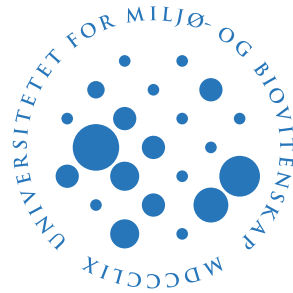


Vedlegg til sluttrapport, prosjektnr 163224/s40

Pilotprosjekt, - markører av sjeldne jordmetaller

Magny S. Thomassen
IHA



Oppsummering

Lakse-smolt ble fôret i 4 uker på fôr som inneholdt 2 nivåer av hhv Yttrium-klorid eller Dysprosium-klorid. Mulig opptak og innkorporering i skjell, bein og lever ble deretter studert vha ICP-MS-analyser. Disse viste at begge elementene ble tatt opp og innkorporert i de tre testede organene.

Hvorvidt de forhøyede verdiene av elementene kan detekteres etter endt tilgang i fôret ble deretter testet. Laksen ble fôret i 9 uker på vanlig kommersielt fôr, og innholdet av Yttrium og Dysprosium analysert. Dette viste at innholdet i bein var tilnærmet uforandret.

Mye tyder på at særlig Dysprosiumklorid kan være godt egnet som markør, og at det ved lengre tids fôring kan benyttes et nivå i fôret ned mot 0,1 g/kg. Dette kan muligens bety at en slik tilsetning ikke vil være uakseptabelt kostbart. Det finnes kommersielt tilgjengelig kloridsalt av flere sjeldne jordmetaller, slik at flere forskjellige markører sannsynligvis kan finnes.

Forord

Dette prosjektet er et lite pilotprosjekt utført i samarbeid mellom Ewos Innovation og Institutt for Husdyr- og Akvakultur- vitenskap, UMB, med økonomisk støtte fra FHF.

Jeg takker med dette for godt samarbeid og nødvendig støtte, samt stor tålmodighet, og håper at de generelt positive resultater som er fremkommet kan komme til nytte for Akvakulturnæringen.

Ås, 2/4 2009

Magny S. Thomassen

Bakgrunn

Opprinnelsesmerking av oppdrettsfisk er av flere årsaker et aktuelt tema, og flere forskjellige prinsipper, deriblant interne elektroniske merker, forskjellige genetiske markører og DNA fingerprints har blitt vurdert. Bruk av kjemiske elementer har også blitt studert. Grunnen er at mange av disse forekommer i lave konsentrasjoner i naturen, slik at fisk med forhøyede nivåer av slike elementer vil være av kjent opprinnelse (Review: Thorrold et al. 2002).

Bruk av sjeldne jordmetaller (Rare earth metals, REMs) har bl.a. blitt testet på salmonider. REM finnes i bein hos mange fiskeslag i svært lave konsentrasjoner (ng/g- området) (Arslan, Z. and Paulson, A.J. 2003). De fleste er ikke-radioaktive, lette å håndtere og har lang tilbakeholdelsestid i beinvev. Eksempelvis fant Ennevor og Beames (1993) at lantanum- og cerium-innmerking av lakseyngel kunne spores i 10 måneder. Tilsvarende fant Giles og Attas (1993) at detekterbare nivåer av dysprosium, europium og samarium varte i minimum 2 år i regnbueørret. Nivåene av samarium var uforandret i denne perioden. Det ble i disse studiene ikke påvist uheldige effekter på vekst eller overlevelse.

I de fleste rapporterte studier med fisk er de sjeldne jordmetallene enten injisert i fisken eller løst i vannet. Da dette ikke alltid vil være ideelle løsninger for en eventuell bruk av slike markører i norsk oppdrettsnæring, var vi interessert i å undersøke muligheten av å merke laks gjennom tilsetning av de sjeldne jordmetallene til fôr. Mange av de sjeldne jordmetallene finnes kommersielt tilgjengelige som oksider, klorider og lignende. Mens oksidene er tungt løselige og derfor vanskelig absorberbare i tarmen hos for eksempel fisk, er kloridene generelt lettere løselige i vandige miljø og vil derfor lettere kunne absorberes fra tarmen. Med grunnlag i den generelle kunnskap om de "bensøkende" egenskaper til sjeldne jordmetaller (Durbin et al, 1956; Jowsey et al, 1958), og basert på det som er beskrevet i de forsøk som er nevnt ovenfor, var det grunn til å forvente at disse etter opptak fra tarm vil akkumulere i bl.a. beinvev hos fisk.

Vi så for oss at smolt kan merkes med disse markørene gjennom en kort fôringsperiode hvor klorider tilsettes fôret, for deretter å være detekterbare i beinsubstans i lengre perioder (litteraturdata antyder en halveringstid på ca. et år). Type og mengde av markør i beinsubstans kan analyseres med ICP-MS (Ennevor, B.C. 1993; Arslan, Z and Paulson, A.J. 2003). Dette er en metode som er svært sensitiv, og som derfor kan gjøre det mulig å bruke forholdsvis lave nivåer av de enkelte markører, og også gjøre det mulig å detektere markøren over lengre tid.

Siden det som nevnt finnes en rekke slike klorider tilgjengelig (13 forskjellige listet hos en leverandør) kan man tenke seg at de forskjellige oppdrettsanlegg i en region merker sin fisk med forskjellig markør. På denne måten vil evt. rømt fisk lett kunne spores tilbake til det enkelte anlegg. Om nødvendig kan kombinasjoner av to eller tre markører også tenkes benyttet, man får da et slags "fingerprint" som er karakteristisk for det enkelte anlegg. På denne måten er antallet mulige kombinasjoner høyt, og burde ikke være begrensende for utnyttelse av konseptet. Alternativt kan all fisk tilhørende et bestemt selskap merkes med samme indikatorkombinasjon, da vil det være enkelt å finne fram til eier, som så må avdekke

hvilket av selskapets lokaliteter som har hatt rømming. Man kan i tillegg tenke seg at fisk fra et smoltanlegg kan merkes med en markør, hvoretter andre markører benyttes i sjøanlegg. På denne måten kan fisk identifiseres tilbake til smoltanlegg evt. til både smoltanlegg og sjøanlegg.

Praktisk gjennomføring.

Prosjektet var et begrenset pilotprosjekt som hadde som hensikt å teste ut grad av absorpsjon og innleiring i bein og skjell hos smolt, av to av de mest aktuelle jordmetallene (dysprosium og yttrium) tilsatt som kloridsalter i fôr i to nivåer.

Fisk, forsøksoppsett

Forsøket ble gjennomført i sjøvann i 4 kar på land i Ewos' anlegg i Dirdal våren 2004, 47 laks pr. kar med startvekt ca 160 g. Fôringstid 4 uker, gjennomsnittstemperatur 8 C. Det ble tatt ut 10 fisk ved start, og 10 fisk fra hvert kar etter 2 og 4 uker. Fisken ble frosset hel og transportert frossen til UMB på Ås. Her ble skjell og rygghvirvler (+ enkelte leverprøver) tatt ut for analyse. De resterende deler av fisken ble tatt vare på til eventuelt senere analyser av andre vev. En "utvaskings"-periode ble etter hvert også inkludert i forsøket. Etter de 4 ukene på forsøksfôr gikk fisken over på vanlig kommersielt fôr. Etter 9 uker ble det tatt ut 10 prøver fra hvert kar. Denne fisken ble også frosset og sendt til UMB, og skjell og beinprøver tatt ut og analysert.

Fôr

Forsøksfôrene ble produsert ved Ewos' forsøksstasjon i Dirdal. De fire fôrene bestod av en vanlig kommersiell fôrblending tilsatt enten 0,1 eller 1 g/kg av Yttriumklorid eller Dysprosiumklorid (99.9 % renhet, Treibacher Industrie AG, Østerrike)

Analysar

Skjell og bein ble rengjort for hhv slim og muskelrester, disse prøvene, samt lever-prøver, ble deretter dekomponert i sterke syrer før analyse på ICP-MS ved Statens Arbeidsmiljøinstitutt (STAMI).

Resultater:

Vekst og fôrinntak

Vekst og fôrinntak var som forventet, og det var ingen spesielle tegn til at fisken reagerte på de innblandede nivåene av Dy og Y.

Kar nr.	Startvekt	SD	Sluttvekt	SD	SGR	FCR
1	157,3	23,6	252,0	37,2	1,43	0,61
2	151,2	20,5	236,5	32,9	1,36	0,62
3	161,1	19,3	254,0	31,7	1,38	0,62
4	160,4	22,1	256,7	37,1	1,42	0,64

Vekt av fisk som ble tatt ut til analyser:

Nulluttak	SD	Kar nr	Mellomuttak(2u)	SD	Sluttuttak(4u)	SD	Etter utvasking	SD
157.0	31.6	1	203.4	41.7	245.4	45.2	410.3	41.7
		2	197.1	30.8	247.6	32.1	396.0	48.5
		3	201.6	24.1	245.7	27.3	423.9	76.6
		4	199.3	31.5	263.4	44.9	391.7	78.6

Analyseresultater

For tilpasning av prøvemengde og avgjørelse mhp prøveorgan, ble skjell, ryggbein og lever analysert fra 2 fisk fra hver fôringsgruppe etter 2 ukers fôring.

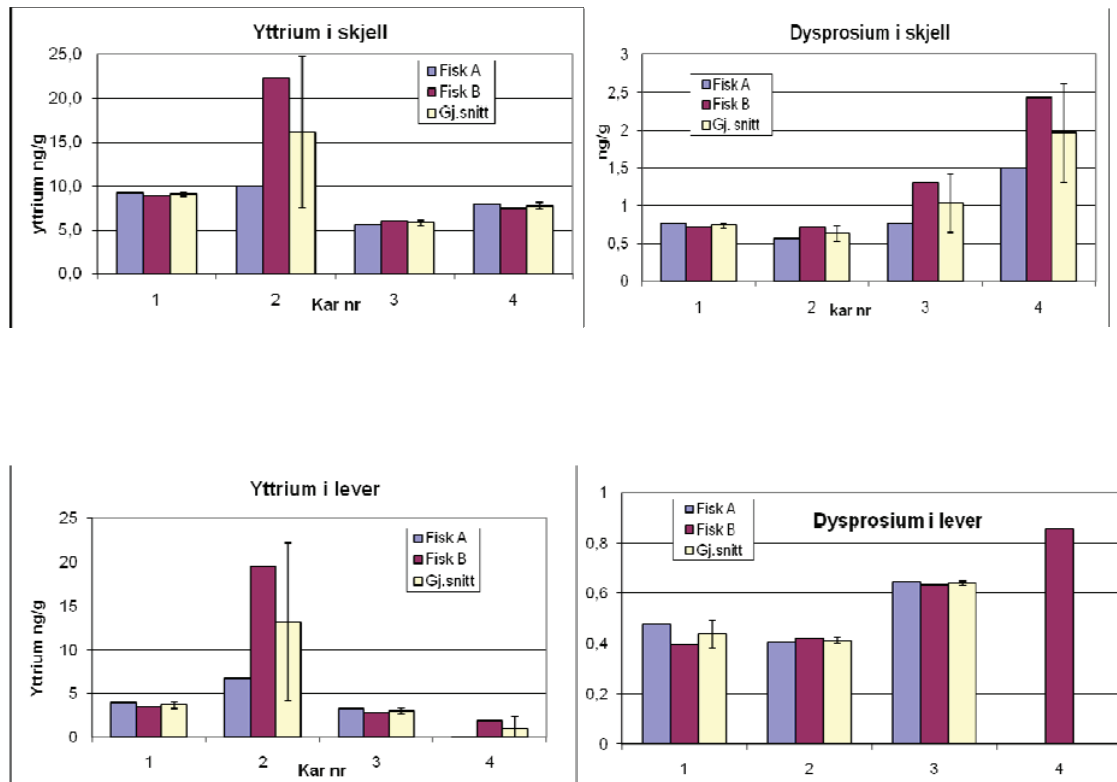
Forsøksvis prøvemengde var her:

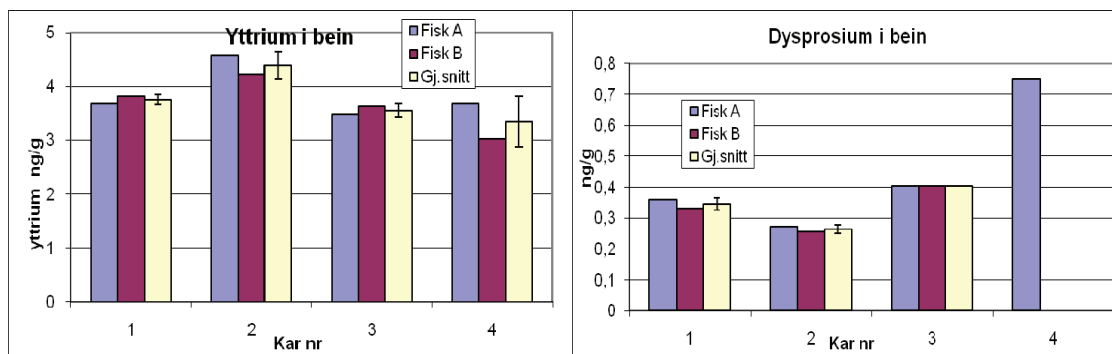
Skjell 0,4-1,2 g

Bein 0,2-0,7 g

Lever 0,2-1,5 g

Resultatene fra disse analysene var oppløftende, både mhp valgte prøvemengder og respons på tilsetning av både Yttrium-klorid og Dysprosium-klorid i fôret, som vist i figurene under:





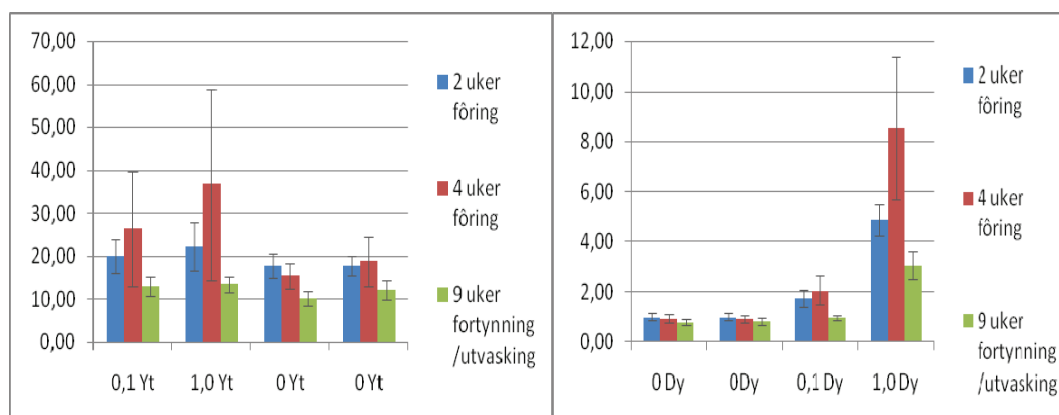
Konklusjonene så langt var følgelig at de tilsatte sporelementene begge ble tatt opp og avleiret, både i skjell, lever og bein. Det naturlige nivået av Yttrium viste seg imidlertid å være så pass høyt at bakgrunns-variasjonen så ut til å kunne gjøre bruken av dette elementet noe usikkert. Dysprosium derimot har så lave bagrunns-nivåer at deteksjon av økte verdier her synes sikrere.

Da vi i tillegg til de først avtalte prøvene, også fikk fisk tilsendt etter 9 ukers ”utvasking”, prioriterte vi å analysere på skjell og bein videre i materialet. Det var størst grunn til å anta at innleirede elementer ville bli sittende i lengre tid i bein og skjell enn i lever.

Skjell

Skjell ble analysert fra all fisk.

Figurene under viser resultatene etter 2 og 4 ukers føring, og etter 9 ukers fortynning/utvasking. Som tidligere finner vi for Yttrium forholdsvis høye bakgrunnsnivåer, men likevel er nivåene etter 4 ukers føring signifikant høyere, både med fôr tilsatt 0,1 og 1,0 g/kg. For dysprosium var effekten enda mer tydelig.



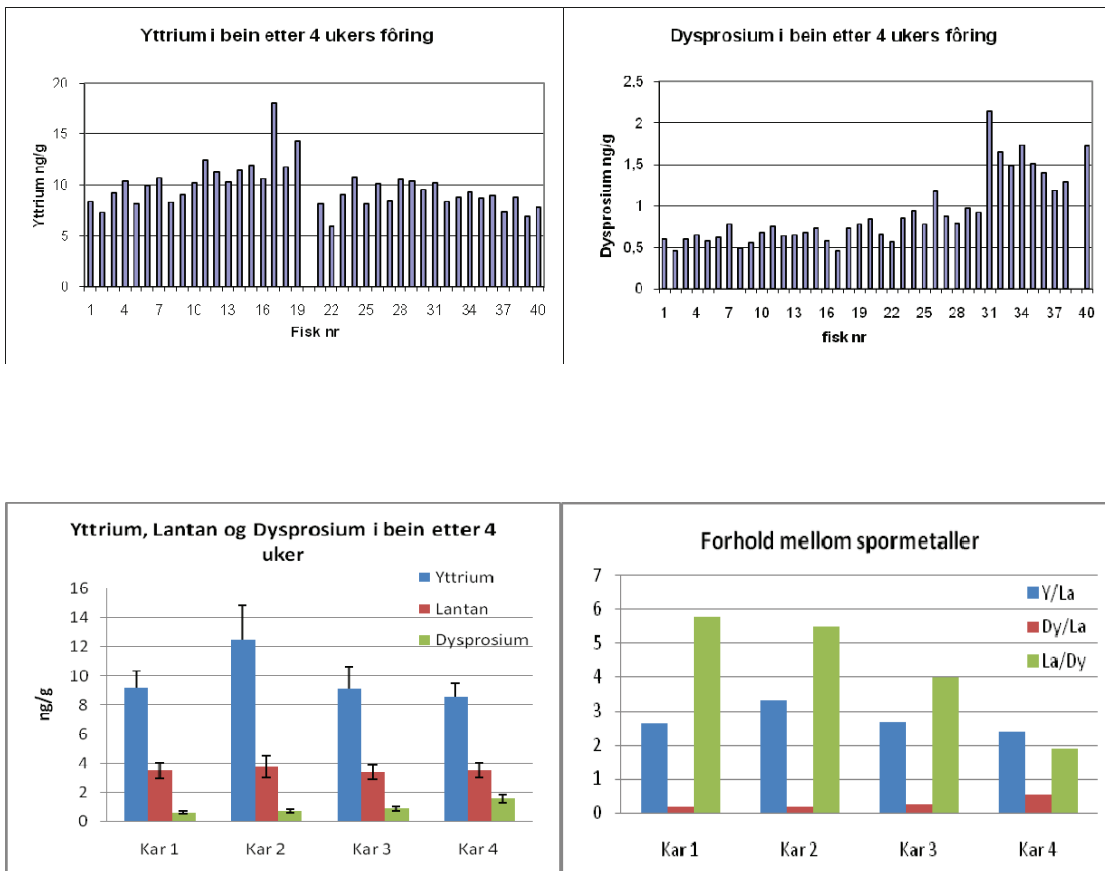
“Utvasking”/”Fortynning”

Etter 9 ukers fôring uten tilsatt markør var nivåene betydelig redusert. Mye kan skyldes ”fortynning” idet fisken i løpet av disse 9 ukene tilnærmet fordoblet sin størrelse, men da verdiene kan se ut til å ha blitt redusert noe mer enn 50%, kan dette tyde på også en del ”utvasking”.

Siden skjellene på fisken også er i kontakt med vann/fôr, kunne det tenkes at dette til en viss grad kunne skyldes ”utvasking” av noe mindre fast innkorporerte markører. Vi valgte derfor også å gjennomføre en tilsvarende analyse på bein.

Bein

Resultatene fra analyser av bein etter 4 ukers fôring er vist nedenfor:



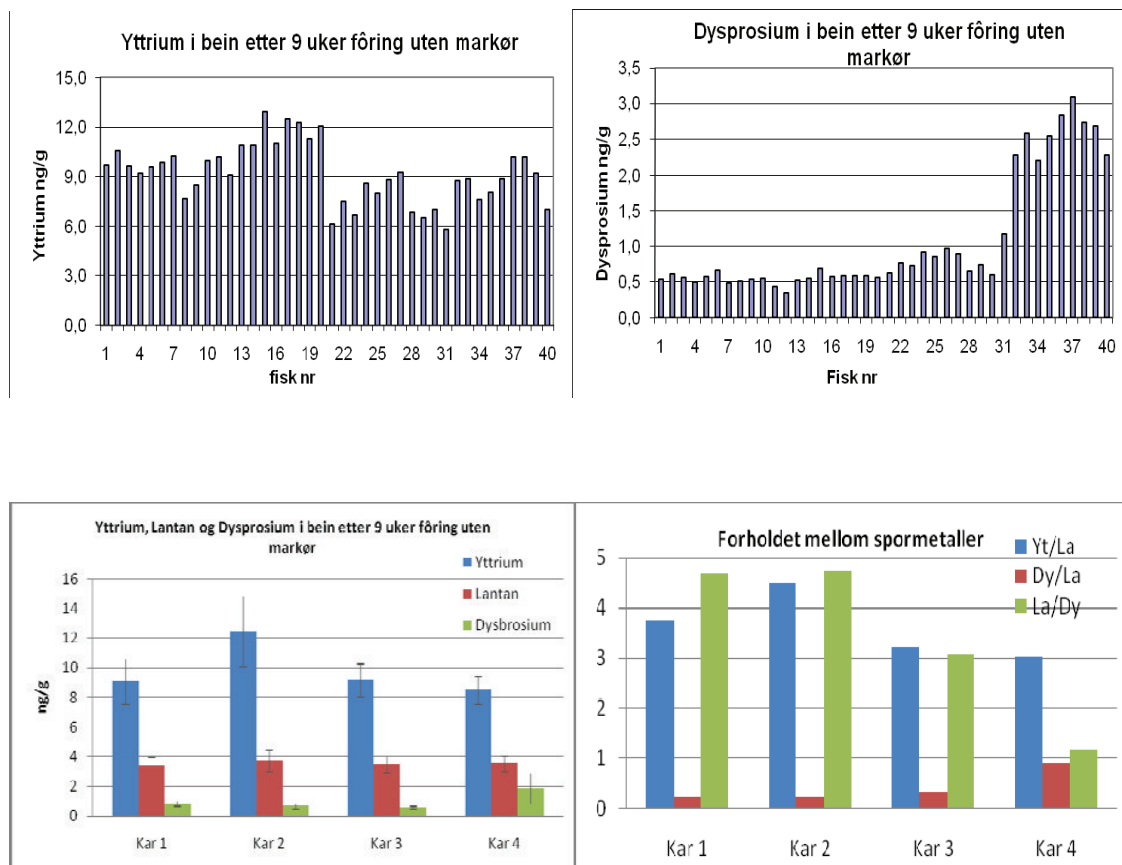
Disse resultatene bekreftet våre første analyser. Det er en signifikant økning av begge markørene ved den høyeste dosen. Ved den laveste dosen sees det en tendens, men

variasjonen i nivåene fra fisk til fisk er så pass store at dette ikke med sikkerhet kan skilles fra bakgrunnsverdiene.

Ved de benyttede analysene kan også mengde av andre sporelementer bestemmes. I dette tilfelle er Lantan inkludert, og ratio mellom Yttrium og Dysprosium vs Lantan er kalkulert. Som vist i figuren over vil en ratio på under 2 for Lantan/Dysprosium sannsynligvis skille seg så sikkert fra naturlig ratio at dette kan benyttes som et bedre ”bevis” på å ha en ”dysprosium-føret” laks, enn bare dysprosium-konsentrasjon alene.

”Utvasking/Fortynning”

Som nevnt ovenfor var det også et viktig spørsmål i denne pilotstudien hvorvidt en akkumulering i kroppen, kan følges i fisken over lengre tid. Og som vist nedenfor er de nivåer og det mønster vi finner i **bein** etter 9 uker på kontrollfôr svært positivt. Differansen mellom bakgrunnsverdier og verdier i de fiskene som er ”merket” er tilnærmet det samme som etter 4 ukers føring.



Diskusjon:

Denne pilotundersøkelsen ble gjennomført med den hensikt å klarlegge hvorvidt en ”merking” av laks i oppdrett via fôr vha tilsetning av lave nivåer av klorider av spormetaller kan være mulig, og konklusjonene må sies å være ganske klare:

- 1) Laksen tar helt klart opp både Yttrium og Dysprosium når disse blir blandet i fôret som kloridsalter, og disse elementene finnes igjen både i lever, bein og skjell.
- 2) Ved kort tids fôring må en dose rundt 1g/kg fôr antakelig benyttes for å få sikker forskjell fra bakgrunns-nivåer. Men det er sannsynligvis mulig å benytte lavere nivåer (ned mot 100mg/kg) hvis disse elementene tilsettes til fôret over lengre tid.
- 3) Våre ”utvaskings”-data tyder på at de akkumulerte elementene blir sittende i beinstrukturen, og kan derved detekteres i lengre tid etter fôring.
- 4) Gjennom samtidige analyser av andre naturlige spor-elementer kan sikkerheten i avgjørelsen om en enkelt fisk er ”merket” sannsynligvis styrkes. Dette adderer svært lite til analysekostnadene, men flere og mer omfattende analyser av ”naturlige” forhold mellom elementer må i tilfelle gjennomføres.
- 5) I denne pilot-studien ble Yttrium-klorid og Dysprosium-klorid benyttet. Laksen viser seg å ha lavt naturlig innhold av Dysprosium, noe som tyder på at dette elementet muligens er noe bedre anvendelig enn Yttrium, hvor laksen har et høyere bakgrunns-nivå. Imidlertid finnes det en rekke andre klorider av sjeldne jordmetaller tilgjengelig, og en test av noen flere av disse ville vært interessant.
- 6) Tilsetning av disse sjeldne jordmetallene til fôret syntes ikke å påvirke fiskens vekst eller trivsel, men hvis en bruk som markører blir aktuelt, må spørsmålet om mulige helseeffekter avklares nøyere.

Referanser:

Arslan, Z. And Paulson, A.J. (2003) "Solid phase extraction for analysis of biogenic carbonates by electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry (ETV-ICP-MS): an investigation of rare earth element signatures in otolith microchemistry" *Anal. Chim. Acta* 476, 1, 1-13.

Durbin, P.W, Williams, M.H., Gee, M., Newman, R.H. and Hamilton, J.G. (1956) "Metabolism of the lanthanons in the rat" *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 91, 78-85.

Jowsey, J., Rowland, R.E. and Marshall, J.H. (1958) "The deposition of rare earths in bone." *Rad. Res.* 8, 490-501.

Ennevor, B.C. (1994) "Mass marking of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, fry with lanthanum and cerium" *Fishery Bulletin* 92, 471-473.

Ennevor, B. C. and Beames, R.M. (1993) " Use of Lanthanide Elements to Mass Mark Juvenile Salmonids" *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50, 1039-1044.

Giles, M.A. and Attas, E.M. (1993): "Rare earth elements as internal batch marks for rainbow trout: retention, distribution and effects on growth of injected dysprosium, europium and samarium"

Thorrold, S.M., Jones, G.P., Hellberg, M.E., Burton, R.S., Swearer, S.E., Neigel, J.E, Morgan, S.G. and Warner, R.R. (2002) : "Quantifying larval retention and connectivity in marine populations with artificial and natural markers". *Bull. Marine Sci.*, 70(1) Suppl., 291-308.