *transporttid* som ga statistisk signifikante utslag på de målte **kortisolkonsentrasjonene** i plasma, sett i forhold til normaltransportgruppene (Fig. 4A-E). Det ser derfor ikke ut til at økt *oksygenmetning*, økt *temperatur* eller økt *fiskestørrelse* fører til at rognkjeksas respons til transporten endres.

Siden effektene av normaltransport var relativt kortvarige, og kompensert for innen 24 t (se 2.2.1-2.2.3), kan spenning i temperatur (8-12 °C), oksygenivå (100-150% O<sub>2</sub>) og fiskestørrelser (30-60 g) undersøkt i dette studiet sies å være innenfor akseptable grenser for transport. Når det gjelder temperatur, støttes denne konklusjonen av data presentert av Nytrø m.fl. (2014), men sammenlignbare studier er ikke tilgjengelig med tanke på en eventuell effekt av oksygenivå og fiskestørrelse på stresstoleranse.

Økningen i *fisketetthet*, fra 30 til 60 kg/m<sup>3</sup>, ga høyere plasmakortisolkonsentrasjon og høyere pH etter 4 timers transport (Fig 4B og Fig 5B). Ved transportens slutt var nivået likt normaltransportgruppa. Vi fikk lignende resultater i et pilotforsøk vi gjorde med samme oppsett (ikke vist). Denne midlertidige økningen i plasmakortisol og pH tyder på at høy fisketetthet fører til økt grad av stress. Om dette skyldes fisketettheten i seg selv (f.eks mindre tilgang på hvilesubstrat, sosiale interaksjoner) eller indirekte effekter av økende fisketetthet (f.eks effekt på [CO<sub>2</sub>]/pH/[TAN] i vannet, grad av oksygenering) vites ikke. Men resultatene fra Forsøk I kan tyde på at forverret vannkvalitet er av mindre betydning, siden vannkvaliteten etter 20 t transport (Tabell 3) ikke førte til noen ytterligere forstyrrelse av fysiologisk status sett i forhold til 8 t transport (Fig. 4A og 5A, Tabell 4 og 5).

Økningen i *transporttid* (20 t) resulterte i at plasmakortisolnivået var lavere ved slutt enn i gruppene som ble transportert i 8 t. Nivået som ble målt ved slutt var sammenlignbart med førstressnivå. De øvrige fysiologiske parameterne var ikke signifikant endret fra målinger gjort i normaltransportgruppa (Tabell 4). Dette kan tyde på at rognkjeks habitueres til forholdene i transportkaret, dvs. at stressresponsen nedreguleres, men at stressoren fremdeles kan være tilstede (f.eks Remen m.fl. 2012). Andre resultater er i overensstemmelse med dette (se avsnitt om sekundærtransport under).



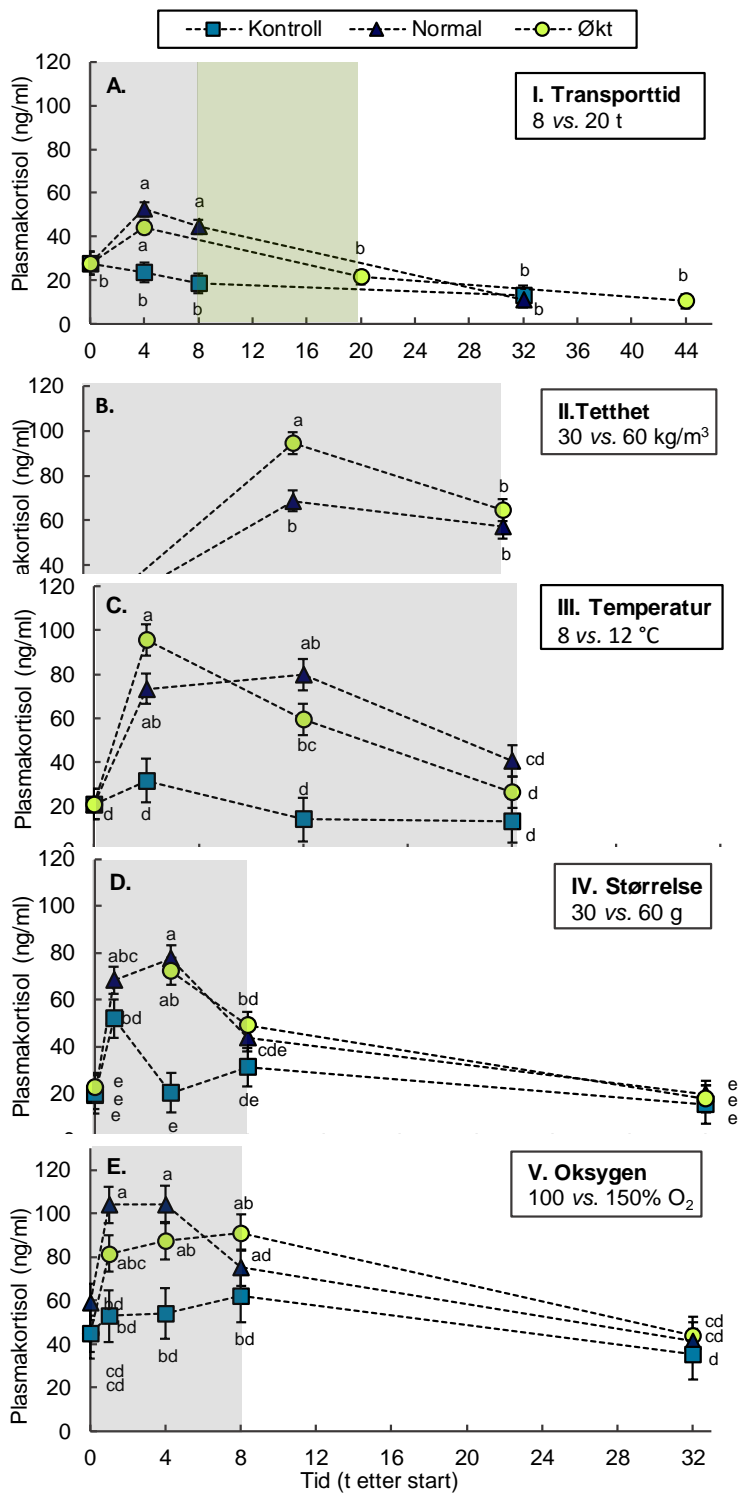


Fig. 4 A-E. Gjennomsnitt ( $\pm$ SE) av plasmakortisolkonsentrasjoner hos rognkjeks under simulert transport med normale betingelser (8 t, 30 kg/m<sup>3</sup>, 8 °C, 30 g, 100% O<sub>2</sub>, mørkeblå triangler), og under transport med A) økt transporttid, B) økt tetthet, C) økt temperatur, D) økt fiskestørrelse og E) økt oksygenivå (lysegrønne sirkler). Kontrollgruppen (turkise kvadrater) ble håvet over til et identisk holdekar ved start. Ulike bokstaver indikerer statistisk signifikant forskjell i gruppesnitt (To-veis faktoriell ANOVA, etterfulgt av Newman-Keuls' post-hoc test,  $\alpha=0.05$ ). Skravert felt representer transportperioden, og er delt inn i normal (grå) og lang (grønn) transporttid i A.

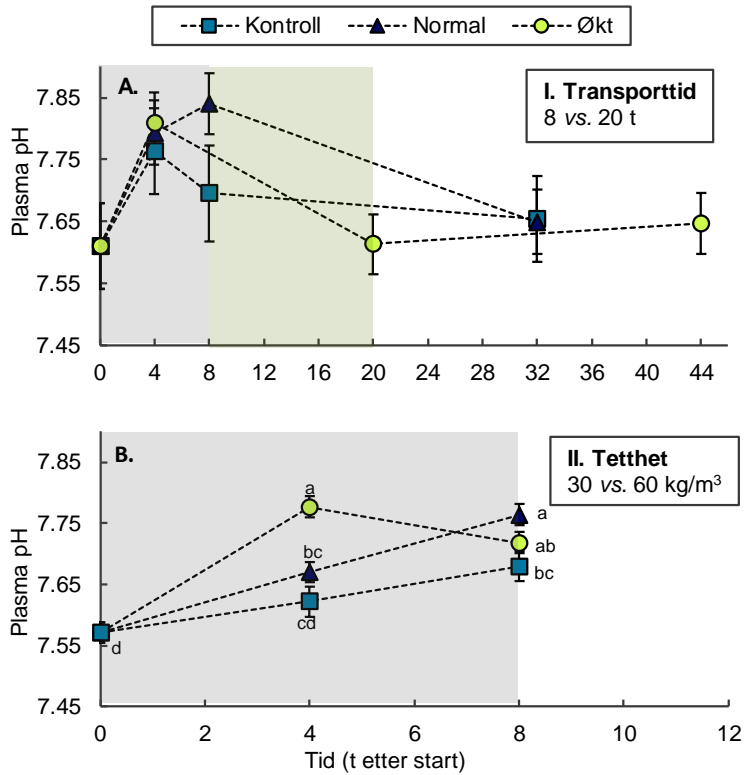


Fig. 5 A-B. Gjennomsnitt ( $\pm$ SE) av plasma pH hos rognkjeks under simulert transport med normale betingelser (8 t, 8 °C, 30 kg/m<sup>3</sup>, mørkeblå triangler), og under transport med A) økt transporttid (20 t) og B) økt tetthet (60 kg/m<sup>3</sup>; lysegrønne sirkler). Kontrollgruppen (turkise kvadrater) ble håvet over til et identisk holdekar ved start. Ulike bokstaver indikerer statistisk signifikant forskjell i gruppesnitt (To-veis faktoriell ANOVA, etterfulgt av Newman-Keuls' post-hoc test,  $\alpha=0.05$ ).

Tabell 4. Resultater fra Forsøk I. Gjennomsnitt ( $\pm$ SD) av plasma osmolaritet (mOsm/kg H<sub>2</sub>O), ionekonsentrasjoner (mmol/l), laktat- (mg/dl) og glukosekonsentrasjoner (mmol/l) i plasma hos rognkjeks ved ulike tidspunkt (Tid; t etter start) og behandlinger (Beh., 1= kontroll, 2= normal transport og 3= transport med økt transporttid). Signifikansnivå fra test av effekt av tid, behandling og tid $\times$ behandling er vist i kursiv til høyre i tabellen.

Parameter	Beh.	0 t	4 t	8 t	20 t	32 t	44 t	Tid	Beh.	Tid $\times$ Beh.
Osmolaritet	1	335 $\pm$ 7	338 $\pm$ 6	336 $\pm$ 4		350 $\pm$ 7		<0.01	0.90	0.07
	2		337 $\pm$ 3	348 $\pm$ 13		349 $\pm$ 13				
	3		338 $\pm$ 10		343 $\pm$ 6		343 $\pm$ 5			
Ca <sup>2+</sup>	1	1.4 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.2		1.6 $\pm$ 0.2		0.57	0.73	0.70
	2		1.5 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.2		1.6 $\pm$ 0.2				
	3		1.5 $\pm$ 0.1		1.5 $\pm$ 0.1		1.5 $\pm$ 0.2			
Mg <sup>2+</sup>	1	0.7 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.2		0.6 $\pm$ 0.1		0.02	0.94	0.60
	2		0.5 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.9		0.8 $\pm$ 0.4				
	3		0.6 $\pm$ 0.5		0.7 $\pm$ 0.3		0.6 $\pm$ 0.1			
Glukose	1	1.5 $\pm$ 0.9	1.8 $\pm$ 0.8	0.4 $\pm$ 0.6		1.1 $\pm$ 0.7		0.10	0.33	0.39
	2		1.3 $\pm$ 0.5	1.5 $\pm$ 1.0		0.7 $\pm$ 0.8				
	3		1.5 $\pm$ 0.5		1.4 $\pm$ 0.7		1.3 $\pm$ 0.7			
Laktat	1	0.1 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.6	0.2 $\pm$ 0.4		0.0 $\pm$ 0.0		1.00	0.90	0.82
	2		0.0 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.3		0.5 $\pm$ 0.9				
	3		0.1 $\pm$ 0.3		0.1 $\pm$ 0.5		0.5 $\pm$ 0.9			
Na <sup>+</sup>	1	154 $\pm$ 2	156 $\pm$ 5	159 $\pm$ 1.		165 $\pm$ 3		<0.01	0.62	0.26
	2		160 $\pm$ 2	162 $\pm$ 3		161 $\pm$ 5				
	3		160 $\pm$ 5		162 $\pm$ 5		162 $\pm$ 2.			
K <sup>+</sup>	1	4.0 $\pm$ 0.8	3.7 $\pm$ 0.4	3.1 $\pm$ 0.1		3.8 $\pm$ 0.3		0.01	0.17	0.08
	2		3.3 $\pm$ 0.4	3.3 $\pm$ 0.3		3.9 $\pm$ 0.8				
	3		3.5 $\pm$ 0.3		3.2 $\pm$ 0.2		3.3 $\pm$ 0.3			
Cl <sup>-</sup>	1	134 $\pm$ 2	129 $\pm$ 2	121 $\pm$ 1		122 $\pm$ 1		<0.01	0.17	<0.01
	2		123 $\pm$ 4	121 $\pm$ 1		121 $\pm$ 2				
	3		123 $\pm$ 3		124 $\pm$ 3		119 $\pm$ 3			

Tabell 5. Resultater fra Forsøk II. Gjennomsnitt ( $\pm$ SD) av plasma osmolaritet (mOsm/kg H<sub>2</sub>O), ionekonsentrasjoner (mmol/l), laktat- (mg/dl) og glukosekonsentrasjoner (mmol/l) i plasma hos rognkjeks ved ulike tidspunkt (Tid; t etter start) og behandlinger (Beh., 1= kontroll, 2= normal transport (30 kg/m<sup>3</sup>) og 3= transport med økt tetthet, 60 kg/m<sup>3</sup>). Signifikansnivå fra test av effekt av tid, behandling og tid×behandling er vist i kursiv til høyre i tabellen.

Parameter	Beh.	0 t	4 t	8 t	Tid	Beh.	Tid×Beh.
Osmolaritet	1		347±14	344±11	0.93	0.66	0.95
	2	342±8	347±10	343±8			
	3		344±11	341±8			
Ca <sup>2+</sup>	1		1.6±0.1	1.6±0.1	0.37	0.75	0.97
	2	1.6±0.1	1.6±0.1	1.6±0.1			
	3		1.6±0.2	1.6±0.1			
Mg <sup>2+</sup>	1		0.6±0.0 <sup>b</sup>	0.5±0.1 <sup>b</sup>	0.14	0.02	0.16
	2	0.6±0.1 <sup>ab</sup>	0.8±0.2 <sup>ab</sup>	0.7±0.1 <sup>ab</sup>			
	3		0.9±0.4 <sup>a</sup>	0.6±0.1 <sup>ab</sup>			
Glukose	1		0.9±0.4	1.0±0.3	0.69	0.48	0.64
	2	1.0±0.6	1.0±0.3	1.2±0.3			
	3		1.3±0.6	1.3±0.7			
Laktat	1		0.0±0.0	0.0±0.0	0.10	0.54	0.50
	2	0.4±0.6	0.1±0.2	0.3±0.6			
	3		0.6±0.8	0.3±0.6			
Na <sup>+</sup>	1		164±5	166±1	0.01	0.91	0.78
	2	161±9	167±0	169±1			
	3		168±4	168±1			
K <sup>+</sup>	1		3.5±0.1	3.2±0.1	0.30	0.99	1.00
	2	3.2±0.4	3.6±0.7	3.3±0.4			
	3		3.7±0.2	3.8±0.1			
Cl <sup>-</sup>	1		131±2	128±1	<0.01	0.10	0.11
	2	138±8	134±2	126±1			
	3		146±4	128±2			

### 2.3.2.Effekt av sekundærtransport

Etter 1.5 timers sekundærtransport var plasmakortisolnivået økt i forhold til nivået ved slutten av primærtransporten, men økningen var liten og ikke statistisk signifikant i normal- og høytemperaturgruppene. I kontrollgruppa var kortisolkonsentrasjonen imidlertid firedoblet og økningen var klart signifikant (Fig. 6).

Disse resultatene kan tyde på kortisolproduksjonen hos rognkjeks fra de to førstnevnte gruppene var påvirket av negativ feedback, dvs. at hypofysens utskillelse av ACTH er dempet pga. økte kortisolnivå i blod (Wendelaar Bonga 2011). I disse gruppene var økningen i plasmakortisol forlenget og forsterket i forhold til kontrollgruppa. En demping av stressresponsen ved overføring til sekundærtransport eller merd kan være ugunstig med tanke på at responsen potensielt øker rognkjeksas sjanse til å håndtere nye stressorer. Ved å optimalisere transportbetingelsene ytterligere, og redusere den "forsterkede og forlengede" stressresponsen hos transportert fisk, kan rognkjeksas toleranse for andre stressorer potensielt økes.

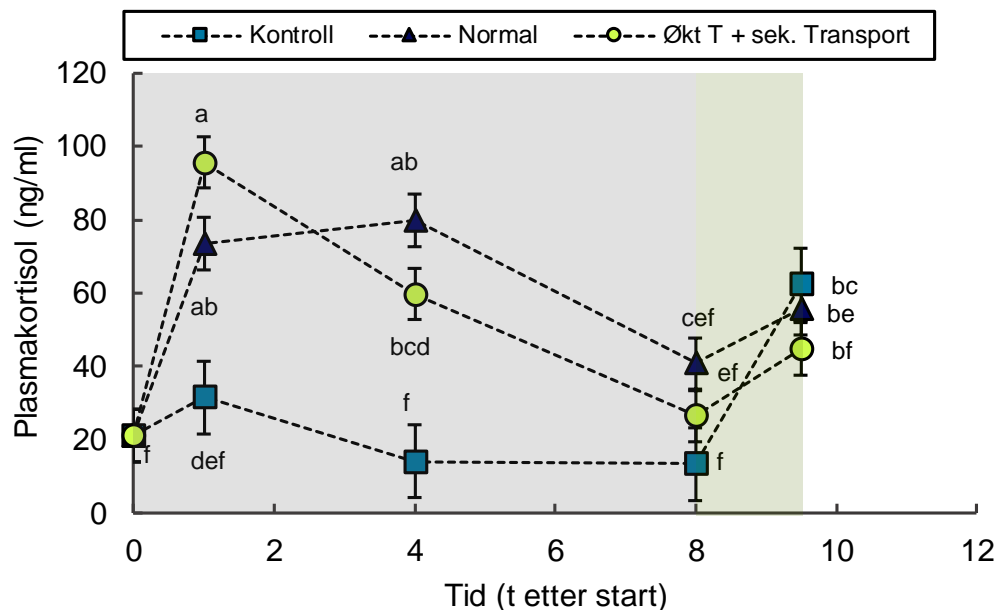


Fig. 6. Gjennomsnittlig plasmakortisolkonsentrasjon (ng/ml,  $\pm$ SE) hos rognkjeks i løpet av primær- og sekundærtransport i de tre gruppene i Forsøk III (Kontroll, Normal og Økt temperatur+ sekundærtransport). Etter primærtransportperioden (grå skravering) ble høytemperaturgruppa ble utsatt for en påfølgende transportsimulering i nytt kar i 1.5 t (grønn skravering), de to andre ble kun overført til større oppfølgingskar. Ulike bokstaver indikerer statistisk signifikant forskjell i gruppesnitt (To-veis faktoriell ANOVA, etterfulgt av Newman-Keuls' post-hoc test,  $\alpha=0.05$ ).

## 2.4 Langvarige effekter av ulike transportforhold

### 2.4.1 Vekst og dødelighet

Det ble ikke funnet noen forskjell i vekstrate eller dødelighet mellom grupper av rognkjeks som hadde blitt utsatt for ulike transportbetingelser (kontroll, normal transport, økt tid/tetthet/temperatur), i løpet av den 26-28 dagers lange oppfølgingsperioden (Fig. 7). Det ble ikke registrert dødelighet i noen av gruppene. Dette kan tyde på at stress knyttet til transportbetingelser undersøkt i Forsøk I-III kan tolereres, gitt rognkjeks i etterkant opplever optimaliserte forhold som den er akklimert til. Det er uvisst hvordan transportstress, kombinert med andre potensielle stressorer ved overføring til laksemerder til sammen påvirker mestringsnivået til nyutsatt rognkjeks. Eksempler på slike stressorer kan være brå endring i miljøforhold, strøm, nærvær av laks, type/tilgang på hvilesubstrat, fødetilgang, håndtering osv.

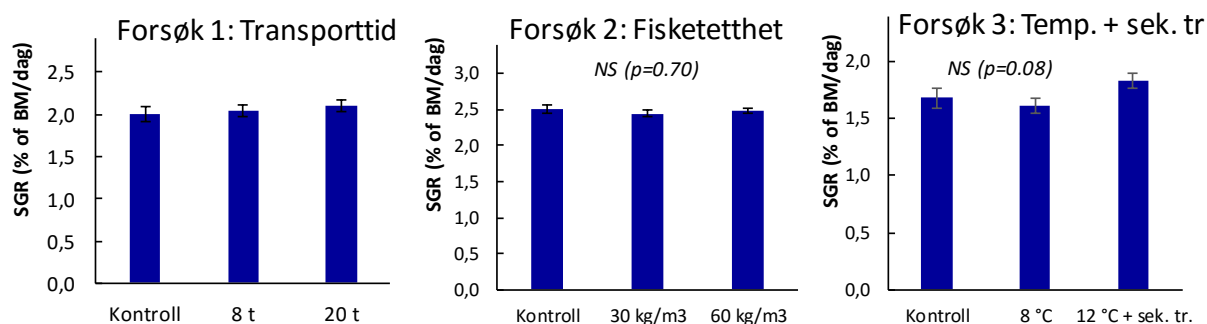


Fig. 7. Gjennomsnittlig spesifikk vekstrate (SGR, % av biomasse per dag,  $\pm$ SE) i løpet av 26-28 dager etter simulering av transport av rognkjeks. Rognkjeks ble transportert ved normale transportbetingelser (8 °C, 8 t, 30 kg/m<sup>3</sup>; alle forsøk), økt transporttid (20 t, Forsøk 1), økt fisketetthet (60 kg/m<sup>3</sup>, Forsøk 2), økt temperatur (12 °C) + sekundærtransport (1.5 t), og ble sammenlignet med en kontrollgruppe som kun ble overført til et tilsvarende, nytt holdekar ved transportstart (Kontroll; 8 °C, 7 kg/m<sup>3</sup>).

#### 2.4.2 Kronisk stress og stresssensitivitet

Ved slutten av Forsøk III, ble det gjennomført en stresssensitivitetstest for å undersøke om transportforholdene førte til kronisk stress hos rognkjeks, målt 29 dager etter transport. Resultatene er vist i Figur 8. Det var ingen forskjeller i plasmakortisolkonsentrasjoner mellom gruppene ved start. Suppresjon av kortisolproduksjon ved hjelp av en kortisol-analog (dexametason-injeksjon) førte til en nær total inhibering av kortisolproduksjonen (konsentrasjoner under deteksjonsområdet til analysekit, dvs. < 20 ng/ml) i alle grupper. Stimuleringen av kortisolproduksjon (ACTH-injeksjon) førte til kortisolnivå i plasma som var langt høyere enn nivåene observert under transport i alle grupper (ca. 150 ng/ml). Disse resultatene tyder på at rognkjeks ikke var preget av kronisk stress 29 dager etter transportstress. I forsøk med laks er det vist at både ACTH-sensitivitet, baseline plasmakortisolnivå og negativ feedback på hypofysen var påvirket hos kronisk stresset fisk (Iversen og Eliassen 2013). Restituering etter transportstress ser derfor ut til å være fullført før 29 dager har gått hos rognkjeks. De høye kortisolnivåene etter ACTH-injeksjon kan også tyde på at stressorene rognkjeks blir påvirket av under transport er moderate, og /eller at produsert rognkjeks er habituert til denne typen stress.

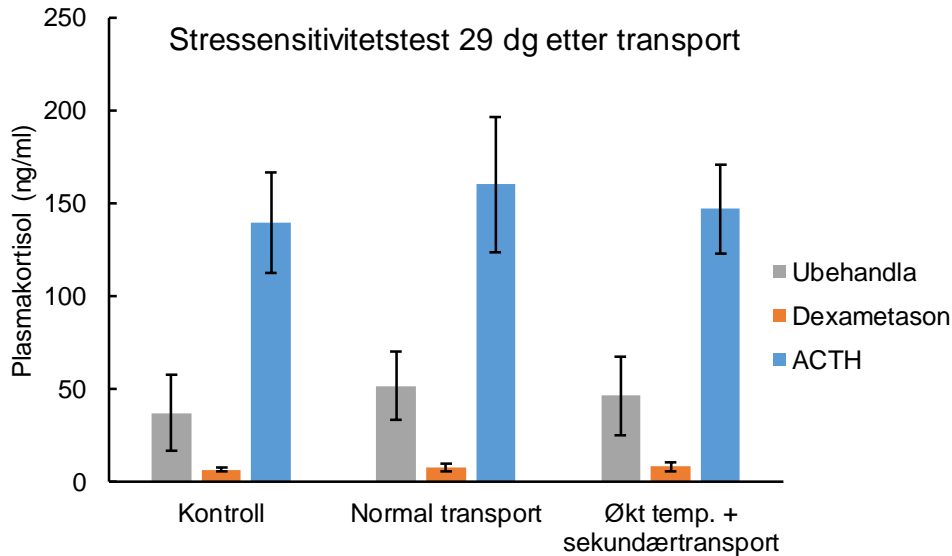


Fig. 8. Gjennomsnittlig plasmakortisolkonsentrasjon (ng/ml,  $\pm$ SD) hos ubehandla rognkjeks, og hos rognkjeks injisert med enten dexametason eller ACTH, for å blokkere eller stimulere HPI-aksen, henholdsvis. Denne målingen ble gjort 29 dager etter at tre grupper rognkjeks ble utsatt for overføring til nytt kar (kontroll), 8 timers normal transport (se Tabell 1) eller transport med høy temperatur ( $12^{\circ}\text{C}$ ), kombinert med 1.5 t sekundærtransport.

### 3 Sammendrag

#### 3.1 Konklusjoner- akutte effekter av transportbetingelser

- Normale transportbetingelser fører til en stressrespons hos rognkjeks.
- Plasmakortisol er en egnet indikator for stress, og akutt effekt på plasma pH følger lignende mønster.
- Det trengs mer basiskunnskap om rognkjeksas regulering av indre homeostase for å kunne tolke deler av resultatene (f.eks plasma pH, klorid, osmolaritet, glukose og laktat).
- Håndteringen ved overføring til transportkar er en hovedstressor ved normale transportbetingelser.
- Kombinasjonen av øvrige forhold under normal transport (fisketetthet, vannkvalitet, oksygenering, lufting osv.) bidrar til å forsterke og forlenge stressresponsen.
- Rognkjeks er følsom for høy fisketetthet, men ser ut til å tåle moderate variasjoner i transporttid (8-20 t), temperatur (8-12  $^{\circ}\text{C}$ ), oksygenmetning (100-150%  $\text{O}_2$ ) og størrelse (30-60 g) uten nevneverdige endringer i fysiologisk respons.
- 24 timer etter transport var rognkjeks restituert, ifølge fysiologiske parametere.
- Rognkjeksas stressrespons nedreguleres i løpet av langvarige transporter (> 4 t). Det ser ut til at respons ved eksponering for ny stressor dempes på grunn av dette.

#### 3.2 Konklusjoner- langtidseffekter

- Tertiære stressresponser, i form av vekst og dødelighet, var ikke negativt påvirket av transportbetingelsene.
- Det var ingen tegn til kronisk stress 29 dager etter transport.
- Fraværet av tertiære effekter tyder på at rognkjeks kan tolerere akutt, moderat stress, når betingelsene i etterkant er optimale.

- En kombinasjon av ulike stressorer, samt langvarig stress kan potensielt gi tertiære effekter og bør undersøkes.

### 3.3 Anbefalinger

- Viser til transportveileder for praktiske anbefalinger.
- Følgende tema bør studeres nærmere for å muliggjøre en bedre overvåking av funksjon og velferd: sekundærrespons ved stress, toleranse for variasjon i vannkvalitetsparametre, effekt av akkumulert eller langvarig stress.

## 4 Referanser

- Bagni, M., Civitareale, C., Priori, A., Ballerini, A., Finoia, M., Brambilla, G., & Marino, G. (2007). Pre-slaughter crowding stress and killing procedures affecting quality and welfare in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 263(1), 52-60.
- Barton, B. A. (2002). Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and comparative biology*, 42(3), 517-525.
- Evans, D. H., Piermarini, P. M., & Choe, K. P. (2005). The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological reviews*, 85(1), 97-177.
- Barton, B. A., & Iwama, G. K. (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*, 1, 3-26.
- Frantzen, M., Hansen, B. H., Geraudie, P., Palerud, J., Falk-Petersen, I. B., Olsen, G. H., & Camus, L. (2015). Acute and long-term biological effects of mechanically and chemically dispersed oil on lump sucker (*Cyclopterus lumpus*). *Marine environmental research*, 105, 8-19.
- Hammon T.S. (2009). Methods for reducing stressors and maintaining water quality associated with live fish transport in tanks: a review of the basics. *Reviews in Aquaculture* 1, 58–66. doi: 10.1111/j.1753-5131.2008.01003.x58 a
- Houde E.D. & Scheckter R.C. (1981) Growth rates, rations and cohort consumptions of marine fish larvae in relation to prey concentration. *Rapports et Proces-Verbaux des Reunions, Conseil International pour L'Exploration scientifique de la Mer Medeterranee* 178, 441–453.
- Iversen M. H. & Eliassen R. A. (2013). The effect of allostatic load on hypothalamic–pituitary–interrenal (HPI) axis before and after secondary vaccination in Atlantic salmon postsmolts (*Salmo salar* L.). *Fish physiology and biochemistry*, 40(2), 527-538.
- Misimi, E., Erikson, U., Digre, H., Skavhaug, A., & Mathiassen, J. R. (2008). Computer Vision- Based Evaluation of Pre- and Postrigor Changes in Size and Shape of Atlantic Cod (*Gadus morhua*) and Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Fillets during Rigor Mortis and Ice Storage: Effects of Perimortem Handling Stress. *Journal of food science*, 73(2), E57-E68.
- Moyle P.B., Cech J.J. Jr (1988) *Fishes: An Introduction to Ichthyology*. Prentice Hall, Englewood Cliffs.
- Nytrø, A. V., Vikingstad, E., Foss, A., Hangstad, T. A., Reynolds, P., Eliassen, G., Imsland, A. K. (2014). The effect of temperature and fish size on growth of juvenile lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.). *Aquaculture*, 434, 296-302.
- Perry, S. F., & Gilmour, K. M. (2006). Acid–base balance and CO<sub>2</sub> excretion in fish: unanswered questions and emerging models. *Respiratory physiology & neurobiology*, 154(1), 199-215.
- Pottinger T.G., Carrick T.R., 1999. Modification of the plasma cortisol response to stress in rainbow trout by selective breeding. *Gen. Comp. Endocrinol.* 116(1): 122–132. doi: 10.1006/gcen.1999.7355
- Remen M., Oppedal F., Torgersen T., Imsland A. K. & Olsen R. E. (2012). Effects of cyclic environmental hypoxia on physiology and feed intake of post-smolt Atlantic salmon: initial responses and acclimation. *Aquaculture*, 326, 148-155.
- Terjesen B.H., Rosten T.W, Ulgenes Y., Henriksen K., Aarhus I.J, Winther U. (2013). Betydning av vannmiljøet ved produksjon av laksefisk i lukkede systemer i sjø. Vann 01-2013, Vannforeningen. <http://vannforeningen.no/dokumentarkiv/betydning-av-vannmiljoet-ved-produksjon-av-laksefisk-i-lukkede-systemer-i-sjo/>
- Tudorache C., O'Keefe R. A. & Benfey T. J. (2010). Flume length and post-exercise impingement affect anaerobic metabolism in brook charr *Salvelinus fontinalis*. *Journal of Fish Biology*, 76(3), 729-733.
- Turner J. D., Wood C. M. & Höbe H. (1983). Physiological consequences of severe exercise in the inactive benthic flathead sole (*Hippoglossoides elassodon*): a comparison with the active pelagic rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Experimental Biology*, 104(1), 269-288.



- Veiseth, E., Fjæra, S. O., Bjerkeng, B., & Skjervold, P. O. (2006). Accelerated recovery of Atlantic salmon (*Salmo salar*) from effects of crowding by swimming. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 144(3), 351-358.
- Waring C. P., Stagg R. M. & Poxton M. G. (1996). Physiological responses to handling in the turbot. *Journal of Fish Biology*, 48(2), 161-173.
- Wedemeyer G.A. (1996). *Physiology of Intensive Culture Systems*. Chapman and Hall, New York.
- Wendelaar Bonga S.E. (2011) Hormonal responses to stress. In: *Encyclopedia of Fish Physiology* (ed. A. Farrell). Academic Press, San Diego, pp. 1515-1523.
- Wood C. M., McMahon B. R. & McDonald D. G. (1977). An analysis of changes in blood pH following exhausting activity in the starry flounder, *Platichthys stellatus*. *J. Exp. Biol.* 69, 173—185
- Wood C. M., McDonald D. G & McMahon B. R. (1982). The influence of experimental anaemia on blood acid-base regulation *in vivo* and *in vitro* in the starry flounder (*Platichthys stellatus*) and the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. exp. Biol.* 96, 221-237.
- Øverli, Ø., Sørensen, C., Kiessling, A., Pottinger, T. G., & Gjøen, H. M. (2006). Selection for improved stress tolerance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leads to reduced feed waste. *Aquaculture*, 261(2), 776-781.

## 5 Del III: Veileder for håndtering og transport

Bransjeveileder lakselus					
Tema:		Veileder til beste praksis:			
Rensefisk		Håndtering og transport av rognkjeks			
Dok. id:		Utarbeidet av:	Kontaktperson:	Dato:	16.02.2017
Versjon:	0.0.2	Akvaplan-niva	Thor Magne Jonassen	Side:	Side 50 av 74

### 5.1 Bakgrunn og formål:

Veilederen har som hovedmål å gi anbefalinger til prosedyrer for håndtering- og transport av rognkjeks basert på analysering av fiskens stressrespons på forskjellige transportbetingelser undersøkt i det FHF-finansierte prosjektet "Utvikling av transport- og mottaksprosedyrer for rognkjeks basert på kartlegging av miljø og stress" (prosjektnummer 901158). Veilederen er et bidrag til bedre rognkjeksens velferd, overlevelse og funksjon som lusespiser i laksemerder etter transport.

Dette er en veileder for lukket transport av rognkjeks som kun gir anbefalinger, mens selve prosedyrene må utvikles lokalt i hver enkel bedrift eller for hvert anlegg for å sikre de lokale tilpasningene med hensyn til miljø, utrustning osv.

### 5.2 Spesielle forhold:

Veilederen bygger på systematiske kartlegginger av transportforhold og fysiologisk respons på håndterings- og transportstress både i felt og kontrollerte forsøk samt innspill fra oppdrettere, veterinærer og transportører. Tre områder som bør ha spesielt fokus i prosedyreutvikling for transport av rognkjeks er:

- 1) Rognkjeksens spesielle stressadferd (trykking eller fastsuging til overflater) gjør det vanskelig å skille ustresset og stresset fisk, siden den ikke viser en typisk flykt-respons som en kjenner fra laks. En er derfor avhengig av å måle stress fysiologisk for å avdekke responsen. En rognkjeks med "rolig" adferd kan være stresset. Der en mangler konkret kunnskap om rognkjeks bør en benytte samme prinsipp og grenseverdier som for laks.
- 2) Stress og eventuelle fysiske påkjenninger (slimtap og skader) i forbindelse med håndtering (opplasting og lossing fra transportkar) ble registrert som viktige stressfaktorer for rognkjeks, og spesielt gjentatte håndteringer i løpet av kort tid ofte i forbindelse med sekundærtransport som krevde omlasting av fisk. Utvikling av raske og mer skånsomme laste- og lossemetoder bør ha høy prioritet. Eller enda bedre, en bør se på metode og teknologi som kan redusere

antall håndteringer under transport, primært ved å unngå omlasting av fisk til sekundærtransport.

- 3) Rognkjeksene er ny i oppdrett og en har bare så vide skrappt i overflaten på en svært annerledes art enn det en er vant med i oppdrett. Det er derfor viktig å inkludere i prosedyrer gode rutiner for avviksrapporing, loggføring og systematisering av data og bruke dette i kunnskaps- og kompetanseutvikling. Aktiv bruk av avvikssystemer er de beste lærings- og forbedringsmetodene en har.

## 5.3 Beskrivelse

### 1. Prosedyreutvikling

*Denne veilederen er kun ment som innspill og anbefalinger til prosedyrer for håndtering og transport av rognkjeks. Utvikling av egne prosedyrer må ta hensyn til:*

- **Krav til risikokartlegging:** Prosedyrer skal i henhold til forskrift IK-Akvakultur (<https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2004-03-19-537>) utvikles for de enkelte anlegg/lokaliteter og baseres på egen risikovurdering. Overordnede hensyn er ytre miljø (f.eks. rømming) bio-sikkerhet, fiskevelferd og HMS.
- Anleggsspesifikke avtaler som skal gjøres mellom leverandør og mottaker, veterinær, transportør, samt spesifikasjoner f.eks. i forhold til kvalitet på fisken og gjennomføring av transporten kan inn i prosedyrer
- Det anbefales å vedlegge en sjekkliste for å sikre at alle relevante hensyn er tatt med i planlegging og gjennomføring av en transport.
- Det settes også klare krav til fisketransportør som er oppdretters ansvar å følge opp. Disse er kort referert i Vedlegg: 1.

### 2. Planlegging

#### Tidlige avtaler:

- Allerede ved avtaleinngåelser om levering av fisk bør en definere de viktigste parameterne som påvirker kvaliteten og sikkerheten av leveransen.  
*Eksempler på dette er transportmetode/transportør, fiskestørrelse og antall fisk per leveranse (tetthet under transport), leveringssted (transporttid) og gjerne leveringstidspunkt (temperatur). Jo tidligere dette er tatt hensyn til jo enklere er det å gjennomføre en god transport.*

#### Klargjøring for levering:

- I god tid før levering må utstyr og internlogistikk for klargjøring av fisk og opplasting til bil gjennomgås, og utstyr som leveringskar, pumper, slanger, koplinger, sikring mot rømming, telleapparat osv. sjekkes og evt. testes.
- Det bør sjekkes om eventuelle tidligere avvik er lukket/forbedret.
- Oksygen- og temperaturmålere bør oversees og kalibreres.
- Hvis mulig bør en planlegge og tidlig gjøre grep for minst mulig miljøsprang gjennom hele transportprosessen, spesielt mhp temperatur.

## 5.3 Beskrivelse

- Dersom det er behov og mulighet for temperatur-akklimering av hensyn til transporten eller for tilvenning til temperaturen ved utsett i sjø bør dette starte gjerne en uke før transport.
- Det må sikres tilstrekkelig og erfaren bemanning med klar ansvarsfordeling gjennom hele transportprosessen

### 3. Forberedelse

#### Klargjøring av bil før opplasting:

- Transportør må ha dokumentert renhold og desinfeksjon av transportkar og kalibrering av loggeutstyr for pH, temperatur og oksygen i bil.
- Det er satt myndighetskrav (Vedlegg: 1) om at sjåfør skal ha kompetanse for å ivareta fiskens fysiologiske behov, vannkvalitet og velferd. Oppdretter må forsikre seg om at transportør har denne kompetansen.

#### Forberedelser for mottak:

- I god tid før levering må det opprettes god kommunikasjon og ansvarsfordeling mellom transportør og mottaker for å sikre riktig bemanning, utstyr og metode for en raskest mulig lossing av fisken. De må avtales mellom transportør og mottaker hva slags utstyr som skal være tilgjengelig ved mottak.  
*F.eks. gjelder dette transportslanger (riktig lengde) og koplinger, vannavskiller, fiskepumpe (hvis behov) osv. med riktige dimensjoner. Det må avtales ankomststed og sikres tilkomst for transportbil til losseplass og også avtales bemanning og estimert tidsforbruk for lossing. Transportør må bli informert om forhold som tidevannsforskjeller, værforhold osv.*
- Mottaker må planlegge og forberede mottak i forhold til klargjøring av merd (f.eks. maskestørrelse i forhold til fiskestørrelse) uttak av fisk for kvalitetskontroll (mottakskontroll) og håndtering av avvik, samt veterinæroppfølging.

#### Spesielt for rognkjeks:

#### Klargjøring av bil:

Det er en oppfatning hos rognkjeksoppdretter at mørke tanker er mest optimalt for transport av rognkjeks og at fisken bør holdes mest mulig i mørke under transport for å redusere aggresjon som kan føre til økt stress og finnebiting. Husk at fisken er sultet før transport og at dette i seg selv kan føre til økt aggresjon.

- Hvis mulig bør transportør benytte mørke tanker og holde fisken mest mulig mørkt under transport. Eventuelle inspeksjonsluker bør dekkes til.

## 5.3 Beskrivelse

### Fastmonterte målesonder i vann:

- Rognkjeksen vil kunne feste seg til målesonder i kar og påvirke måleresultatene. For å unngå avvikende verdier på miljølogging under transport bør målesondene i transportkarene være beskyttet med f.eks. grovasket plastnett eller annet som hindrer rognkjeksen å sette seg på målesondene.

## 4. Gjennomføring

### Klargjøring av fisk

#### Fiskebiomasse og kvalitet:

*God kontroll med fiskebiomasse er en forutsetning for god og kontrollerbar transport siden mengde fisk som kan transporteres begrenses av fiskebiomassen.*

- **Gode data på fiskestørrelse og antall er derfor et minimumskrav.**

*Godt sortert fisk er også en fordel. God kontroll kan oppnås ved bruk av fisketeller eventuelt telling under vaksinerings og god kontroll med dødelighetstall frem til levering.*

*Ofte holdes fisken i større kar frem til levering, og fisken må da telles igjen via fisketellere eller biomassen må beregnes volumetrisk (ved avlesning av en skalert og kalibrert vannsøyle avlest på et pleksiglassrør på transporttanken) for å ha kontroll med fiskebiomassen i hvert transportkar. Eventuelt kan fisken med fordel telles opp på forhånd i ett separat leveringskar for hvert transportkar. En vil da unngå en ny telling ved opplasting og en vil oppnå en raskere og mer skånsom opplasting.*

- **Yngel og settefisk bør telles og eventuelt sorteres ca. 1 uke før levering og overføres til leveringskar slik at fisken ikke utsettes for ny håndtering før den opplastes på bil.**
- **I forkant av transporten må det foretas veterinærkontroll av fisken. Helse- og opprinnelsesattest etter skjema fastsatt av Statens dyrehelsetilsyn skal foreligge før transport (Vedlegg: 1). Attesten er gyldig i 21 dager etter inspeksjon.**

*I tillegg kan det fra kunden kan det kan være ønskelig med PCR-analyser av fiskens bærerstatus for utvalgte patogener ved spesielle behov og krav fra leverandøren som bør foreligge før transporten. Dødelighet de siste 30 dager før transport bør registreres og følge fisken sammen med annen produksjons- og behandlingshistorikk (CV).*

- **Dersom fiskens dødelighetsutvikling eller helsestatus endres eller det skjer atferdsendringer på fisken kort tid før levering (etter siste veterinær rapport) bør veterinær tilkalles og kunden varsles.**

*Syk fisk eller fisk med avvikende adferd som en mistenker kan være tegn på sykdom eller fisk med høy grad av sår eller finneslitasje bør ikke transporteres.*

## 5.3 Beskrivelse

### Sulting:

*Det er viktig å sulte fisk før transport for å redusere miljøbelastningen.*

*Problemene er knyttet til avføring i transportkaret, i tillegg til at metabolismen og dermed oksygenforbruket og utskillelsen av CO<sub>2</sub> og ammoniakk nedreguleres slik at miljøbelastningen under transport reduseres. Sulting bidrar også til at fisk takler selve håndteringen bedre. Forurensinger fra avføring kan gi misfarging av vannet, skumdannelse og fine partikler i vannet som kan klogge til gjellene på fisken og føre til gjelleirritasjoner og risiko for redusert oksygenopptak og regulering av saltbalansen. Økt organisk belastning i vannet gir også bedre forhold for bakterievekst. Hvor lenge en sulter fisk avhenger av art, størrelse og temperatur.*

- **Sulting er spesielt viktig ved lange transporter. For slakteklar laks kan det være snakk om opp mot en uke, mens yngel og smolt gjerne sultes 2-3 dager.**

*For fisk som vekselvarme dyr er det vanligvis behov for lengre sultetid ved lave temperaturer enn ved høyere temperatur. Hvor lenge det er forsvarlig å sulte fisken beror på eventuelle negative effekter på fiskevelferd (stress, utvikling av aggresjon og finnebiting) og økonomi (tap av biomasse).*

### Spesielt for rognkjeks:

### Sulting:

- **Sultetid: En anbefaler 2-3 dager sulting av liten rognkjeks (30-60 g) i mørke ved ca. 8 °C før transport for å redusere miljøbelastningen under lukket transport.**

*Sultperiode bør ta hensyn til størrelse og temperatur (redusert sultperiode ved høyere temperatur og mindre fiskestørrelse). Selv om en sulter lenge kan fisk fremdeles ha avføring i tarmen fordi fordøyelsessystemet nedreguleres sammen med den øvrige metabolismen.*

- **Lysintensitet under sulting: Det er et vanlig problem med aggresjonen og finnebiting på sulten fisk. Oppdrettere har erfaring med at dette kan reduseres ved å rognkjeks i mørke i perioden den ikke føres.**

*Det har vært målt plasmakortisol hos rognkjeks som indikator på akutt stress før sulting og henholdsvis 2 og 3 dager etter sulting i mørke ved ca. 8 °C uten at det påvirket stressnivået. Oppdrettere har også god erfaring med sulting 3-4 dager med dempet lys.*

## Opplasting på bil

- **Bio-sikkerhet: Før oppstart må bio-sikkerheten sikres ved at transportør dokumenterer forskriftsmessig renhold og desinfeksjon av bil og transportkar og leverandøren følge interne prosedyrer for bio-sikkerhet.**
  - Dette er den viktigste forutsetningen for å hindre spredning av smitte.

## 5.3 Beskrivelse

- **Kalibrering:** Transportør må før opplasting også fremvise dokumentasjon på riktig vedlikehold og kalibrering av alt påkrevd loggeutstyr for vannkvalitet (oksygen, pH og temperatur).
- **Vannkvalitet:** Før opplasting fylles transportkarene med vann fra en kilde kjent fritt for patogener, og av mest mulig like salinitet og temperatur som det fisken er akklimatisert til, fortrinnsvis av samme råvannskilde som yngelanlegget.
  - *Vannet kan med fordel være filtrert (minimum 60 µm), UV-behandlet og luftet. Kunnskap om UV-dose og justering i forhold til eventuelle patogener en er kjent med fra anlegget er viktig. For eksempel trengs en dose på minimum 2 mJcm<sup>-2</sup> mot amøben Neoparamoeba perurans som er et kjent problem hos rensefisk.*
  - *Oksygenerings- og luftesystemet i transporttankene testes før opplasting og følges tett opp under hele opplastingen for eventuelt regulering til 100% oksygenmetning. Vannmiljøet registreres og journalføres regelmessig (eventuelt logges automatisk) fra starten av opplastingen.*
- **Sikring mot rømming:** Før all flytting av fisk må en sikre anlegg og prosessen i forhold til rømming av fisk, f.eks. dobbeltsikring av koplinger av transportslange og vannavskiller, og plassering av siler på avløp.
- **Avsilingsystem:** Siden transporttankene er fylt opp på forhånd med rent vann benyttes avsilingsrist ved overføring til transportkarene slik at en ikke får innblanding av produksjonsvann fra leveringskarene som kan forringe vannkvaliteten (har forhøyede nivåer av CO<sub>2</sub> og totalammoniakk (TAN)).
- **Trenging og opplastingstid:** Total opplastingstid bør gjøres så kort som mulig.
  - *For laks er det vist at trening over tre timer gir en stressrespons som varer lengre enn kortere trening. Ved fordeling av fisken på flere og mindre leveringskar vil en lettere få til rask tømming av karet og skånsom behandling av fisken (mindre sammentrening), og samtidig minimal opplastingstid for hele transporten. Erfaringer viser at siste opplastede transporttank på hengeren ofte er "verst" (tåler transporten dårligst).*
  - *Rognkjeksken har pigger og det kan lett utvikles sårskader dersom den trenges for kraftig. I større kar kan det være behov for trengerist. Det bør hele tiden være vannutskifting i karet under trening og pumping, og mulighet for tilleggsoksygenering for å sikre oksygenmetning rundt 100%. Alle bevegelse må skje sakte og skånsomt.*
- **Pumping:** Riktig bruk av fiskepumpe og fisketeller i henhold til velprøvde prosedyrer og utstyr er viktig for å unngå slimtap, sår og skader på fisken som kan gi innfallsport til infeksjoner og økt dødelighet.

*Viktige momenter er riktig hastighet på fiskepumpen og riktig dimensjonering av pumpe og transportslange i forhold til fiskestørrelse. Skader oppstår spesielt ved gjentatt pumping, underdimensjonert pumpe, feilkonstruksjoner og feil montering av pumper og slanger med kanter, ventiler og krappe vinkler på rør. Det er ikke gjort undersøkelser for rognkjeks, men for laksesmolt er det vist at ettersom pumpehastighet øker (0,9 m/s < 1,4 m/s < 2,3 m/s) får en økende skjelltap, og det ble ikke anbefalt å pumpe smolt raskere enn 2,3 meter per sekund.*

## 5.3 Beskrivelse

- **Håving:** Håving gir vanligvis mer stress enn pumping, og høyere risiko for slimtap og sår som kan påvirke fisken negativt etter sjøutsett. Dersom en er avhengig av håving bør dette skje med presennings-håv (våt-håving). Håv med knytet not må aldri benyttes. Det må sikres at erfarent og trent personell er involvert i prosessen.
- **Bruk av sedasjon:** Det er noe usikkerhet rundt bruken av sedasjon for å redusere stress under håndtering gjør fisken.
  - *For laks har det vært anbefalt ved situasjoner med mye stress, men det advares mot gjentatt og langvarig bruk.*

- **Kontroll av oksygen:** Under opplasting bør en person (vanligvis transportør) være dedikert kontinuerlig måling og justering av oksygen i transportkarene. Oksygennivået bør ligge mest mulig stabilt rundt 100% metning.

*I forbindelse med opplastingen vil vanligvis aktivitetsnivået på fisken øke og en risikerer store svingninger i oksygenmetningen i transportkarene dersom en ikke klarer/rekker å justere for dette. Samtidig vil oksygenforbruket gjerne variere mellom transporttankene pga. forskjellig opplastingstidpunkt/akklimeringstid. Ikke alle transportører har oksygensonder i alle transportkarene som gir automatisk logging.*

*Både overmetning og undermetning av oksygen kan gi dårlig fiskevelferd. Giftigheten av ammoniakk øker med redusert oksygennivå, og høye oksygennivå kan gi oksidativt stress samt redusere ventilasjonsraten (pustefrekvensen) og dermed redusere utluftingen av CO<sub>2</sub> fra blodet (føre til hyperkapnia og redusert pH i blodet).*

### Spesielt for rognkjeks:

- **Trenging og pumping:** Det anbefales at ned-tapping av kar, trenging og pumping av fisk over til transportkar gjøres mest mulig skånsomt og hurtig. Det bør utarbeides detaljerte lokalt tilpassede prosedyrer som beskriver hvordan dette gjøres optimalt.

*En utfordring med rognkjeks når den blir stresset er at den fester seg til overflater, både i kar og transportslinger, og kan være vanskelig å få løs. Metoden bør basere seg på at dette ikke skjer, for å unngå at en må bruke kost eller en kraftig vannstråle for å dytte fisken løs.*

*Selv om rognkjeks ikke viser en "klassisk" stressrespons som laks med økt svømmeaktivitet og flykt-adferd, men har en "trykke-adferd" hvor den suger seg fast til overflater, viser rognkjeks en klar akutt stressrespons målt som økning i stresshormonet kortisol når den stresses. Ved måling av plasmakortisol under kommersielle transporter er det vist at stress utløses ved håndteringen i forbindelse med opplasting for transport (primært trenging og pumping), og at dette utgjør den største stressbelastningen i forbindelse med transport (Jonassen m.fl. 2017). Overføring av rognkjeks fra leveringskar til transportkar på bil ved bruk av fiskepumpe via fisketeller viste at denne prosedyren medførte en dobling av plasmakortisol fra gjennomsnittlig 24 ( $\pm$  22 SD) til 49 ( $\pm$  29 SD) ng/ml.*

*Også en serie kontrollerte forsøk på rognkjeks (Remen m.fl. 2017) har vist at maksimal stressrespons oppstår i forbindelse med opplasting, hvor stresshormonet kortisol økte i snitt fra 27 til 83 ng/ml i løpet av den første timen (data fra 5 forsøk). Etter dette sank nivået gradvis til 53 ng/ml i løpet av 8 timers*



## 5.3 Beskrivelse

transport, på tross av at vannkvaliteten gradvis ble redusert i denne perioden. En økning i plasmakortisol (57 ng/ml) ble også observert etter 1 t hos rognkjeks som kun ble utsatt for en forflytning mellom to identiske oppdrettskar, men i motsetning til transportgruppene var økningen mer moderat og nivået av plasmakortisol sank raskt i løpet av de neste timene.

- **Pumpehastighet:** Det er viktig å hold konstant god vanngjennomstrømning i transportslangene for å hindre at fiske suger seg fast.
  - Pumpehastighet kan være kritisk for stress, og ikke minst risikoen for slimtap og skader på fisken. En har ikke kunnskap om optimal pumpehastighet for rognkjeks.
- **Telling:** Det anbefales at all fisk telles på forhånd og at fordeling av biomasse mellom transportkarene skjer ved volumetrisk avlesning av biomasse i hvert kar.
  - Det er varierende erfaring med telling av rognkjeks, og spesielt rapporteres det om tidkrevende telling, noe som er problematisk i forhold til at opplastingen bør gå raskt.
- **Sedasjon (lett bedøvelse):** Sedasjon bør benyttes med forsiktighet og bør ikke inngå i en foretrukket strategi i forhold til å effektivisere opplasting til transport.
  - Sedasjon blir benyttet av enkelte oppdrettere i forbindelse med håndtering av rognkjeks for at å hindre at den suge seg fast, mens andre oppdretter har erfaring med at sedasjon nettopp øker problemet med fastsuging. Det er indikasjoner på at sedasjon ved bruk av Aqui-S kan medføre økt stress hos rognkjeks, men dette bør undersøkes nærmere. Dose som har vært vanlig å benytte for sedasjon er 4 mg/m<sup>3</sup>.
  - For korte sekundærtransporter er det en mulighet for at sedasjonen kan ha virkning etter overføring til merd og dermed påvirker tilvenningen i merden. Effekten av dette vet en ikke.
- **Tilleggsdokumentasjon:** Det anbefales derfor spesielt å registrere sårstatus på fisken både før og etter transport, gjerne i tillegg til andre lyter.

En er i en tidlig utviklingsfase for rognkjeks og det er behov for systematisk innhenting av data. Det er usikkerhet om hva som er årsak til finneslitasje og sår på utsatt rognkjeks

## Transport på bil

Generelt: Endringer i vannkvalitet er den største utfordringen under lukket transport, og den faktoren som påvirker denne mest er fiskens metabolisme (forbrenning). I lukket transport må en derfor sette inn tiltak som reduserer metabolismen, ved hjelp av endring i biomassetetthet og temperatur. Uten vannutskifting skjer det en akkumulering av metabolitter som totalammoniakk (TAN) og CO<sub>2</sub>, økning i partikler fra avføring og slim o.l. (TOC = total organisk karbon) og reduksjon i pH. Andelen TAN som foreligger i giftig form som fritt ionisert ammoniakk (NH<sub>3</sub>) øker med økende pH. PH er påvirket av akkumuleringen av CO<sub>2</sub>, som skiller ut av fisken raskere enn TAN, men akkumuleres seinere siden god utlufting av vannet lufter ut en stor andel CO<sub>2</sub>. Redusert pH (ved økt CO<sub>2</sub>) bidrar til mindre andel giftig ammoniakk (en mindre andel av TAN foreligger som giftig fritt ammoniakk).

For praktisering av god fiskevelferd under transport er det viktig med god kunnskap om hva som forårsaker variasjoner i vannkvalitet og hvordan de påvirker fisken. En kort beskrivelse av betydningen

## 5.3 Beskrivelse

av de viktigste vannkvalitetsparameterne under transport og anbefalte grenseverdier for forskjellige miljøparameter er gitt i

Vedlegg: 2.

- **Akseptabel transporttid må ses i sammenheng med risikoen for dårlig vannkvalitet som øker med temperatur, biomasse og transporttid regnet fra start opplasting til ferdig losset.**  
*Den største stressbelastningen i forbindelse med transport er trenging og opplasting på bil. Når fisken er overført til transportkar vil den med tiden stresse ned så lenge vannkvaliteten er gunstig. Korte transporter med kort tid mellom håndtering (opplasting, lossing og overføring til nytt miljø) øker risikoen for akkumulering av stress, mens lengre transporter gir fisken bedre sjanse til å stresse ned før en ny håndtering (lossing).*
- **Hvis mulig bør en planlegge (langsiktig) slik at en unngå svært lange transporter mellom yngelanlegg og utsettingssted.**  
*Regulering av temperatur og fisketetthet påvirker toleransen for lange transporter ved at lavere temperatur og lavere tetthet hver for seg eller i kombinasjon gir mulighet for økt transporttid.*

Regulering av vannkvalitet under transport: Kontroll med vannkvalitet under lukket transport er først og fremst avhengig av god forberedelse som tilstrekkelig sulting, lav tetthet i kar, temperaturregulering av vannet o.l. Reguleringsmulighetene under transport er justering av O<sub>2</sub>, som bør ligge stabilt på 100%, og regulering av lufting av vannet. Reduseres pH raskt bør luftingen økes.

- **Ved lange transporter der TAN kan bli høy er det spesielt kritisk å holde kontroll med pH, bl.a. gjennom regulering av luftingen, for å holde ammoniakk-konsentrasjonen lav. Ved fare for høy TAN bør pH i vannet ligge ned mot pH 7,1**  
*Ser en fare for høye ammoniakk-konsentrasjonen kan luftingen reduseres for å senke pH slik at andelen giftig ammoniakk reduseres. En bør i slike situasjoner være ekstra obs på risikoen for økt CO<sub>2</sub>-konsentrasjonen.*
- **Reduser transporttiden i perioder der temperaturen er høy.**  
*Temperatur spiller også inn på transporttiden både gjennom påvirkning av metabolismen og toleransen for ammoniakk. Metabolismen og utskillelsen av TAN øker med økende temperatur, samtidig som giftigheten av ammoniakk på fisk er høyere ved lav temperatur enn ved høy. Generelt har en tryggere marginer for transport ved lav temperatur enn ved høy (innenfor fiskens toleransegrenser for temperatur) fordi fisken da skiller ut mindre ammoniakk, men vær også obs på at toleransen for ammoniakk reduseres med redusert temperatur.*
- **Risikoer knyttet til sesongvariasjoner bør vurderes spesielt før lange transport der påvirkningen fra klimaet er størst**  
*Sesong og værforhold: Det kan oppstå sesongavhengige situasjoner under transport der en enten får uønskede høye temperaturer sommerstid som er problematiske i forhold til akkumulering av ammoniakk, og tilsvarende om vinteren med lave temperaturer der toleransen for ammoniakk reduseres. Ved risiko for temperatursvingninger bør tettheten under transport reduseres.*

## 5.3 Beskrivelse

- **Fiskestørrelse og tetthet:** Stor fisk skille generelt ut mindre TAN enn liten fisk. For å kompensere på dette vil en normalt sett redusere biomassen for liten fisk under transport sammenlignet med stor fisk.

*Anbefalt tetthet for forskjellige fiskestørrelser varierer med bl.a. art, temperatur, kontroll og regulering av vannkvalitet, transporttid og fiskens robusthet. En bør derfor legge inn god sikkerhetsmargin.*

- **Kontroll av vannkvalitet:** Det er forskriftsmessige krav om automatisk overvåking og logging av oksygen i lukket transport. Dette bør gjøres i flere tanker, og spesielt i transportkar med høy fisketetthet.

*Det anbefales også automatisk regulering av oksygen. Oksygennivået under lukket transport er relativt enkelt å regulere til omkring det optimale på ca. 100% metning gjennom oksygenering i kombinasjon med lufting. Luftingen gjør det enklere å stabilisere oksygen ved at overskuddsoksygen luftes ut.*

- **Utskifting av vann under transport:** Det anbefales ikke utskifting av vann i transportkarene under lukket transport.

*Grunnen er den store risikoen for akutt ammoniakkforgiftning som oppstår dersom "gammelt" transportvann med lav pH og høyt innhold av TAN blandes med "nytt" vann med høy pH. En får da økt pH i et vann med høyt innhold av TAN, noe som fører til en økning av mengden giftig ammoniakk.*

- **Tilsyn av fisk:** Det anbefales å sjekke fisken underveis mhp. avvikende adferd, skumming, partikler i vannet og andre avvik.

*Transportør må ha kunnskap nok til å gjøre justeringer og tiltak for å sikre fiskevelferden, og gjøre spesielle forberedelser ved levering samt sikre prøvetakinger ved levering for å avdekke årsaker til eventuelle avvik. Det er satt forskriftsmessige krav om at transportør skal ha kompetanse på fiskevelferd relatert til transport.*

- **Prøvetaking:** Bilen bør oppbevare flasker og kjemikalier for prøvetaking av vannkvalitet (TAN, CO<sub>2</sub>, pH, TOC) dersom det er behov for dokumentasjon etter transport og ved spesielle hendelser.

### Spesielt for rognkjeks:

*Vannkvalitet: En har ikke artsspesifikk kunnskap om vannkvalitetstoleranse for rognkjeks og grenseverdier. Oppnådd vannkvalitet i kontrollerte transportforsøk med rognkjeks er gitt i tabellen nedenfor. Stressresponsen hos rognkjeks i enkelte av disse forsøkene var muligens påvirket av vannkvalitet, men vannkvaliteten ble ikke ansett som problematiske siden fisken restituerte seg innen 24 timer etter transport. Tabellen representerer derfor sett av vannkvalitets-parametere som forventes tolerert av rognkjeks under de gitte transportbetingelsene.*

## 5.3 Beskrivelse

Tabell: Endring i vannkvalitet ved avsluttet transport som følge av endringer i transportbetingelsene. Standard betingelser for transportene er: Transporttid 8 timer, vanntemperatur 8 °C, salinitet ca. 33 ppt, tetthet 30 kg/m<sup>3</sup>, fiskestørrelse 30 g, 100 % oksygenmetning, 2 dager sulting før transport. En parameter ble endret av gangen i de fem forsøkene; transporttid (20 timer), tetthet (60 kg/m<sup>3</sup>), vanntemperatur (12 °C), fiskestørrelse (60 g) og oksygenmetning (150 %). En parameter som en kun tilnærmet klarte å standardisere for alle fem forsøk var effekten på luftingen i transportvannet, som påvirker CO<sub>2</sub> konsentrasjonen og dermed pH og ammoniakk (NH<sub>3</sub>-N).

Transport	Endring	pH	TAN mg N/l	NH <sub>3</sub> -N µg/L	CO <sub>2</sub> mg/l	TOC mg C/l
Standard	-	7.5±0.1	0.5±0.0	1.3±0.1	6.4±0.5	3.1±0.3
Økt transporttid	20 timer	7.4±0.0	1.6±0.1	4.4±0.1	8.6±2.8	4.9±0.1
Økt tetthet	60 kg/m <sup>3</sup>	7.1±0.0	1.3±0.0	2.3±0.1	7.5±0.3	8.2±0.3
Økt temperatur	12 °C	7.8±0.0	0.8±0.0	3.3±0.1	4.9±0.3	3.4±0.0
Økt størrelse	60 g	7.6±0.0	0.3±0.0	0.7±0.0	5.8±0.6	2.5±0.2
Økt oksygenmetning	150 %	7.5±0.0	0.5±0.0	1.1±0.0	6.4±0.8	3.7±0.2

- **Oksygen (O<sub>2</sub>):** En bør tilstrebe en mest mulig stabil oksygenmetning på ca. 100% for transport av rognkjeks. For stabilisering av oksygenmetningen på dette nivået er en avhengig av utluftingssystem i transportkarene.

Høy oksygenmetning vil kunne gi gjelleskader, oksidativt stress som gir seg utslag i dødelighet etter transport. I kontrollerte forsøk med rognkjeks så en etter 8 timers transport noe forøket stress (kortisol) ved 150% oksygenmetning sammenlignet med 100% metning. Det er usikkert hvordan dette ville utviklet seg over lengre transporter. En ser ingen god grunn til å praktisere høy oksygenmetning under transport, og de høyeste verdiene en har observert i kommersielle transporter er ca. 120 %.

- **pH:** For å redusere giftigheten av ammoniakk anbefales det å holde pH lav, spesielt ved lengre transport, men ikke lavere enn pH 7,1.

I kontrollerte forsøk med rognkjeks så en at pH i transportvannet sank i løpet av de første 2-4 timene, men stabiliserte seg deretter. Redusert pH i lukket transport er et resultat av fiskens CO<sub>2</sub>-utskillelse som øker med økt biomassetetthet, temperatur og transporttid. PH kan til en viss grad reguleres ved regulering av intensiteten på luftingen i transportkaret.

- **Karbondioksid (CO<sub>2</sub>):** Siden det ikke finnes kunnskap om toleransegrenser for CO<sub>2</sub> hos rognkjeks anbefales det å basere seg på Mattilsynet maksimalgrense på 15 mg/l CO<sub>2</sub>.

Selv ved den laveste pH (7,1) i forsøkene med rognkjeks (ved tetthet 60 kg/m<sup>3</sup>) var CO<sub>2</sub>-konsentrasjonen kun 7,5 mg/L, betraktelig lavere enn grenseverdiene for laks. CO<sub>2</sub>-utskillelsen øker med økende temperatur, men det er samtidig lettere å luften ut CO<sub>2</sub> på høye enn på lave temperaturer.

## 5.3 Beskrivelse

- **Ammonikk:** Det finnes ikke etablerte grenseverdier for rognkjeks. For laks i sjøvann anbefales det at  $\text{NH}_3$  ikke bør overstige 12-25  $\mu\text{g/l}$  (Terjesen m.fl, 2013). Det kan være rognkjeks er mindre tolerant siden målt pH i blodet på transportert rognkjeks er høyere enn det som er vanlig hos laks. Giftigheten av ammoniakk øker som kjent med økende pH.

*Forsøk med rognkjeks viser som forventet at økt fisketetthet og transporttid fører til økt akkumulering av totalammoniakk (TAN), inkludert den mest giftige formen  $\text{NH}_3$ . Toleransegrenseverdier oppgis vanligvis som  $\text{NH}_3$ -N-konsentrasjon.*

- **TOC:** En har ikke kunnskap om toleransegrenser for TOC på rognkjeks, men der en observerer slim- og skumdannelse i kar etter transport bør en følge spesielt med på gjellhelse både ved mottakskontroll og ved seinere oppfølging i sjø.

*Belastningen fra partikler og annet organisk materiale målt som totalt organisk karbon (TOC) økte med økende fisketetthet i forsøk med rognkjeks og var observert sammen med slimdannelse i transportkarene. Tilklogging av gjellene med slim og partikler kan tenkes å gi økte problemer med oksygenopptak, osmoregulering og gjelleinfeksjoner.*

- **Temperaturbetingelser:** Det anbefales å transportere rognkjeks i temperaturområdet 8 – 12 °C. Temperaturøkninger under transport og fra transport til utsett på opptil ca. 15 °C kan tolereres, men en bør unngå at rognkjeks utsettes for større temperaturoppgang under transport.

*Simulerte transporter av rognkjeks (ca. 30 g) på henholdsvis 8 og 12 °C under kontrollerte forhold viste at en økning i temperatur fra 8 til 12 °C ga små endringer i vannkvalitet, og det var ingen målbare forskjeller i akutt stressrespons (plasmakortisol) eller sekundære stressrespons (plasma-pH og osmolalitet). Dette tyder på at en økning i temperatur fra 8 til 12 °C hverken førte til store endringer i metabolismen (forbrenningen) eller stresstoleranse.*

*Målinger fra kommersielle transporter med rognkjeks under forskjellige temperaturer viste en økende stresstoleranse med økende temperatur i intervallet 3,3 til 15,9 °C. Rognkjeks så også ut til å tåle brå overganger fra lav til høy temperatur (fra ca. 8 til 15 °C). Brå endringer fra høy til lav temperatur (fra ca. 8 til ca. 3 °C) kan derimot være mer utfordrende for rognkjeks. Dette er en situasjon som kan oppstå under lange transporter vinterstid.*

- **Lys:** Rognkjeks bør holdes mest mulig mørkt under transport. Eventuelle inspeksjonsluker bør dekkes til.

*Rognkjeks kan ha økt aggresjon under transport som følge av sulting. Erfaringsmessig kan en redusere aggresjon ved å holde fisken i mørke.*

- **Fiskestørrelse:** Det anbefales lavere tetthet for liten fisk enn for stor.

*Dette er basert på generelle kunnskap om høyere metabolisme på liten fisk enn stor fisk. Generelt har stor fisk også større toleranse for transportstress og dårlig vannkvalitet enn liten fisk. Kontrollerte forsøk viser ingen klar forskjell i toleranse for transportstress mellom rognkjeks på 30 g og 60 g.*

## 5.3 Beskrivelse

- **Biomassetetthet og transporttid: Et generelt prinsipp ved transport av rognkjeks som for annen fisk bør være å redusere biomassetettheten ved økende transporttid for å redusere risikoen for en uakseptabel belastning av dårlig vannkvalitet på fisken.**

*På linje med observasjoner generelt for lukkede fisketransporter så en i kontrollerte transportforsøk med rognkjeks endringen i vannkvalitet ved økende biomassetetthet og varighet av transporten, men dette så ikke ut til å påvirke fiskens fysiologiske tilstand negativt. Ved transportslutt var plasmakortisolnivået like høyt ved 30 kg/m<sup>3</sup> som for 60 kg/m<sup>3</sup>, og tilbake til før-stressnivå i gruppa som ble transportert i 20 t. Dette gjaldt for 30 g fisk ved 8 °C og god regulering av lufting (pH 7,4 – 7,1) og oksygen (100 %). Analyser av vannkvalitet under disse forholdene ga heller ikke grunn for å tro at vannkvaliteten var kritisk under disse betingelsen, basert på kriterier og kunnskap om vannkvalitet på laks. Under gode transportbetingelser for rognkjeks rundt 30g medfører økning i tetthet fra 30 til 60 kg/m<sup>3</sup> og økning i transporttid fra 8 til 20 timer små endringer i stressrespons. Endringer i transporttid og fisketetthet er lite kritisk for transport av rognkjeks så lenge vannkvaliteten holdes innenfor anbefalte grenseverdier. En skal likevel være obs på at vannkvaliteten påvirkes nettopp av bl.a. fisketetthet og transporttid.*

*Oppfølging av 15 kommersielle transporter av rognkjeks viser at er det etablert en praksis for transport av rognkjeks på 20-60 g ved tettheter fra 30 – 50 kg/m<sup>3</sup> på inntil 20 timer (og i noen tilfeller mer) hvor vannkvaliteten under transport og stressresponsen på fisken ser ut til å være akseptabel og på linje med det som er vist i kontrollerte forsøk.*

- **Tilsyn av fisk: Det bør legges inn rutiner for tilsyn av fisk under transport.**

*Rognkjeksens adferd skiller seg klart fra laks og leppefisk. Transportør bør derfor ha artsspesifikk kunnskap og erfaring med adferden til rognkjeks.*

## Mottak av biltransport (lossing fra bil)

*Lossing av fisk anses som en kritisk fase av transporten og kan ofte medføre betydelig stress og store endringer i miljø, spesielt ved overføring direkte til sjø.*

*Det er derfor viktig for god fiskevelferd at lossing skjer så raskt og skånsomt som mulig. Generelle forhold å ta hensyn til:*

- **Generelt bør en starte overføring av fisken som har stått lengst på bil, eventuelt transportkar som har størst reduksjon av vannkvalitet (pH)**
- **Overføringsmetoden må være mest mulig skånsom, fortrinnsvis ved selvfal i fleksislange/rør. Hvis behov for håving må dette skje med presennings-håv (våthåving).**
- **Ved pumping pass på at pumpen har riktig dimensjon og er testet samt at det brukes riktig hastighet. For høy hastighet eller trykk kan skade fisken.**

## 5.3 Beskrivelse

- **Unngå stor fallhøyde og at fisken kolliderer eller kommer i kontakt med skarpe kanter og harde overflater som kan gi slimtap og sår**
- **Unngå at fisken kommer i kontakt med luft, spesielt når det er minusgrader**
- **Vannavskiller:** For å unngå risikoen for akutt ammoniakk-forgiftning som følge av blanding av gammelt transportvann med nytt vann bør det være vannavskiller i enden av losseslangen for å sile av gammelt ransportvann.  
*Dette er spesielt viktig der fisken overføres til oppdrettskar eller nye transportkar eller fiskebrønn for videre transport ut til merdanlegg. Ved direkte overføring til merd er dette mindre kritisk.*
- **Spyling av kar:** For å få tømt transportkarene for fisk er det ofte behov for etter-spyling med vann. For å unngå risikoen for ammoniakkforgiftning ved blanding av gammelt transportvann og nytt vann bør det være minimalt med gammelt transportvann igjen i tankene når en starter etter-spyling, eventuelt bør en etter-spyle med transportvannet (resirkulere eller ta fra andre kar ved ned-tapping).
- **Pass på at fisken ikke tørrlegges eller hopper seg opp i transportslangen.**
- **Kvalitetssikring:** For å kunne fange opp avvik som er viktig for å forbedre transportprosedyren samt gjør beslutninger i forhold til avvik bør en ha rutiner for mottakskontroll og registreringer som loggføres: systematisk og lett tilgjengelig  
*Eksempler på dette er:*
  - *Innhenting av fraktbrev, helse og opprinnelsesattest og historikk på fisken (normalt sendt i forkant)*
  - *Miljølogg for bil hentes inn ved ankomst, samt at en kvalitetssjekker (kalibrerer) miljødataene med manuell logging, primært av O<sub>2</sub>, temp og pH.*
  - *En kan med fordel i en lærefase og ved spesielle hendelser/situasjoner (lange og avvikende transporter, ved avvikende adferd på fisken o.l.) ta vannprøver for analysering av TAN, pH, fritt CO<sub>2</sub> og TOC.*
  - *En bør gjøre en visuell vurdering av vannkvaliteten i transportkarene i forhold til farge, partikler, skumming o.a., samt adferden til fisken før lossing*
  - *En bør ta ut 30 fisk for kontrollmåling, visuell vurdering og gradering (score) av viktige kvalitetskriterier som slimtap, huderøsjon, sår, finneslitasje, deformiteter, katarakt, samt undersøkelser av gjeller.*
  - *Fiskestørrelse for den minste fisken må kontrollmåles for å verifisere at meden hvor fisken skal settes ut har riktig maskestørrelse (unngå rømming)*
  - *Sikre at mottak av fisk overvåkes av erfaren person hos mottaker*
- **Etterarbeid:** For å unngå spredning av sykdom vask og desinfisering av utstyr, kar og transportmiddel med godkjente kjemikalier og brukerdoser, dokumenter med signerte kvalitetssikringsdokumenter.

## 5.3 Beskrivelse

### Spesielt for rognkjeks:

- **Sedasjon (lett bedøvelse): Sedasjon bør benyttes med forsiktighet og bør ikke inngå i en foretrukket strategi ved lossing av fisk fra bil.**

*Erfaring fra felt (oppfølging av kommersielle transportere) ble det benyttet en svak dose med Aqui-S ( $4 \text{ mg/m}^3$ ) for sedasjon for å unngå at rognkjeksene festet seg på karvegger og i transportslangen i forbindelse med lossing av transportkar. Sammenlignet med tømmeprosedyrer hvor det ikke ble benyttet Aqui-S viste stressnivået på fisken betydelig høyere ( $144,5 \text{ ng/ml}$ ,  $SD \pm 47$ ) sammenlignet med usedert fisk ( $59 \text{ ng/ml}$ ,  $SD \pm 21$ ). For korte sekundærtransporter er det en risiko for at sedasjonen fortsatt kan ha virkning etter overføring til merd og dermed påvirker tilvenningen til det nye miljøet.*

*Suger rognkjeksene seg fast i kar og transportslange er det god erfaring med å få den løs ved forsiktig skylning med sjøvann.*

- **Korte sekundærtransport som medfører omlasting og håndtering av fisk innenfor korte tidsintervaller bør unngås.**

*Spesielt for rognkjeks og leppefisk er at lossingen fra bil ofte skjer over til kar på båt eller en mindre brønnbåt for transport videre ut til merd (sekundærtransport). Det er klare data både fra felt og kontrollerte forsøk som viser at sekundærtransport med den ekstra håndteringen og miljøovergangene det medfører utgjør betydelig ekstra stress for fisken. Det måles generelt tre ganger høyere stressnivå (kortisol) på fisken etter sekundærtransporten sammenlignet med etter primærtransporten.*

*Et annet moment ved sekundærtransporten er at fisken ofte overføres til kar som er mindre enn transportkarene på bil (primærtransporten) og dersom en ikke fordeler fisken fra hvert enkelt transportkar på bil på flere av de mindre karene i sekundærtransporten vil en få betydelig økt fisketetthet under sekundærtransporten. Dette er i dag et vanlig fenomen og er høyst risikabelt og bør unngås.*

### Sekundærtransport på båt

*Etter primærtransport losses ofte rensfisk over fra bil til kar på båt for sekundærtransport ut til merd for utsett. Dette skjer gjerne i transportkar plassert på dekket til en arbeidsbåt, og transporttiden er ofte svært kort (vanligvis 1/2 til 2 timer). Det er lite erfaring med slik omlasting og sekundærtransport på laks og andre arter, og metoden og kunnskap på dette området er primært basert på erfaringer med transport av rognkjeks.*

*Åpenbare risikomomenter knyttet til sekundærtransporten er den ekstra behandlingen fisken får ved omlasting samt den korte tiden for å roe seg ned (reduere stress) før ny håndtering ved overføring til merd. Kumulativ stress er knyttet til økt risiko for dødelighet etter utsett i sjø, slimtap og sår som kan gi osmotsisk stress og er innfallspunkt for infeksjoner.*



## 5.3 Beskrivelse

Ofte observerer en at metode og utrustningen under sekundærtransport av rognkjeks ikke er god nok til å ivareta god vannkvalitet og fiskevelferd. Spesielle hensyn og kritiske faktorer for rognkjeks er gitt nedenfor.

### Spesielt for rognkjeks:

Undersøkelser av transporter med rognkjeks har vist at sekundærtransporten vanligvis tredoblet stressnivået sammenlignet med nivået etter endt primærtransport. Det ble også ofte observert svært høye fisketettheter under sekundærtransporten (opptil 83 kg/m<sup>3</sup>) og svært varierende oksygenforhold.

I et kontrollert transportforsøk med rognkjeks (30g, 100% oksygenmetning, tetthet 30 kg/m<sup>3</sup> og 12 °C) ble det simulert sekundærtransport ved at rognkjeks etter en transport på 8 timer ble overført til nytt transportkar i 1,5 timer under gode transportbetingelser (100% oksygenmetning, god vannkvalitet, tetthet 30 kg/m<sup>3</sup>, 12 °C). Etter sekundærtransporten var det et forhøyet stressnivå, men ikke signifikant høyere sammenlignet med etter primærtransporten, og til et langt lavere nivå enn det som ble målt 1 time etter overføring til primærtransporten (opplastingsstresset). Dette gir en strek indikasjon på at den ekstreme økningen i stress etter sekundærtransport i felt (kommersielle transporter) kan ha sammenheng med miljøforholdene i transportkarene.

Mellomtransport med brønnbåt (liten og gjerne med spesialtilpasninger for rognkjeks) vil normalt sett gi fisken god plass og vanngjennomstrømning med gode miljøforhold. En vil ikke gå nærmere inn på risikomomenter og prosedyreinns spill på dette, bortsett at det må foreligge prosedyrer med utgangspunkt i normal risikovurdering i forhold til ytre miljø (rømming), bio-sikkerhet, HMS og fiskevelferd.

Kar og utrustning av kar: Sekundærtransport i kar på båt (arbeidsbåt) er det vanligste i dag for rognkjeks. Prinsippene for kar og karutrustning på båt bør i utgangspunktet være det samme som for transportkar på bil, men det skorter ofte på kravene til miljølogging (O<sub>2</sub>, pH og temp), oksygenering og lufting. Alternativt kan en med fordel legge opp pumping av vann og gjennomstrømning i karene. En må da sikre tilstrekkelig pumpekapasitet, eventuelt at en tilsetter noe oksygen. Oksygenering i transportkar på båt direkte med luftesteiner i kar og uten at en har lufting av vannet frarådes spesielt pga. høy risiko for hyperoksygenering som kan få svært skadelige og akutte effekter på fisken.

- **Kravene til karmiljø, logging av vannkvalitet og regulering (oksygenering og lufting) er det samme under sekundærtransport som for annen lukket fisketransport (primærtransport), Vedlegg: 1.**
- **En bør ha samme karstørrelse på båt som på bil slik at hele grupper kan overføres uten at en risikerer høye tettheter under sekundærtransporten.**
- **Karene bør ha lokk, både for å redusere stress og med hensyn på rømningssikring.**
- **Ved tømming av frittstående kar på båt brukes enten stropper på transportkarene og heising over til merd før de tømmes ved at de senkes ned i sjøen, eventuelt tømming via transporslange.**

## 5.3 Beskrivelse

- Dersom en har benyttet knutefri finmasket planktonduk i karene under korte transporter kan dette lette overføring til sjø ved at rognkjeksene da ikke får sugd seg fast til karveggene

### Mottak i merd

- Overføring til merd må skje i forhold til egen prosedyre for sikring mot rømming.
- Det må det påses (dobbeltsjekkes) at maskevidden på merden er av riktig størrelse i forhold til minste størrelsesfraksjon av den faktisk leverte fisken, og koplinger og utstyr må dobbeltsikres mot brudd som kan gi rømming.
- Merden være montert i forhold til andre spesielle behov/krav.  
*F.eks. var det vanlig for tosk at not-spissen ble heist opp for å unngå dødelighet pga. sammentrenging av utmattet fisk på bunnen. For rensefisk er det viktig å legge til rette skjul og fôringsstasjoner på forhånd og plassere disse riktig i forhold til hvor fisken settes ut i merden. Dette må være definert på forhånd i egne mottaksprosedyrer.*
- Forhold som kraftig strøm og dårlig vær med mye bølger kan være utslagsgivende for om overføringen til merd blir vellykket.
- Timing i forhold til tidevanns-strømmer kan være viktig. Forskyvning av utsettelsestidspunkt med noen få timer kan i noen tilfeller være hensiktsmessig.
- Det er relativt lett å observere fisken ved utsett og basert på erfaring gjøre vurderinger av fiskekvalitet (robusthet, om har tatt skade eller er belastet av transporten). Slike observasjoner, sammen med miljø i merden (temp, O<sub>2</sub>, strømforhold o.l.) bør registreres.
- Dødelighet og appetitt bør følges spesielt opp de første 30-60 dagene med hensyn på å bygge opp erfaring på hvordan dette er påvirket av transportforholdene.

### Spesielt for rognkjeks:

- Se "Veileder for bruk av rognkjeks" på [www.lusedata.no](http://www.lusedata.no) for supplering av veiledning for tilrettelegging for rognkjeks i merd.
- Klargjøring av merd: Rognkjeks bør setter ut i ren merd.
- Rømningssikring: Før overføring til merd bør størrelsen (høyden) på fisken kontrollmåles for å sikre at fisk ikke kan passere gjennom notmaskene på merden, dvs. sikre at en har riktig maskevidde slik at en ikke risikerer rømming selv på den minste fisken. God størrelsessortering er viktig for god kontroll på dette. Tabell for valg av masketype i forhold til "høyden" på rognkjeksene er vist nedenfor.

## 5.3 Beskrivelse

Omfar	Halvmaske	Helmaske	Høyde
			Rognkjeks
40	15,5 mm	27,5 mm	21,9 mm +
38	16,5 mm	33 mm	23,3 mm +
35	18 mm	36 mm	25,5 mm +
32	20 mm	40 mm	27,6 mm +
30	21 mm	42 mm	29,7 mm +
28	22,5 mm	44 mm	31,1 mm +
25	25,5 mm	50 mm	35,4 mm +
22	29 mm	58 mm	41 mm +



- **Utsettingspunkt og plassering av skjul:** Det anbefales at skjulene trekkes mot merdkanten der fisken slippes ut slik at den får kort avstand til skjulene hvor fisken kan feste seg og stresse ned.

*En har ikke sikker kunnskap om det, men en hypotese er at rognkjeks som ikke raskt finner en plass å slå seg ned mens den er stresset etter transport trenger lengre tid på å stresse ned og er mer utsatt for kronisk stress og dødelighet. Dersom det er strek strøm på lokaliteten kan det være fordelaktig å sette fisken ut med strømretningen slik at den ikke blir presset mot notveggen ved utsett og trenger svømme aktivt mot strømmen for å nå skjulene.*

## 5.4 Vedlegg:

*Vedlegg: 1: Diverse forskrifter*

**Forskrift om transport av akvakulturdyr:** <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2008-06-17-820>

§ 12.Kompetanse:

- Sikre atferdsmessige og fysiologiske behov.
- Krav til personell med kompetanse til å ivareta velferd:
  - o hvordan fisken reagerer på stresspåvirkninger
  - o håndtering av fisk og påvirkning av velferden
  - o vannkvalitet, vannkvalitetsparametere, overvåking
  - o tiltak for å opprettholde en god vannkvalitet

§ 16.Vannkvalitet og vannvolum:

- CO<sub>2</sub> og TAN skal holdes lavt
- Krav til systematisk måling av O<sub>2</sub>, pH, salinitet og temperatur
- Krav til prosedyrer for tiltak ved fare for uheldige nivåer

**Akvakulturdriftsforskriften:** <http://www.lovdata.no/for/sf/fi/fi-20080617-0822.html>

Settefiskforskriften er den del av Akvakulturforskriften og sier bl.a.

§ 18.Helse- og opprinnelsesattest

Det er forbudt å levere fra seg, motta, sette ut eller flytte levende fisk og rogn og melke fra disse uten at det foreligger helse- og opprinnelsesattest etter skjema fastsatt av Statens dyrehelsetilsyn - Sentralforvaltningen.

Helseattest kan bare utstedes dersom det parti attesten gjelder for har vært omfattet av helsekontroll i minst 9 måneder. Undersøkelser av foreldre i forbindelse med stryking kan medregnes i 9-månedersperioden.

Leverandør og mottaker skal oppbevare gjenpart/kopi av helse- og opprinnelsesattestene som følger med fisk, like lenge som, og sammen med, driftsjournalen.

Helseattesten er gyldig i 21 dager fra siste inspeksjon.

§19 vannkvalitet generelt

Funksjonskrav:

- Fisk skal ha tilgang på tilstrekkelige mengder vann av en slik kvalitet at fiskene får gode levekår, og ikke står i fare for å bli påført unødige lidelser eller skader.
- Vannkvaliteten og vekselvirkningene mellom ulike vannparametere skal overvåkes etter behov. Ved fare for unødige lidelser eller skader skal effektive tiltak iverksettes.

- Mengden metabolske avfallstoffer akkumulert i vannet skal være innenfor forsvarlige grenser.

**Dyrevelferdsloven:**

[http://www.lovdata.no/cgi-wift/wiftldles?doc=/app/gratis/www/docroot/all/nl-20090619-097.html&emne=\\*dyrevelferdsloven\\*&&](http://www.lovdata.no/cgi-wift/wiftldles?doc=/app/gratis/www/docroot/all/nl-20090619-097.html&emne=*dyrevelferdsloven*&&)

[http://www.lovdata.no/cgi-](http://www.lovdata.no/cgi-wift/wiftldles?doc=/app/gratis/www/docroot/all/nl-20090619-097.html&emne=*dyrevelferdsloven*&&)

**Ulike bestemmelser, regelverk, råd og veiledning hos Fiskeridirektoratet** (<http://www.fiskeridir.no/>) eller Mattilsynet (<http://www.mattilsynet.no/>)

## Vedlegg: 2: Vannkvalitet

Sammendrag på vannkvalitet er hentet fra Rosten m.fl. (2004 og 2007), Stefansson m.fl. (2015) og Terjesen m.fl. (2013). Se referanseliste for litteraturhenvisning.

### Temperatur:

Ved høye temperaturer vil fisken få problemer med å dekke oksygenbehovet på grunn av sterkt øket forbruk og redusert oksygeninnhold i vannet, samt at fisken får problemer med osmoreguleringen (vannbalansen). Lave vintertemperaturer har tilsynelatende mindre velferdsmessige konsekvenser, men også der finnes en nedre grense. Også ved lave temperaturer vil det oppstå problemer med osmoreguleringen.

### Oksygen:

Oksygeninnholdet i vann (målt som milligram oksygen per liter i vann) ved 100% metning avtar generelt med økende temperatur og salinitet. Fiskens oksygenforbruk øker ved økende temperatur, aktivitet og fødekonsum, og små fisk har relativt høyere oksygenforbruk (mg O<sub>2</sub> per kg fisk) enn stor fisk. Løst oksygen er nødvendig for fiskens respirasjon og er vanligvis uttrykt i mg per liter vann eller i prosent metning. Over en kritisk konsentrasjon er forbruket uavhengig av konsentrasjonen. Under det kritiske nivået reduseres oksygenforbruket med minkende konsentrasjon.

Oksygenet diffunderer inn i blodet over gjellene på grunn av forskjellen i partialtrykk mellom vann og blod, og bindes til hemoglobinnmolekylene i de røde blodcellene. Oksygenet frigjøres fra hemoglobinet igjen når CO<sub>2</sub> fra forbrenningen blir frigjort fra cellene og gir redusert pH i blodet (Bohr og Root effekten). Igjen pga forskjeller i partialtrykk vil oksygen diffundere inn i cellene og CO<sub>2</sub> ut. I motsetning til hos oss så er det oksygeninnholdet i blodet og ikke CO<sub>2</sub> innholdet som styrer respirasjonsraten. Ved oksygenering og overmetning av vann med oksygen kan dette føre til at respirasjonsraten blir redusert til et nivå som er for lavt til at fisken får transportert CO<sub>2</sub> ut av blodet over gjellene og det oppstår hypercapnia som reduserer blodets evne til transporterer oksygen, men dermed synker også blodets oksygeninnhold og pustelysten blir stimulert igjen.

Anaerob hurtig svømming vil øke melkesyreinnholdet i blodet og redusere pH, noe som også reduserer blodets evne til oksygenopptak. Ved vedvarende anaerob svømming kan de mengden melkesyre overskride blodets bufferkapasitet og det vil oppstå acidose og fiskens oksygentransport vil bryte sammen. Under stress skjer det også hormonelle endringer som fører til økt evne til oksygentransport i form av høyere ventilasjonsrate, større oksygenflux over gjellene og bedre opptak i blodcellene (redusert Bohr effekt). I saltvann vil fisken lekke vann over gjellene og fisken vil få problemer med vann- og ionebalansen. Forsinket dødelighet hos laks et par dager etter en fisketransport skyldes stort sett dette fenomenet.

### Karbondioksid (CO<sub>2</sub>):

CO<sub>2</sub> er på samme måte som ammoniakk et avfallstoff (metabolitt) fra metabolismen som har direkte sammenheng med oksygenforbruket, i et tilnærmet forhold 1:1 mellom forbruk av O<sub>2</sub> og utskillelse av CO<sub>2</sub>. CO<sub>2</sub> kan være negativt for fiskens velferd og høye verdier vil føre til redusert tilvekst, forstyrrelser i syrebase og ioneregulering, og nyreskader og redusert oksygenbindingskapasitet i hemoglobin. Giftigheten av CO<sub>2</sub> antas å være større ved lavere oksygenmetning og laksefisk synes mer sensitiv for CO<sub>2</sub> ved lave temperaturer enn ved høye. CO<sub>2</sub> innholdet må komme opp i over 30-40 mg CO<sub>2</sub> per liter for at en skal få påvisbare akutte effekter av for høyt CO<sub>2</sub> nivå. Anbefalte grenseverdier for CO<sub>2</sub> generelt ligger i størrelsesorden 20 mg/l til 10 mg/l. Det er grunn til å tro at toleransen for CO<sub>2</sub> avhenger av øvrig vannkvalitet.

Mattilsynet i Norge anbefaler maks. 15 mg /l karbondioksid under produksjonsbetingelser (kroniske nivåer). Løselighet av CO<sub>2</sub> reduseres med økende temperatur og salinitet. Det er derfor lettere å luften ut CO<sub>2</sub> jo høye temperaturen er.

pH: Enkelt fortalt er pH primært styrt av utskillelsen av CO<sub>2</sub> der pH synker med økende CO<sub>2</sub> konsentrasjon (som ligger i likevekt med karbonsyre). Lufting av transportvannet vil derfor bidra til å kontrollere og stabilisere pH under fisketransport. Giftigheten av TAN øker med økende pH (større andel av TAN foreligger som NH<sub>3</sub>).

#### Ammoniakk (TAN):

På samme måte som CO<sub>2</sub> er ammoniakk (TAN: total ammoniakk) et avfallsstoff (metabolitt) fra metabolismen som har direkte sammenheng med oksygenforbruket. Som en tommelfingerregel kan en bruke forholdet 10:1 mellom forbruk av O<sub>2</sub> og produksjonene av TAN. Kontroll på oksygenforbruket gir da en brukbare indikasjon på akkumulert ammoniakk. Uionisert ammoniakk (NH<sub>3</sub>) er den giftigste formen av ammoniakk hos fisk og andelen av uionisert ammoniakk øker med økende pH. Høye konsentrasjoner av NH<sub>3</sub> er skadelig for sentralnervesystemet, aminosyremetabolisme, forstyrrelse av enzymssystemer, gir gjelleskader og osmoregulatoriske forstyrrelser. Det maksimale anbefalte nivået av uionisert ammoniakk (NH<sub>3</sub>-N) for laksefisk i forskjellige miljøer ligger som regel i størrelsesorden 12 µg -25 µg/l.

## Referanser

- Fivelstad, S., Olsen, A.B., Kløften, H., Ski, H., Stefansson, S. (1999). Effects of carbon dioxide on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts at constant pH in bicarbonate rich freshwater. *Aquaculture*. (78), 171-187.
- Jonassen, T.M. Hofossæter, M., Ag, S., Kunickiene, E., Remen, M. (2017). Rognkjeks: God transport forutstning for suksess? *Norsk Fiskeoppdrett* (2), 40-46.
- Nytrø, A.N. (2013). The effect of temperature and fish size on growth of juvenile lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.). Master's Degree Thesis in Fisheries Science, Universitetet i Tromsø, 80 sider.
- Remen, M., Hofossæter, M., Ag, S., Kunickiene, E., Jonassen, T.M. (2017). Utvikling av transport- og mottaksprosedyrer for rognkjeks basert på kartlegging av miljø og stress (foreløpig rapport). *Akvaplan-niva rapport 7707-1*, xx sider.
- Rosten, T., Braaten, B., Olafsen, T., Mejdell, C., Wollfrom, T., Myhr, E., Olav Rosseland, B.O. (2007). Bistand til mattilsynet knyttet til utredning av dyrevelferd i akvatisk. NIVA-rapport LNR 5469-2007 (ISBN 978-82-577-5204-0), 131 sider.
- Rosten, T., Åtland, Å., Kristensen, T., Rosseland, B.O., Braaten, B. (2004). Vannkvalitet og dyrevelferd. *Mattilsynet, Oppdrag nr. 200440/11 88 67*, 85 sider.
- Stefansson, S.O., Bæverfjord, G., Handeland, S.O., Hansen, T., Nygård, S., Rosseland, B.O., Rosten, T., Toften, (20015). Fiskevelferdsmessig vurdering av produksjon av 0-års smolt, Sluttrapport 19.05.05 på oppdrag fra Vitenskapskomiteen for mattrygghet, 86 sider.
- Terjesen, B.F., Rosten, T.W., Ulgenes, Y., Henriksen, K., Aarhus, I.J., Winther, U. (2013). Betydningen av vannmiljøet ved produksjon av laksefisk i lukkede systemer i sjø. *Vann* (01), 14-27. <http://vannforeningen.no/dokumentarkiv/betydning-av-vannmiljoet-ved-produksjon-av-laksefisk-i-lukkede-sy>



## 6 Leveranser fra prosjektet

---

Følgende er levert fra prosjektet:

1. Sluttrapport: Remen, M. and Jonassen, T. (2017) Utvikling av transport- og mottaksprosedyrer for rognkjeks basert på kartlegging av miljø og stress. Akvaplan-niva rapport 7707-1, 71 sider.
2. Jonassen, T.M. (2017) Bransjeveileder lakselus: Håndtering og transport av rognkjeks. Internett: lusedata.no.
3. Populærvitenskapelig publikasjon: Remen, M. og Jonassen, T.M. (2017) Rognkjeks mot lus del II: Hva er gode transportbetingelser? *Norsk Fiskeoppdrett* 3(2017).
4. Populærvitenskapelig publikasjon: Jonassen, T.M., Hofossæter, M., Ag, S., Kunickiene, E., Remen, M. (2017) Rognkjeks mot lus: God transport forutsetning for suksess? *Norsk Fiskeoppdrett* 1(2017), 46-52.
5. Presentasjon: Remen, M., Hangstad, T.A., Imsland, A.K., Nytrø, A.V., Jonassen, T.M., (2017) Transport av rognkjeks: Hva er godt levert? FHF-konferanse, ikke-medikamentell behandling, Trondheim 8. januar 2017.
6. Workshop: Jonassen, T.M. (2016) Praktiske innspill til ny veileder for transport av rognkjeks. FHF-dialogkonferanse, Bergen 11. november 2016.
7. Presentasjon: Jonassen, T.M., Remen, M., Hofosseter, M., Ag, S., Kunickiene E. (2016) Transport av rognkjeks – foreløpig feltresultater. FHF-dialogkonferanse, Bergen 11. november 2016.
8. Presentasjon: Remen, M., Hangstad, T.A., Imsland, A.K., Nytrø, A.V., Jonassen, T.M., (2016) Acute and long-term effects of variable transport conditions on stress and growth parameters of lumpfish (*Cyclopterus lumpus*). EAS Aquaculture Europe 16, International conference, Edinburgh 21. September 2016.
9. Presentasjon: Jonassen, T.M. (2016) Kartlegging av transportstress hos rognkjeks. FHF-dialogkonferanse, Bergen 1-2 juni 2016.
10. Presentasjon: Jonassen, T.M. (2016) Kartlegging av transportstress hos rognkjeks. FHF-Rensefiskkonferanse, Gardermoen 8-9 februar 2016.
11. Presentasjon: Jonassen, T.M. (2015). Kartlegging av transportstress hos rognkjeks. FHF-dialogkonferanse, Trondheim 10-11 november 2015.

## 7 Måloppnåelse og nytteverdi fra prosjektet

---

Måloppnåelse: Alle målene i prosjektet er oppfylt. Det er i en publisert (lusedata.no) veileder gitt anbefalinger for prosedyrer for transport og mottak av rognkjeks med fokus på fiskevelferd og kvalitet basert på feltundersøkelsene og de kontrollerte forsøkene i prosjektet. I veilederen er det lagt vekt på begrunnelsene for anbefalingene med referanse til faglitteratur og prosjektresultatene.

Data som er analysert i prosjektet er variasjon i miljøforholdene og tilhørende fysiologiske stressresponser på fisk fra ulike fisketransporter i felt, samt fra simulerte transportere under forskjellige miljøforutsetninger og oppfølging av fisk i kar for å måle seineffekter av transportstress (vekst og dødelighet). I tillegg er det undersøkt om fisk fra forsøk var utsatt for kronisk stress (egenfinansiert tilleggs-studie).

Det ble arrangert workshop for inviterte oppdrettere, transportører og fiskehelsepersonell for å utveksle praktiske erfaringer for å sikre god implementering av nye prosedyrer.

Nytteverdi: Prosjektet har identifisert konkrete områder i transporten som er utfordrende i forhold til fiskevelferd og kommet med løsningsforslag som en forventer vil ha umiddelbar effekt på fiskevelferd, kvalitet og overlevelse etter utsett i sjø. Datagrunnlaget fra feltundersøkelsene på overlevelse i sjø 30 dager etter utsett var ikke bra nok til sikkert å relatere stressfysiologi til dødelighet i sjø. Prosjektet har fra de kontrollerte forsøkene beskrevet hvordan potensialet i forhold til effektivisering av transporten kan optimaliseres (transporttid, fiskestørrelse og tetthet). En forventer at det vil bli gjort forbedringer og videreutviklet tekniske løsninger hos både transportør og oppdretter som vil gi bedre transport av rognkjeks. En har også avdekket fysiologiske reaksjonsmønstre, bl.a. på osmolaritet og pH-regulering, både i felt og i kontrollerte forsøk, som en ikke finner gode forklaringer på og som viser behov for å utvikle mer basiskunnskapen om stressfysiologi hos rognkjeks. Det er også et sterkt behov for bedre kartlegging av rognkjeksens fysiologiske respons og tilpasning i merd etter utsett.