

Sluttrapport

Identifisering og sporing av rømt oppdrettslaks med sjeldne grunnstoff

FHF-prosjekt nr. 900709

Magny S. Thomassen. Januar 2014



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

SAMMENDRAG

Formålet med dette prosjektet var å utvikle en metode som både enkelt og billig kan skille oppdretts- og vill-laks, og samtidig kunne spore den rømte oppdrettslaksen tilbake til anlegg. Sjeldne jord-elementer finnes i bein hos flere fiske-arter, men i svært lave konsentrasjoner. De fleste av disse elementene er ikke-radioaktive, lett håndterbare og har blitt vist å ha lang retensjonstid i bein. Hensikten med dette prosjektet var å teste ut bruk av flere forskjellige av disse elementene tilsatt som markører til laksefôr, og se om analyser av skjell kunne brukes som en enkel metode til å følge en slik merking.

Det ble som planlagt først gjennomført en undersøkelse av bakgrunns-verdier av totalt 17 forskjellige elementer ved å samle inn null-årig smolt fra 6 forskjellige kommersielle anlegg langs hele norske-kysten. Dette viste en stor variasjon i konsentrasjonen av de forskjellige elementene, og også forskjeller i fisk fra forskjellige anlegg.

Deretter gjennomførte vi de to planlagte fôringsstudiene med hhv ettårig og nullårig smolt satt ut i sjøvann. Forsøkene ble gjennomført i kar på Nofima's forskningsstasjon, og varigheten av merke-fôringen var ca 10 uker. I det første forsøket med ettårig smolt ble fem forskjellige elementer (Presodymium (Pr), Neodymium (Nd), Lantanum (La), Dysprosium (Dy) og Cerium (Ce)) testet ut, og i det andre forsøket med nullårig smolt ble to elementer (Dy og Pr) testet ut i forskjellig mengde og i blanding. Resultatene viser at skjell fra ett-årig og null-årig smolt ble merket av fôrtilsetning (125 eller 250 mg/kg fôr) av disse elementene i noe uker, og at det også var signifikant høyere konsentrasjoner av disse elementene etter 2 til 4 måneders «utvasking» enn det var i den fisken som ikke ble fôret på disse elementene. Dette tyder på at en slik metode kan brukes til merking av laks fra forskjellige anlegg, og at metoden er relativt enkel og lite stressende for fisken.

I tillegg oppdaget vi ved å benytte forholdstall mellom elementene spennende miljørelaterte forskjeller i bakgrunns-verdiene av de sjeldne jordelementene i oppdrettslaks. Forskjellige «fingerprint» hos fisk fra forskjellige anlegg kan muligens i seg selv være en interessant måte å gjenkjenne rømt fisk fra forskjellige anlegg. Ved kun å benytte miljøbetingede bakgrunnsverdier på 10 laks pr lokalitet ble de demonstrert sikre forskjeller både mellom geografisk fjerne anlegg og nære anlegg, men stor stabilitet innen lokalitet over en tidsperiode på ett år. Siden vi kan analysere for totalt 19 elementer i en og samme analyse, betyr dette at vi kan studere flere hundre forskjellige forhold (ratioer), og dermed trolig finne et «fingerprint» som er spesifikt for de individuelle anlegg.

SUMMARY

The main object of this project was to develop a method that both simply and cheaply can distinguish between wild and farmed salmon, and at the same time track the escaped fish back to its farm.

Rare earth elements are found in bone-structure of fish, but in very low concentrations. Most of these elements are non-radioactive, easy to handle and have been shown to have long retention time in bones. In the present project we planned to test out if addition of several of these elements to feed for salmon could be used as markers, and if scales could be used as an easy method to analyze these markings.

As planned, background levels of totally 17 elements were determined in smolt from six different commercial farms along the Norwegian coast. A great variation in concentrations of the different elements were observed, as well as significant differences between salmon from different farms.

Then we performed the two planned feeding studies using one- and zero-smolts in seawater. The studies were performed in tanks at Nofima's research station, and the "marker-feeding" continued for up to 10 weeks. In the first experiment with one-year old smolt we used five different elements (Praseodymium (Pr), Neodymium (Nd), Lanthanum (La), Dysprosium (Dy) and Cerium (Ce)), and in the second experiment with zero-year smolt we used two different elements (Dy and Pr) in different amounts and in mixture.

The results show that scales from both types of smolt was marked by the addition of these elements in the feed (125 and 250 mg/kg feed) for a few weeks, and that significant differences between scales from fish fed on the markers and the background were found after 2 to 4 months of "washing out".

So what we have shown in this project is that rare earth elements can be used as markers for salmon from different farms and that this method is relatively simple and of very little stress for the fish.

Moreover, we discovered highly interesting differences in background values of the rare earth elements in scales from farmed salmon. Different "fingerprints" in fish from different farms may possibly by itself be an interesting way of addressing the escapees back to their own farms! By using only the background values from 10 fish per farm we showed statistically significant differences both among farms from north and south, but also among farms located in close distance from each other. Since we by looking at ratios can obtain more than hundred different values it is possible that we can find "fingerprints" that are specific for each farm.

DEL I

1. INNLEDNING

Bakgrunn for prosjektet

Bakgrunnen var en idé om en mulig merkemethode og positive resultater fra et lite pilot-prosjekt med tilsetning av sjeldne jordelementer (Rare Earth Elements – REE) i fôr til lakse-smolt. Det var derfor nærliggende å søke om støtte til dette prosjektet da FHF annonserte sin interesse for utvikling av mulige merke-metoder for oppdrettslaks.

Prosjektets omfang

Det ble søkt om et forholdsvis omfattende forsøk, hvor bl.a. mulige helse-effekter var inkludert. I denne omgang ble imidlertid prosjektet begrenset til en uttesting av muligheten for bruk av sjeldne jord-elementer til merking av laksesmolt gjennom to fôringforsøk samt en undersøkelse av bakgrunnsinnhold av REE-er i skjell fra smolt i oppdrett, med en totalramme for støtte fra FHF på 2 millioner.

Prosjektorganisering

Prosjektet ble organisert som et samarbeid mellom Norges Miljø- og Biovitenskapelige Universitet - NMBU (Tidligere UMB), Nofima, Statens Arbeidsmiljø-Institutt (STAMI) og Swiss Federal Institute of Technology (ETH) i Sveits.

Prosjektet ble ledet av Professor Magny S. Thomassen ved NMBU. Deltakere fra Nofima var Professor Kjell-Arne Rørvik og Forsker Jens-Erik Dessen, fra STAMI Seniorforsker Yngvar Thomassen og fra ETH Dr. Detlef Günter. I tillegg deltok master-student ved NMBU Marta Perez.

Ansvarsområder:

- Magny S. Thomassen: Prosjektledelse og prosjektansvar, deltakelse i alle deler av prosjektet.
- Kjell-Arne Rørvik: Spesielt ansvar for planlegging og gjennomføring av fôringsforsøk
- Jens-Erik Dessen: Spesielt ansvarlig for de statistiske beregninger
- Yngvar Thomassen: Spesielt ansvar for ICP-MS analyser
- Detlef Günter: Spesielt ansvar for Laser- ablation ICP-MS
- Master-student Marta Perez: Spesielt del-ansvar for fôrings-forsøk med ettårig smolt.
- Ved FHF har Kristian Prytz vært ansvarlig for prosjektet.
- Styringsgruppe: Morten Rye– Akvaforsk Genetics Center AS
Tor Andre Giskegjerde – Ewos Innovation
Åsmund Baklien – Novartis Aqua Norge

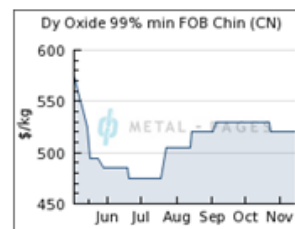
2. PROBLEMSTILLING OG FORMÅL

Prosjektets effektmål

Rømming av laks er et betydelig problem i norsk oppdrettsnæring, både økonomisk for den enkelte oppdretter og for tap av rykte og velvilje hos befolkningen. Å fremskaffe gode metoder til sporing av rømt laks er et indirekte bidrag til bedre kontroll av slik rømming. I dette prosjektet har hensikten vært å teste ut om en tilsetning av små mengder sjeldne jordelementer til fôr en kort periode etter utsett av smolt i sjøvann kan brukes til en metode for både å skille oppdrettslaks fra vill-laks, men også å kunne spore fisken tilbake til det anlegg den kommer fra.

Som beskrevet nedenfor mener vi at resultatene er lovende. Prøve-innsamling er enkelt, bare skarping av litt skjell og innsending i en konvolutt til analyse. Analysen vha ICP-MS er også relativt billig. Hvor mye elementene vil koste er det noe vanskeligere å estimere, men indikasjoner på kostnader som den jeg presenterte på FHF-seminaret på Gardermoen 19 og 20 november 2014 kan tyde på at dette vil kunne være overkommelig.

Er dette billig?



- Hvor mye fôr trengs: 120 g/fisk
- Hvor mye av et element: 200 mg x 0,12 kg = 24 mg/kg

Pris på Dysprosium-oksyd: 3500 kr/kg

Som betyr: 3,5 kr/g x 0,024 = 0,08 kr/fisk

Prosjektets resultatmål

Prosjektets faglige resultater er det redegjort for i del 2 i denne sluttrapporten, og resultatene fra fôringsforsøket med ettårig smolt er i tillegg presentert i en Master oppgave. (Engelsk, vedlegg 1). Prosjekt og resultater har fortløpende blitt presentert på en rekke Styringsgruppemøter som listet under punkt 6, og har også blitt presentert på to FHF-seminarer. Abstrakt er innsendt til det kommende FHF/NFR-møtet i Tromsø 31 mars-2 april, og til det internasjonale fiske-ernæringsmøtet i Cairns, Australia 25-30 mai 2014. Vi er nå

også i gang med skriving av en vitenskapelig artikkel om fôringsforsøkene, tenkt publisert i Aquaculture.

3. PROSJEKTGJENNOMFØRING

Valg av forskningsmetode

Selve metoden for merking lå i selve ideen om å bruke de sjeldne jordelementene i fôret. Et lite pilotforsøk i forkant gjorde valg av fôrings-tid og mengde av element som skulle brukes noe enklere, men disse parametrene lå i prosjektet som noe av det som skulle testes. Bruk av ICP-MS var nødvendig for de akkumulerte mengder av elementene som vi forventet. Vi valgte også å teste ut bruk av laser-ablation ICP-MS for om mulig å teste ut i hvilke vekstsoner i skjell og otolitter (ørestener) hvor de akkumulerte elementene befant seg. Både skjellprøver og otolitter ble sendt til Sveits, men det viste seg imidlertid å ikke være mulig da konsentrasjonene dessverre er for lave for denne metoden.

Gjennomføring av prosjektet/ Redegjørelse for avvik

Prosjektet ble gjennomført i henhold til plan, men med avvik i tid pga biologiske forhold (tidspunkt for tilgang på smolt og egnede forsøksfasiliteter), og at de siste analysene som skulle gjennomføres høsten 2013 ble forsinket grunnet instrument-problemer. Bortsett fra disse avvikene har prosjektet blitt gjennomført som planlagt.

4. OPPNÅDDE RESULTATER, KONKLUSJON

Detaljert oversikt over resultater/målsettinger, og vurderinger av funnenes gyldighet

En detaljert beskrivelse av resultatene er gitt i del 2 av rapporten (30 sider) sammen med beskrivelse av analyse-kontroll og statistikk.

Vi har i prosjektet gjennomført uttesting av bakgrunns-nivåer av sjeldne jordelementer i skjell hos smolt fra oppdrett (Arbeidspakke 1)

Vi har testet ut brukeligheten av fem forskjellige sjeldne elementer til bruk i fôr hos ettårig smolt (Arbeidspakke 2)

Og vi har testet om 0-årig smolt, som vanligvis går ved lave vanntemperaturer første vinter etter utsett i sjø, også blir merket på samme vis som ettårig smolt. Forskjellige innblandingsnivåer av element, og blandinger av to forskjellige element ble testet (Arbeidspakke 3).

Videre anvendelse av resultatene fra prosjektet

Resultatene fra dette prosjektet vil danne basis for en videre uttesting i praktisk skala om dette vil vise seg å være av interesse. I tillegg kan den oppdagelsen som ble gjort i prosjektet mht mulig identifisering basert på basis «fingerprint» av de sjeldne jordelementene, muligens uten nødvendig fôring, benyttes som grunnlag for videre utforskning av en slik mulighet.

Mulige bidrag til FHF's visjon om bærekraftig og lønnsom sjømatnæring

Som nevnt i innledningen er rømming et alvorlig problem i norsk oppdrettsnæring, og en bedre kontroll og forhåpentligvis reduksjon i rømmingen vil være med å sikre en bærekraftig lakseoppdrett i framtiden. Merketeknikker kan sannsynligvis være med på (indirekte) å øke de enkelte anleggs vilje og evne til å følge opp mistanker om rømming. I tillegg vil den informasjon som kan framkomme med sikrere registreringer av rømt fisk også gi større muligheter til å vurdere betydningen rømt laks kan ha.

5. LEVERANSER

Oversikt over leveranser sammenholdt med prosjektplan

Hensikten med dette prosjektet var å teste ut bruk av sjeldne jordelementer i fôr som en forholdsvis enkel og billig metode til å identifisere oppdrettet fra vill laks, og som dessuten samtidig vil kunne spore laksen tilbake til det anlegg fisken kommer fra. Vi mener at vi gjennom våre resultater har vist at laks kan merkes med forholdsvis små mengder av disse elementene i fôret en kort tid etter utsett i sjøvann, og at bruk av forskjellige merker ser ut til å kunne skille mellom forskjellige anlegg. At denne teknikken er enkel siden den kun forutsetter skraping av litt skjell fra fisken som så kan sendes direkte inn for analyse er også en praktisk fordel.

I leveransebeskrivelsen var det også nevnt en sammenligning til Tom Hansens mulige metode, men deres uttesting av sjeldne elementer i et vaksinasjons-eksperiment gav for lave verdier til at de kunne detekteres i deres laser-ablation-analyser.

Vi sa også at vi skulle informere Styringsgruppe, FHF og også næringen om våre oppnådde resultater gjennom Styringsgruppe-møter, rapporter og foredrag på seminar og lignende. Her er en liste over våre presentasjoner og rapporter:

- Styringsgruppe-møte, 13. oktober 2011
- Styringsgruppe-møte, Gardermoen, 30. august 2012
- Styringsgruppe-møte, Flesland, 21. februar 2013
- Styringsgruppe-møte, Gardermoen 5. september 2013
- FHF-seminar, Gardermoen, 26-27 november 2012

- FHF-seminar, Gardermoen, 19-20 november 2013
- Institutt-seminar IHA, 10.april 2013
- Aquagruppe-seminar, Nofima, Ås, 27. september 2012
- Poster på NMBU`s stand på AquaNor, 13-16. august 2013
- Presentasjon på instituttets nettsider, lagt ut 20/11 2013

Seks enkeltrapper ble sendt til dem som var svært hyggelige og gav oss nylig utsatt 0-årig smolt fra sine anlegg til vår bakgrunns-analyser: «Sjeldne jord-elementer i skjell hos oppdrettslaks: Tilbakemelding, takk og en liten forespørsel», September 2012. I disse rapportene fikk de sine egne data pluss en sammenligning til gjennomsnittsdata fra alle anlegg (Et eksempel er vedlagt. Vedlegg 2).

Som nevnt ovenfor er det produsert en Master-grad i prosjektet. Marta Perez: «Feasibility of using rare earth elements (REEs) to mark and identify escaped farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.)» September 2013.

Planlagte publikasjoner med referee

Vi er også i gang med å skrive på en vitenskapelig publikasjon med samme arbeidstittel som i mastergraden, hvor fôringsstudiene vil inngå, men det foreligger ennå ikke et manuskript som er egnet til innsendelse nå. Dette kan ettersendes om ønskelig.

Vi mener også at bakgrunns-resultatene våre burde være av interesse, da slike data så vidt vi vet, ikke finnes. En norsk eller internasjonal artikkel kan bli laget på grunn av disse dataene.

Planer for videre formidling

Prosjektet og våre resultater vil bli presentert på FHF/NFR sitt møte i Tromsø 31mars-2april, og på Den 14. internasjonale fiskeernæringskonferansen (ISFNF) i Cairns, Australia, 25-30 mai.

6. KVALITETSSIKING AV GJENNOMFØRING OG RESULTATER

Sikringen av kvalitet på fôringsforsøkene ble utført i hht de rutiner som finnes på forskningsstasjonen på Sunndalsøra, samt at jeg som prosjektleder deltok på de fleste uttak. Analyser av sjeldne jordelementer ble foretatt etter utarbeidede rutiner ved STAMI, med kontroll og oppfølging av prosjektmedarbeider Y. Thomassen.

Ved publisering vil alle rådata sikres på et «låst» nettsted hos IHA

DEL II

Faglig rapport

Identifisering og sporing av rømt oppdrettslaks med sjeldne grunnstoff

FHF-prosjektnr. 900709

INNHALDSFORTEGNELSE

1.INTRODUKSJON	3
2.BAKGRUNN	3
2.1 Sjeldne jordelementer	3
2.2 Tidligere forsøk med REE	4
3. PLANER FOR PROSJEKTET	6
4. MATERIALER OG METODER	7
4.1 Kjemikalier	7
4.2 Fôr og fôring	7
4.3 Fisk og forsøksoppsett	7
4.4 Prøveuttak	9
4.5 Prøvebearbeidelse og kjemiske analyser	10
4.6 Beregninger og korreksjoner	10
4.7 Statistiske analyser	11
5. RESULTATER	12
5.1 Bakgrunnsnivåer	12
5.2 Test av flere sjeldne jordelementer som merker til 1-årig smolt i sjøvann.	13
5.3 Merkestudium på 0-årig smolt i sjøvann med forskjellige nivåer og blandinger av elementer i fôret, og ved kaldere temperaturer.	20
5.4 Test av bakgrunnsnivåer mht identifisering av laks fra ulike kommersielle anlegg.	25
6. DISKUSJON	28
6.1 Bakgrunnsnivåer	28
6.2 Fôringsstudier	28
7. KONKLUSJON	31
8. REFERANSER	32

1. INTRODUKSJON

Med bakgrunn i behovet for nye og bedre metoder til identifisering og sporing av rømt oppdrettslaks, var ideen til dette prosjektet å utvikle en **enkel** og **billig** teknikk som gjør en i stand til ikke bare å skille mellom oppdrettslaks og villaks, men også å spore den rømte laksen tilbake til det aktuelle oppdrettsanlegget. Resultatene fra et pilotprosjekt (ikke publisert) tydet på at inkorporering av sjeldne jordelementer (Rear Earth Elements – REEs) i laksens skjell etter tilsetning til fôret var verdt å undersøke som en potensiell merkemethode.

Kjemisk merking gjør det mulig å merke store grupper av fisk slik at individuell håndtering ikke blir nødvendig. Dette reduserer sterkt behovet for arbeidskraft og sikrer bedre dyrevelferd. De sjeldne jordelementene er dessuten ikke-radioaktive, enkle å håndtere og relativt billige. De er kjent for å være “bein-søkende” og har lang retensjonstid når de er bygd inn i beinstrukturer slik som skjell. I dette prosjektet planla vi derfor å evaluere om tilsetning av små mengder av forskjellige REE-er til fôr en kort tid etter overføring til sjøvann kan benyttes som en markør-metode i oppdrettsnæringen.

2. BAKGRUNN

2.1. Sjeldne jordelementer

Navnet «sjeldne jordelementer» refererer til et sett av 17 elementer i gruppe III i det periodiske system (Fig. 1.), de 15 «lantanidene» pluss yttrium (Y) og scandium (Sc) (Humphries 2012).

	1																		18	
1	H																			He
2	Li	Be																		Ne
3	Na	Mg																		Ar
4	K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br			Kr
5	Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I			Xe
6	Cs	Ba	Lantha- nides	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At			Rn
7	Fr	Ra	Acti- nides																	
			Lantha- nides	La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb			Lu

Fig. 1. Sjeldne jordelementer (merket gult) og plasseringen i det periodiske system.

Y og Sc blir ofte tatt med sammen med lantanidene siden de ofte finnes sammen i naturlige mineraler og har mye de samme kjemiske egenskaper.

REE-ene brukes i dag i mange sammenhenger, som blant annet i katalysatorer, lyspærer, batterier, keramikk og permanente magneter (Goonan 2011). Se figur 2.

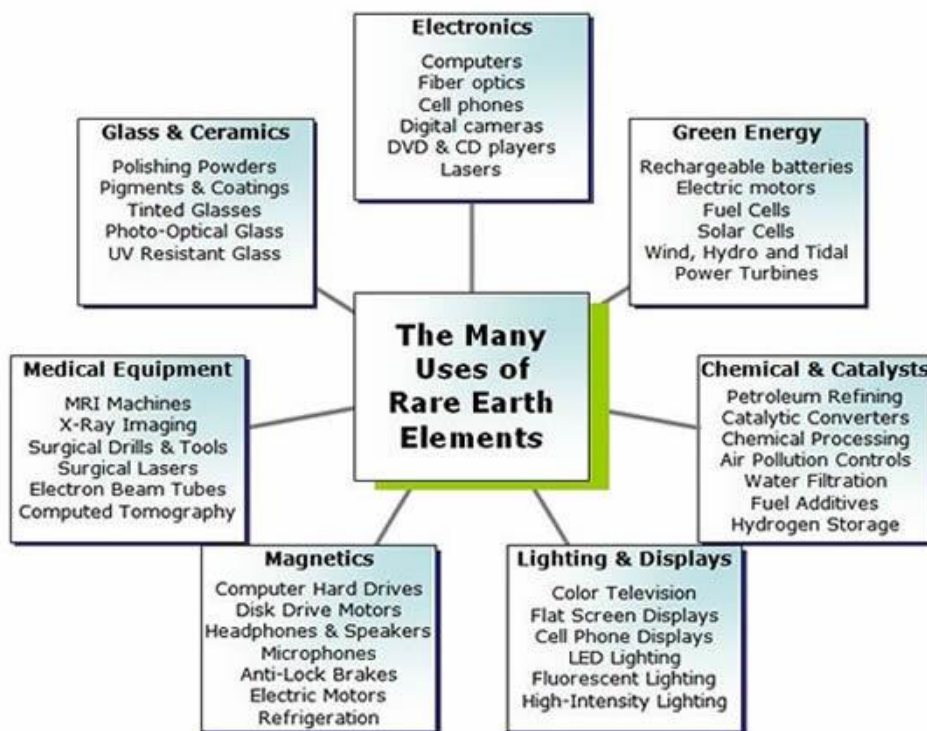


Fig.2. Viktige bruksområder for sjeldne jord-elementer (REE).

2.2. Tidligere studier med REE:

Det er kun noen få forsøk som har vært gjort med tanke på å bruke REE til merking av fisk. Michibata (1981) brukte samarium (Sm) til merking av medaka (*Oryzias latipes*) og goldfish (*Carassius auratus*). Samarium-klorid ble tilsatt i fôret (66 mg/g) og fisken fôret i 30 dager. Det ble funnet at nivået av Sm falt relativt mye 30 dager etter fôring, men ble så funnet å være bortimot stabilt i over ett år. Zak (1984) prøvde også å bruke Sm til å merke american shad (*Alosa sapidissima*) og Atlantisk laks (*Salmo salar* L.) gjennom fôring eller bad. Samarium ble inkorporert, men var ikke detekterbart 30 dager etter behandlingen.

Europium (Eu) har også blitt brukt til merking (Kato 1985). Europium-klorid (817 ppm) ble tilsatt i fôret til coho salmon (*Onchorynkus Keta*) og fisken fôret i 40 dager. I skjellene ble Eu detektert 2 år etter merking. Dysprosium (Dy) ble også testet på larver av chinook salmon, men Dy ble bare detektert i den injiserte fisken, hvor Dy ble funnet i bein etter et halvt år. Ennevor and Beames (1993) tilsatte lantan (La) og samarium (Sm) acetat i vann til ung coho salmon (10 og 100 µg/l i 3 og 6 uker). La og Sm ble funnet i ryggraden, i øresteiner (otolither) og i skjell 10.5 måneder etter merkingen. I det samme arbeidet ble multi-element-merking av coho yngel og smolt demonstrert ved bruk av kombinasjoner av lantan og cerium (Ce). Dysprosium, europium og samarium ble benyttet til å merke regnbueørret (Giles og Attas 1993). En klorid-suspensjon med 12.7 µg av Dy eller Eu, eller med 127 µg Sm, eller med en blanding av 12.7 µg Dy, 12.7 µg Eu og 254 µg Sm, ble injisert intraperitonealt. Nivåene av Dy og Eu sank med 40-50 % i løpet av de første 6 månedene men holt seg så stabilt i 1.5 år. Sm-nivået var stabilt i hele forsøksperioden på 2 år. Det var tilnærmet ingen effekt av denne merkingen på vekst og seksuell utvikling. Fysiologiske effekter var begrenset til midlertidig økning i vekt av tarm i forhold til kroppsvekt, og til et svakt ødem i nyrene.

Resultatene fra disse merkeforsøkene viste at REE blir tatt opp i fisk og akkumulert i beinstrukturer. Som påpekt allerede av Michibata i 1981 for samarium, bør REE kunne være gode kjemiske elementer til merking av fisk siden de har flere fordeler: (1) det tilsynelatende fraværet av uheldige virkninger på fisken, (2) den trolig lave sannsynligheten for interferens fra naturlig forekommende REE, (3) en lang biologisk levetid for REE avsatt i fisken, (4) ingen radioaktiv kontaminering av fisk eller andre organismer, og (5) trygghet i håndtering.

Alle disse forsøkene som er referert ovenfor ble gjennomført for en god del år siden da analysemulighetene og deteksjonsgrensene til dels var mer kompliserte eller dårligere enn i dag. Analyser gjøres i dag vanligvis ved hjelp av ICP-MS (Ion-Coupled Plasma Masse-Spektrofotometri). Denne metoden har lave deteksjonsgrenser og alle de aktuelle elementene fås gjennom en og samme analyse. Dette gjør deteksjon av mindre mengder mulig, og relativt enkelt og billig.

3. PLANER FOR PROSJEKTET

Hovedhensikten med dette prosjektet var å teste ut brukeligheten av sjeldne jordelementer til merking av laksesmolt i sjøanlegg. Vil tilsetning av små mengder av disse elementene gi oss en metode for merking av laks som både er enkel og billig? Vil merkene vare så lenge at vi vi kan skille rømt oppdrettslaks fra villaks, og spore laksen tilbake til sitt eget oppdrettsanlegg?

Spesielt ville vi:

- ❖ *Bestemme bakgrunnsnivåer av sjeldne jord-elementer i skjell fra smolt fra forskjellige produsenter og satt ut ved forskjellige lokaliteter*
 - Finner vi alle elementene naturlig i skjell?
 - Er det stor variasjon mellom anlegg?

- ❖ *Teste ut flere forskjellige elementer tilsatt i fôr til 1-årig smolt i sjøvann.*
 - Blir skjellene merket i samme grad med alle elementene?
 - Er det nivået og den fôringstiden vi har valgt OK?
 - Hva skjer når vi går over til vanlig fôr?
 - Vokser fisken godt på alle merkeførene?

- ❖ *Merkestudium på 0-årig smolt i sjøvann med forskjellige nivåer og blandinger av elementer i fôret og ved kaldere temperaturer.*
 - Oppfører 0-åringen seg annerledes?
 - Vil en blanding av elementer også kunne brukes?

4. MATERIALER OG METODER

4.1. Kjemikalier:

De sjeldne jordelementene som ble benyttet i dette prosjektet var alle innkjøpt fra Treibacher Industrie AG (Althofen, Østerrike) som klorider. Kloridformen ble valgt siden disse er lett løselige i vann, og siden vi hadde funnet inkorporering i skjell ved bruk av disse i et tidligere pilot-forsøk (ikke publisert). Til oppløsning av skjell, fôr og faeses ble det brukt salpetersyre (HNO_3) fra Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland). Løsninger som ble benyttet for kalibrering av ICP-MS instrumentet ble laget fra en multi-element standard-løsning av REEs og fra enkelt-element standard-løsninger av U, As og Sr, alle fra Spectrapure Standards (Oslo, Norge).

4.2. Fôr og fôring:

Basisen for alle fôrene var et vanlig kommersielt fôr (3 mm) fra Skretting AS, Averøy. De forskjellige eksperimentelle fôrene så ble laget ved coating av basisfôret med de forskjellige elementene løst i vann ved bruk av en sement-blander. Y_2O_3 ble også tilsatt i blandingen som inert markør for fordøyelses-målinger. Deretter ble fôrene tørket over natt før vi la ytterst et lag med rapsolje for å beskytte mot tap av de tilsatte elementene. Vi brukte en tilsetning av elementene på 125 eller 250 mg/kg fôr, alene eller i blanding, og 100mg/kg yttriumoksyd. Fôring ble gjennomført i henhold til tabell.

4.3. Fisk og forsøksoppsett:

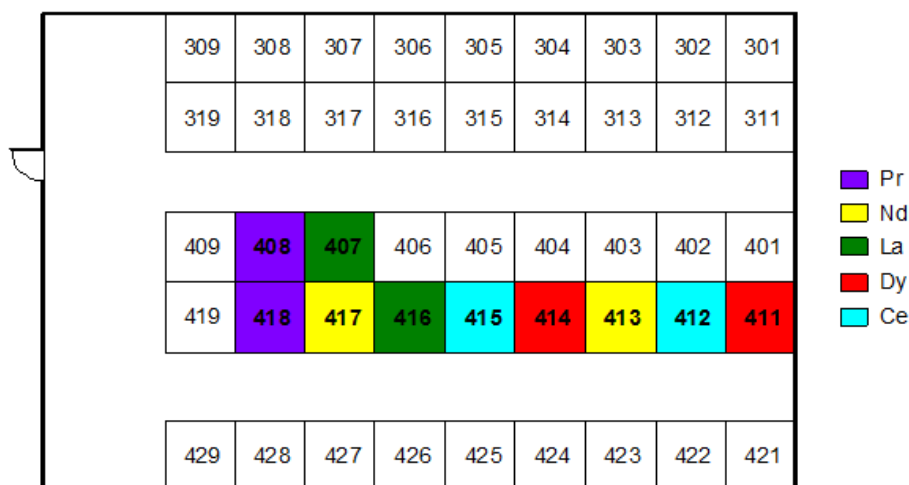
Det ble innledningsvis innhentet 0-årig smolt nylig utsatt i sjø fra 6 kommersielle oppdrettsanlegg langs kysten fra Rogaland til Finnmark for få info om nivå og variasjon i bakgrunnsnivå innen og mellom geografiske områder.

Det ble som planlagt gjennomført to fôringsforsøk i dette prosjektet. Begge ble gjennomført på Nofima sin forsknings-stasjon på Sunndalsøra, det første med ettårig smolt med en startvekt på 87.3 ± 1.57 gram (Mai-September 2012), det andre med nullårig smolt med startvekt $92,9 \pm 2,90$ (Jan - Juli 2013). All fisk ble pit-tag merket før forsøksstart.

Forsøk med ettåring

Fisken ble fordelt på 10 kar med sjøvann, 50 fisk pr. kar. Gjennomsnittlig temperatur på sjøvannet var 9,4°C. Fisken ble akklimatisert til tankene og fôret på det kommersielle fôret noen dager før eksperimentet startet. Forsøket bestod av en 10 ukers merke-periode (fra 9 mai til 18 juli) hvor fisken fikk fôr tilsatt de forskjellige REE-ene fulgt av en «utvaskings-periode» på 2 måneder (fra 18 juli til 19 september) hvor fisken fikk vanlig kommersielt fôr. I dette forsøket ble fem forskjellige REE testet for å lære om alle disse kunne brukes til merking av ettårig smolt, og om den mengden (250 mg/kg) og den tiden (5 til 10 uker) vi hadde valgt som mulig merke-periode ville fungere. De elementene vi hadde valg å teste var: Praseodym (Pr), Neodym (Nd), Lantan (La), Dysprosium (Dy) og Cerium (Ce).

De fem eksperimentelle diettene ble tilfeldig tildelt tanker som vist i fig. 3.



Figur 3: Plassering av kar i anlegget.

Forsøk med 0-åring:

Fisken ble fordelt på 8 kar med sjøvann, 50 fisk pr. kar. Gjennomsnittlig temperatur på sjøvannet i merkeperioden var 6,6°C. Fisken ble akklimatisert til tankene og fôret på det kommersielle fôret noen dager før eksperimentet startet. Forsøket bestod av en 10 ukers merke-periode (fra 15 januar til 20 mars) hvor fisken fikk fôr tilsatt de forskjellige merke-fôrene, fulgt av en «utvaskings-periode» på 4 måneder. I dette forsøket ble de to beste elementene fra forsøk 1, Dy og Pr, testet på 0-årig smolt, hver for seg og i blanding, samt at det ble brukt to forskjellige innblandingsnivåer av Dy (se tabell 1).

Tabell 1. Innblanding av elementer i de forskjellige fôrene.

Fôr nummer	Tilsetning av Dy-klorid	Tilsetning av Pr-klorid
1	125 mg/kg	
2	250 mg/kg	
3	125 mg/kg	125 mg/kg
4		125 mg/kg

4.4. Prøveuttak:

Før start av forsøkene (S0) ble det tatt ut 10 fisk for bestemmelse av bakgrunnsnivåer i skjell av de enkelte elementene, og det ble tatt prøver av alle fôrene for element-analyser. Deretter ble det tatt 10 tilfeldige fisk, men slik at de hadde samme gjennomsnittsvekt som all fisk i karet, fra hver tank etter 5 (S1) og 10 uker (S2) fôring. Ved slutt av «utvaskingsperioden» (S4) ble det på samme måte tatt ut 10 fisk fra hvert kar. Ved prøveuttak ble all fisk bedøvd ved bruk av MS-222 (Metacaine 0.1 g/l; Alparma, Animal Health Ltd, Hampshire, England) og individuell kroppsvekt og lengde ble registrert på prøvefisken før innfrysing ved -20°C. Ved avslutning av merkefôringen (S2), ble det samle faeces-prøver for å se på tilsynelatende fordøyelighet av de forskjellige elementene (Austreng et al. 1978). En oversikt over prøveuttakene i de to fôringsforsøkene er vist i tabell 2.

Tabell 2. Oversikt over prøveuttak, merkeforsøk med ettårig og nullårig smolt.

Prøve-uttak	Merkeperiode			Utvaskings-periode
	S0	S1	S2	S3
Fôruttak	X			
Fiskeuttak	X ¹	X ²	X ²	X ²
Vekt og lengde	X	X	X	X
Faeses-uttak			X ³	

¹ Ved start av forsøket ble 10 fisk tatt ut til analyser.

² Uttak av 10 individuelle fisk per tank.

³ Faeces prøver ble tatt fra 20 fisk per tank.

4.5. Prøvebearbeidelse og kjemiske analyser:

Skjell ble skrappt med en skalpell fra oversiden av sidelinjen under ryggfinnen. Mengde skjell som ble skrappt fra hver fisk var i størrelsesorden 0,3 gram, fôrprøver ca 0,15 gram og faecesprøver ca 0,3 gram. Disse ble veid og overført til i 15 ml polypropylene testrør før de ble tørket i ovn 105 °C til konstant vekt, og tørrvekt registrert.

Før element-analysen ble 100 µl av intern standard tilsatt til alle prøver for mulig korreksjon av instrumentelle endringer. Deretter ble prøvene oppløst i 2 ml HNO₃ i ovn ved 90 °C i 3 timer. Etter dette ble prøvene fortynnet til 14 ml med de-ionisert vann. En videre 5-ganger fortynning av alle prøvene viste seg nødvendig for å unngå saltavsetning og redusere matrikseffekter. For en nøyere beskrivelse av instrument og innstillinger se Marta Perez de Nanclares (MasterThesis 2013). Vedlagt.

Deteksjonsgrensene for de fem høyest forekommende element- isotopene ble testet ut i disse forsøkene, og er vist i tabell 3:

Tabell 3. Deteksjonsgrenser for de fem element-isotopene analysert i prøvene.

	Tested elemental isotopes				
	¹³⁹ La	¹⁴⁰ Ce	¹⁴¹ Pr	¹⁴³ Nd	¹⁶³ Dy
LOD (ng/l)	0.35	0.65	0.11	0.49	0.14

4.6. Beregninger og korreksjoner:

Veksthastighet er presentert som TGC (Thermal Growth Coefficient) som beskrevet av Cho (1992):

$$TGC = (W_1^{1/3} - W_0^{1/3}) \times (\Sigma T)^{-1} \times 1000, \quad (1)$$

hvor W_0 og W_1 er start- og sluttvekt (tank-gjennomsnitt i gram), og ΣT sum døgngrader. Faktoren 1000 er inkludert for å forenkle tallene.

Gjennomsnittlig veksthastighet i hele forsøksperioden ble estimert ved å vekte (basert på relativ vektøkning) TGC for de forskjellige periodene.

Tilsynelatende fordøyelighet ADC (Apparent digestibility coefficients) for de testede elementene ble begrenset ved en indirekte metode hvor vi brukte Y_2O_3 som inert markør (Austreng et al. 2000):

$$ADC(\%) = 100 - \left[100 \times \left(\frac{\text{element i faeces}}{\text{element i fôr}} \times \frac{Y^2O^3 \text{ i fôr}}{Y^2O^3 \text{ i faeces}} \right) \right] \quad (2)$$

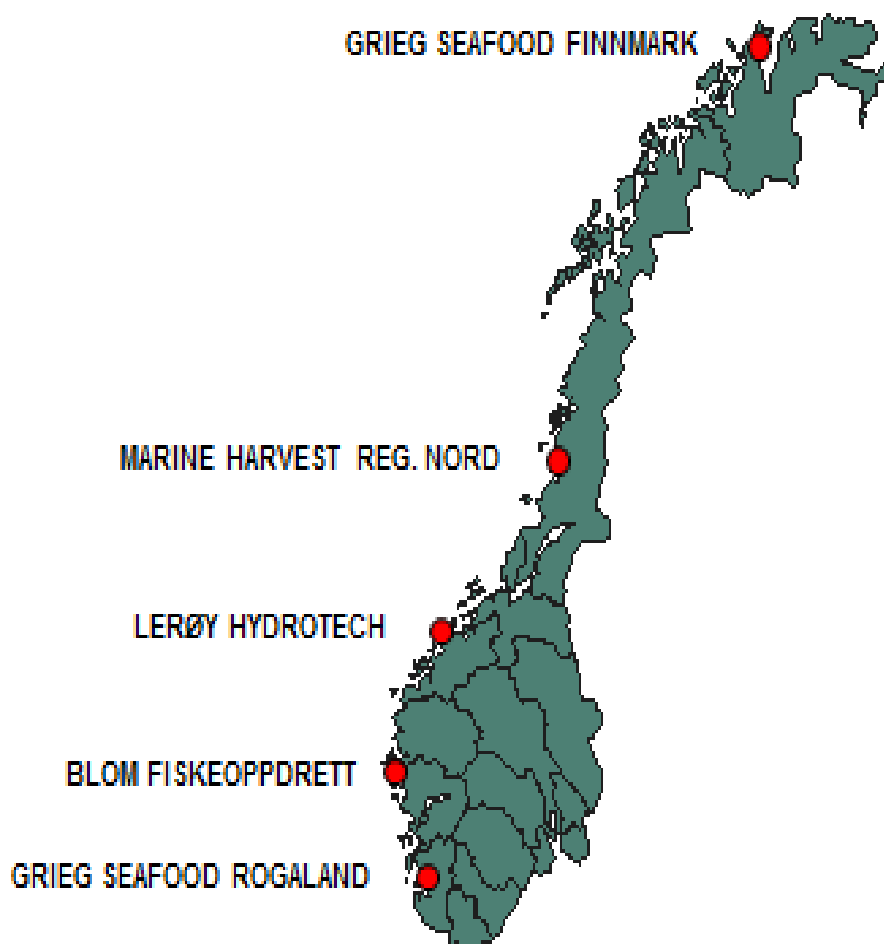
4.7. Statistiske analyser:

Dataene ble analysert med en-veis varians-analyse (ANOVA), med elementinnholdet i skjell, kroppsvekt og TGC som avhengige variable og dato, periode eller fôr som klasse-variable vha General Linear Model (GLM) prosedyre i SAS. Tank ble brukt som eksperimentell enhet. Signifikante forskjeller ble indikert vha Duncan's multiple range test (significant: $p \leq 0.05$ og trend: $p \leq 0.1$). Lineær, potensiell eller eksponentiell regresjons-analyser ble gjennomført med Microsoft Excel for å estimere et forhold mellom to variabler. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm målefeilen for middeltallet (SEM) når tank-gjennomsnitt blir brukt, og som gjennomsnitt \pm standard avviket (SD) når individ-variasjoner ble undersøkt.

5. RESULTATER

5.1. Bakgrunnsnivåer

Før vi startet å teste ut noen av de sjeldne jordelementene tilsatt til fôr var det viktig å kjenne til bakgrunnsnivåene i skjell hos smolt i oppdrett. Slike data fantes ikke tilgjengelige, og derfor tok vi kontakt med forskjellige oppdretts-firmaer og ba om smolt som nylig var satt ut i sjøen. Alle de vi kontaktet var svært behjelpelige, og vi fikk tilsendt 0-åringer fra seks forskjellige anlegg langs hele kysten fra Rogaland til Finnmark som vist på figur 4. Fra ett selskap fikk vi fisk fra to nærliggende anlegg.



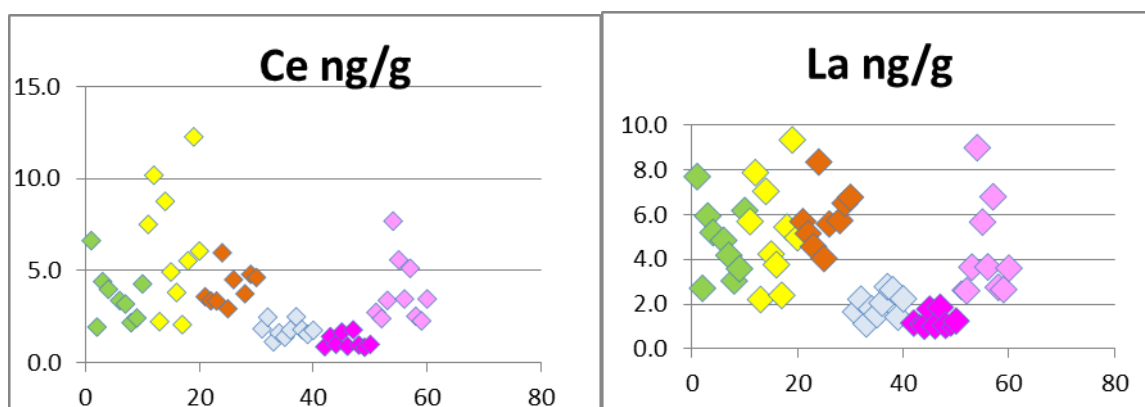
Figur 4. Lokalisering av de oppdrettsanleggene som gav oss 0-årig smolt for bestemmelse av bakgrunnsnivåer av REE.

Gjennomsnittsverdiene for alle de analyserte elementene er vist i tabell 4.

Tabell 4: Gjennomsnittverdier i (ng/g) for sjeldne jordelementer (REE) i laksesmolt fra 6 norske oppdrettsanlegg.

Element	As	Ce	Dy	Er	Eu	Gd	Ho
Gj.snitt ± std	647.0 ± 233.0	3.51 ± 0.24	0.18 ± 0.11	0.17 ± 0.12	4.10 ± 2.92	0.46 ± 0.26	0.06 ± 0.04
Element	La	Lu	Nd	Pr	Sc	Sm	
Gj.snitt ± std	3.90 ± 2.26	0.34 ± 0.35	2.08 ± 1.21	0.60 ± 0.36	12.51 ± 4.73	0.37 ± 0.22	
Element	Sr	Tb	Tm	U	Y	Yb	
Gj.snitt ± std	327.2 ± 113.7	0.40 ± 0.33	0.03 ± 0.03	63.73 ± 28.28	5.18 ± 2.03	0.14 ± 0.10	

Ved analyse av skjell fra disse 0-åringene fant vi til dels store variasjoner både innen og mellom anlegg, som tydelig vist for Cerium og Lantan i figur 5. Forskjellene mellom anlegg kunne tyde på at disse fiskene hadde vært utsatt for svært varierende mengder av sjeldne jordelementer, enten fra vann eller fôr.



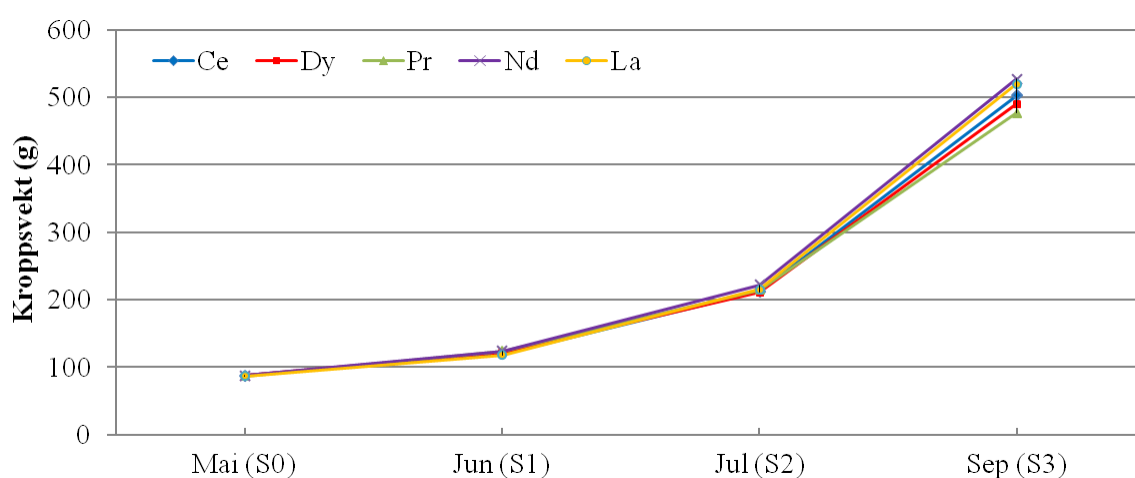
Figur 5. Bakgrunnsverdier av Ce og La i skjell fra 0-årig smolt fra forskjellige anlegg, hvert anlegg er gitt en egen farge.

5.2. Test av flere sjeldne jordelementer som merker til 1-årig smolt i sjøvann.

Vekst og dødelighet:

Det er selvfølgelig viktig for mulig bruk av REE til merking av laksen at flere av elementene tas opp og bygges inn i skjellene. Det første vi ville teste var derfor hvordan en utvalgt gruppe av disse elementene oppførte seg ved tilsetning til fôr hos vanlig ettårig smolt nylig overført til sjøvann. Vi brukte klorider av følgende elementer: Cerium (Ce), Dysprosium (Dy),

Praseodym (Pr), Neodym (Nd) og Lantan (La), 250 mg/kg fôr. Smolten gikk i to parallelle tanker pr. fôr, 50 fisk i hver tank. Hele fôringsperioden med merkefôr varte i 10 uker, og vi tok prøver av fisken ved start, etter 5 og ved slutt. Deretter ble fisken overført til samlekar og fôret på kommersielt fôr i 2 måneder. Beregnet TGC for merkeperiode, utvaskingsperiode og totalt for hele eksperimentet er vist i tabell 5. Det ble ikke funnet noen forskjeller mellom merkefôrene i noen av periodene. Det var relativ god vekst og ingen signifikant forskjell mellom fôrtypene. Fra start til slutt vokste laksen fra ca 90 gram til 500 gram (figur 6). Kun to fisk døde (like etter start) i løpet av hele forsøket.



Figur 6. Utvikling i kroppsvekt for Atlantisk laks 1⁺ smolt fôret fem forskjellige REE-supplert dietter (Ce, Dy, Pr, Nd og La) i løpet av forsøksperioden.

Tabell 5. Termisk vekst koeffisient (TGC) for hver av de ulike 1⁺ smolt diettgruppene (gjennomsnitt av tanker \pm SEM, n = 2) i løpet av de to hovedforsøksperiodene og den totale vektete TGC for hele forsøksperioden.

Periode	TGC					P-verdi	R ²
	Ce	Dy	Pr	Nd	La		
Merking periode	3.23 \pm 0.07	3.13 \pm 0.19	3.15 \pm 0.05	3.36 \pm 0.29	3.40 \pm 0.22	0.79	0.25
Utvasking periode	2.88 \pm 0.16	2.72 \pm 0.16	2.69 \pm 0.16	2.94 \pm 0.10	2.88 \pm 0.19	0.74	0.28
Totalt perioden	2.99 \pm 0.08	2.85 \pm 0.17	2.84 \pm 0.12	3.08 \pm 0.02	3.03 \pm 0.19	0.65	0.34

Fordøyelse og fôranalyser:

Ved slutten av merkeperioden ble faeces samlet fra 20 fisk fra hver tank. Analyser av fôr og faeces viste overraskende at alle de 5 testede REE kloridene hadde negative verdier for fordøyelighet (Tabell 6). Siden analysene av fordøyelighet viste et relativt høyere nivå av REE i faeces enn i fôret, indikerer dette prinsipielt at de undersøkte jordelementene også tas

opp fra vannet (Rørvik et al. 2010). Forklaringen på dette er trolig at fôringsforsøkene ble utført i sjøvann og i sjøvann drikker alle benfisk for å kompensere for det osmotiske væsketapet fisken utsettes for når saliniteten i vannet er større enn elektrolyttnivået i fisken.

Tabell 6. Konsentrasjon av de fem testede REE-klorider og Yttrium i alle de eksperimentelle fôrer og i feces fra de ulike diettgruppene, samt beregnede fordøyelighets koeffisientene (ADC) for hver av de testede sporstoffene. Verdier er presentert som gjennomsnitt av tanker (n = 2).

	Dy-diett		Nd-diett		Ce-diett		Pr-diett		La-diett	
	¹⁶³ Dy	⁸⁹ Y	¹⁴³ Nd	⁸⁹ Y	¹⁴⁰ Ce	⁸⁹ Y	¹⁴¹ Pr	⁸⁹ Y	¹³⁹ La	⁸⁹ Y
Kons. feces (µg/g)	200.04	226.17	289.71	213.30	261.27	202.32	317.25	237.06	293.55	221.41
Kons. feed (µg/g)	63.41	74.16	91.51	68.51	84.05	67.62	103.92	79.04	87.13	68.45
Ratio feces/fôr	3.15	3.05	3.17	3.11	3.11	2.99	3.05	3.00	3.37	3.23
ADC (%) *		-3.45		-1.68		-3.89		-1.79		-4.16

Merking:

Til tross for negative verdier for fordøyelighet ble det observert signifikant inkorporering av alle de 5 REE som vi benyttet (fig 7-11). Ved sammenligning med bakgrunnsverdiene så vi at innholdet av de enkelte elementene vi tilsatte i fôret økte gradvis gjennom fôringsperioden, og det ble, med unntak av for lantan, funnet signifikant høyere nivåer i skjell selv etter 2 måneders "utvasking". Dette viser at fire av de 5 testede elementene vil kunne brukes som markører med de tilsetningsnivåer til fôret som vi hadde valgt. For lantan var bakgrunnsnivåene spesielt høye, og større mengder hadde vært nødvendig i fôret hvis dette elementet skulle brukes. Spesielt godt egnet var dysprosium hvor 10 ukers fôring med 250 mg/ kg fôr gav et nivå i skjellene som var ca 30:1.

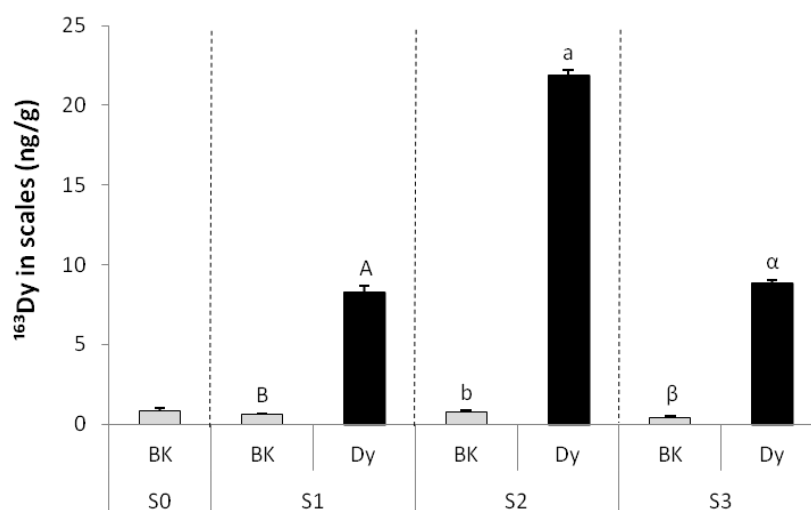


Fig. 7. Konsentrasjon av ^{163}Dy i skjell av Atlantisk laks 1⁺ smolt fôret dysprosium supplert diett (Dy) og ikke dysprosium supplert diett (BK) ved de ulike prøvetakings datoene (S0, S1, S2 og S3). Verdien for S0 er presentert som gjennomsnittet av enkeltfisk i en tank, mens resten av verdiene er presentert som gjennomsnitt av tankene. Variasjonen mellom individer er oppgitt som standardavviket av gjennomsnittet, mens variasjonen mellom tankene er oppgitt som standardfeilen av gjennomsnittet (SD BKS0: n = 10, SEM Dy: n = 2, SEM BKS1, S2, S3: n = 8). Signifikante forskjeller mellom behandlede og ubehandlede grupper innenfor hver prøvetakingsperiode er indikert med forskjellige bokstaver over søylene.

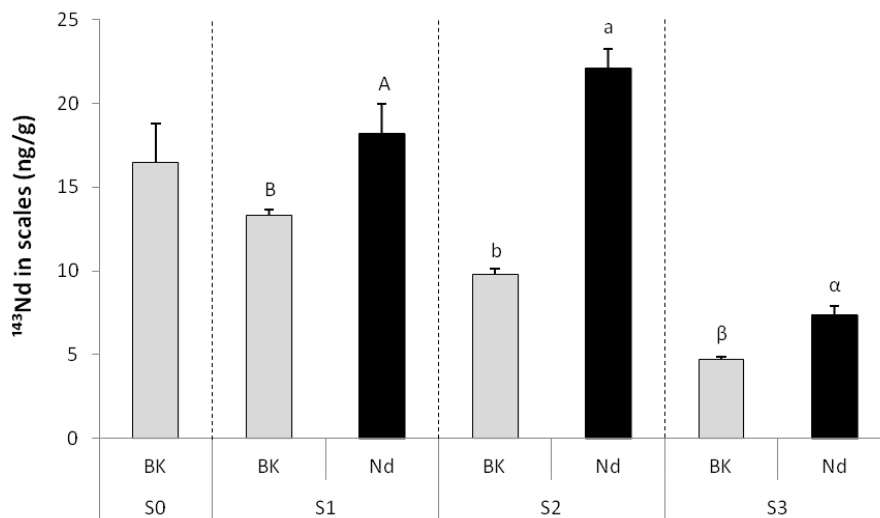


Fig. 8. Konsentrasjon av ^{143}Nd i skjell av Atlantisk laks 1⁺ smolt fôret dysprosium supplert diett (Dy) og ikke dysprosium supplert diett (BK) ved de ulike prøvetakings datoene (S0, S1, S2 og S3). Verdien for S0 er presentert som gjennomsnittet av enkeltfisk i en tank, mens resten av verdiene er presentert som gjennomsnitt av tankene. Variasjonen mellom individer er oppgitt som standardavviket av gjennomsnittet, mens variasjonen mellom tankene er oppgitt som standardfeilen av gjennomsnittet (SD BKS0: n = 10, SEM Dy: n = 2, SEM BKS1, S2, S3: n = 8). Signifikante forskjeller mellom behandlede og ubehandlede grupper innenfor hver prøvetakingsperiode er indikert med forskjellige bokstaver over søylene.

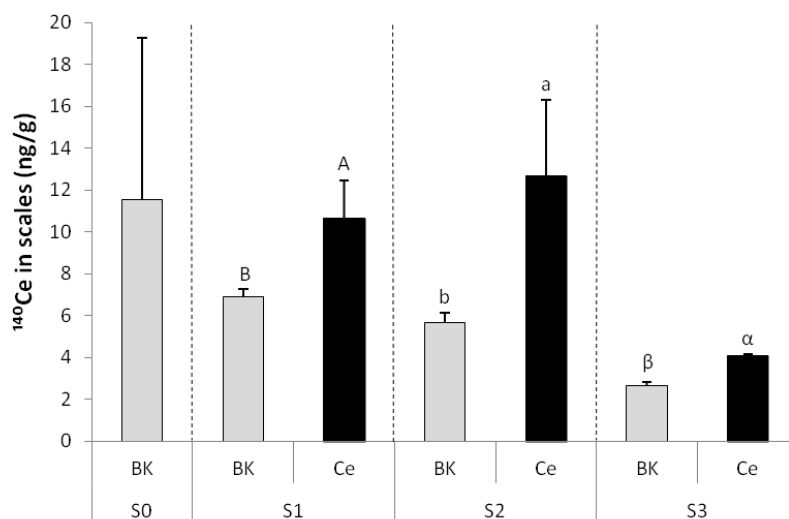


Fig. 9. Konsentrasjon av ^{140}Ce i skjell av Atlantisk laks 1⁺ smolt fôret dysprosium supplert diett (Dy) og ikke dysprosium supplert diett (BK) ved de ulike prøvetakings datoene (S0, S1, S2 og S3). Verdien for S0 er

presentert som gjennomsnittet av enkeltfisk i en tank, mens resten av verdiene er presentert som gjennomsnitt av tankene. Variasjonen mellom individer er oppgitt som standardavviket av gjennomsnittet, mens variasjonen mellom tankene er oppgitt som standardfeilen av gjennomsnittet (SD BKS0: n = 10, SEM Dy: n = 2, SEM BKS1, S2, S3: n = 8). Signifikante forskjeller mellom behandlede og ubehandlede grupper innenfor hver prøvetaksperiode er indikert med forskjellige bokstaver over søylene.

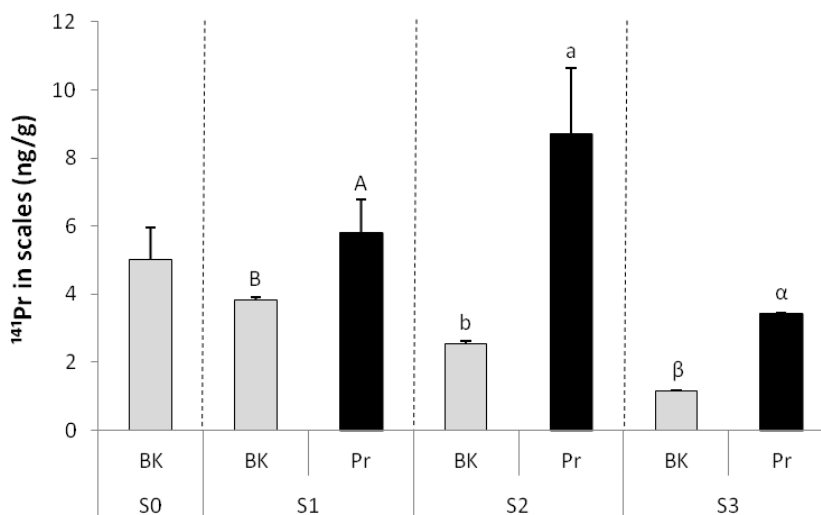


Fig. 10. Konsentrasjon ^{141}Pr i skjell av Atlantisk laks 1⁺ smolt føret dysprosium supplert diett (Dy) og ikke dysprosium supplert diett (BK) ved de ulike prøvetakings datoene (S0, S1, S2 og S3). Verdien for S0 er presentert som gjennomsnittet av enkeltfisk i en tank, mens resten av verdiene er presentert som gjennomsnitt av tankene. Variasjonen mellom individer er oppgitt som standardavviket av gjennomsnittet, mens variasjonen mellom tankene er oppgitt som standardfeilen av gjennomsnittet (SD BKS0: n = 10, SEM Dy: n = 2, SEM BKS1, S2, S3: n = 8). Signifikante forskjeller mellom behandlede og ubehandlede grupper innenfor hver prøvetaksperiode er indikert med forskjellige bokstaver over søylene.

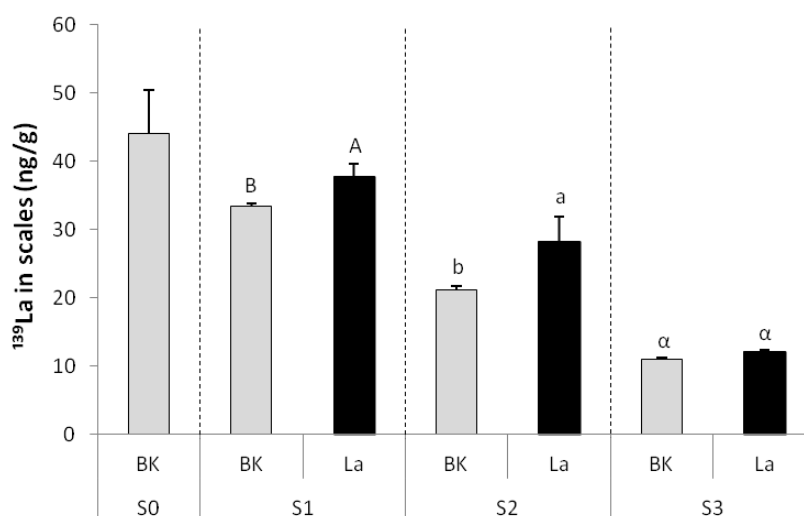


Fig. 11. Konsentrasjon av ^{139}La i skjell av Atlantisk laks 1⁺ smolt føret dysprosium supplert diett (Dy) og ikke dysprosium supplert diett (BK) ved de ulike prøvetakings datoene (S0, S1, S2 og S3). Verdien for S0 er presentert som gjennomsnittet av enkeltfisk i en tank, mens resten av verdiene er presentert som

gjennomsnitt av tankene. Variasjonen mellom individer er oppgitt som standardavviket av gjennomsnittet, mens variasjonen mellom tankene er oppgitt som standardfeilen av gjennomsnittet (SD BKS0: n = 10, SEM Dy: n = 2, SEM BKS1, S2, S3: n = 8). Signifikante forskjeller mellom behandlede og ubehandlede grupper innenfor hver prøvetakingsperiode er indikert med forskjellige bokstaver over søylene.

Noe uventet oppdaget vi i dette arbeidet at også bakgrunns-verdiene sank i løpet av sjøperioden. Dette vises også tydelig i figurene.

At nivået av disse elementene var høyest i nulluttaket tyder på at elementene har blitt tatt opp og bygget inn i skjellene i ferskvannsperioden, og at nivåene i fisk som ikke får disse elementene tilsatt i fôret derfor vil “fortynnes” etter utsett i sjø etterhvert som fisken vokser. Dette er illustrert for lantan i figur 12.

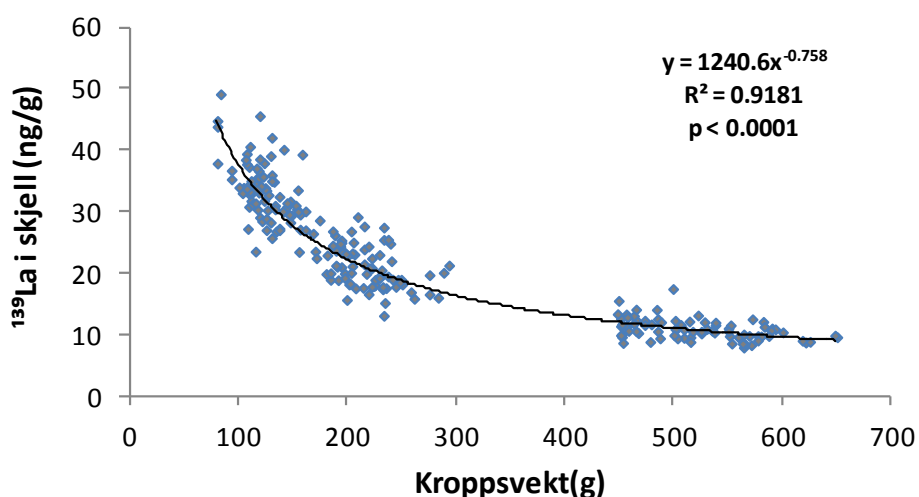


Fig. 12. Forholdet mellom ¹³⁹La konsentrasjon i skjell på ubehandlet fisk (bakgrunnsnivå) og fisken kroppsvekt.

Bakgrunns-verdier for de andre elementene:

Disse interessante funnene fikk oss til også å se på bagrunns-verdiene til flere av de sjeldne jordelementene og ikke bare de vi hadde benyttet i fôret. For en rekke av disse elementene fant vi det samme mønsteret (nedgang i løpet av forsøksperioden), som illustrert for samarium i figur 13.

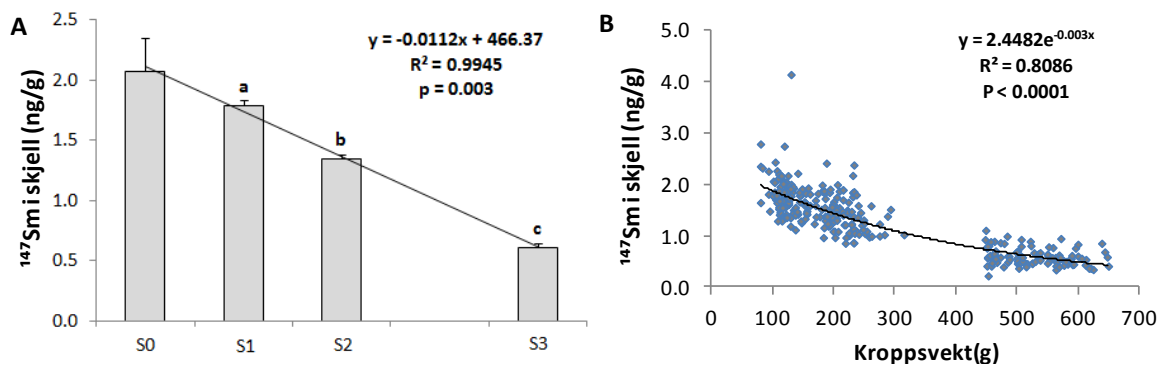


Fig. 13. Konsentrasjonen av ^{147}Sm i fiskeskjell ved de forskjellige uttaksdatoene (A) og sammenhengen mellom konsentrasjonen av ^{147}Sm og kroppsvekt (B). Verdiene for S0 er oppgitt som gjennomsnittet av individuell fisk innen en tank, mens resten av verdiene (S1-S3) er oppgitt som gjennomsnittet av tankene. Variasjonen mellom individuell fisk er oppgitt i standard avvik (S.D S0: $n = 10$), mens variasjonen mellom tankene er oppgitt som standardfeil (S.E S1, S2 og S3: $n = 3$). Forskjellige bokstaver over søylene indikerer signifikante forskjeller mellom uttaksdatoene/periodene.

Men noen elementer viste en helt annen utvikling. Dette gjaldt strontium, uran og scandium. Som vist i figur 14 for strontium økte bakgrunnsverdien for disse tre elementene etter utsett i sjø.

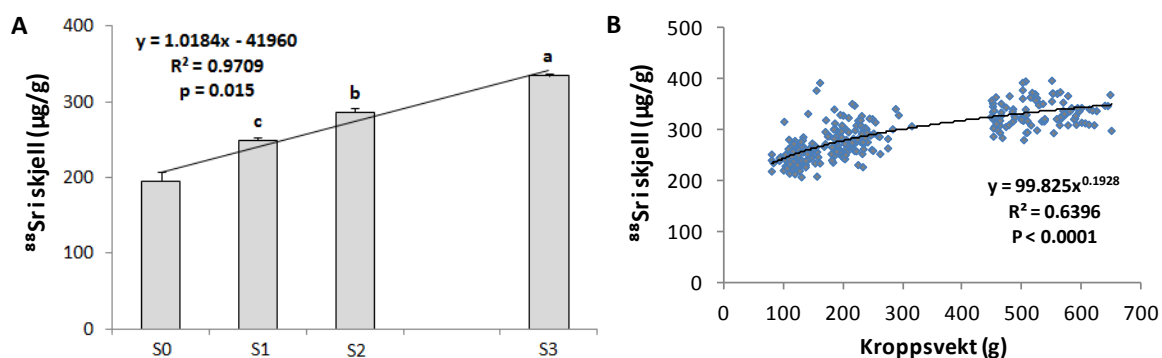


Fig. 14. Konsentrasjonen av ^{88}Sr i fiskeskjell ved de forskjellige uttaksdatoene (A) og sammenhengen mellom konsentrasjonen av ^{88}Sr og kroppsvekt (B). Verdiene for S0 er oppgitt som gjennomsnittet av individuell fisk innen en tank, mens resten av verdiene (S1-S3) er oppgitt som gjennomsnittet av tankene. Variasjonen mellom individuell fisk er oppgitt i standard avvik (S.D S0: $n = 10$), mens variasjonen mellom tankene er oppgitt som standardfeil (S.E S1, S2 og S3: $n = 3$). Forskjellige bokstaver over søylene indikerer signifikante forskjeller mellom uttaksdatoene/periodene.

5.3. Merkestudium på 0-årig smolt i sjøvann med forskjellige nivåer og blandinger av elementer i fôret, og ved kaldere temperaturer.

Fordi det er viktig å kunne ha en rekke forskjellige merke-alternativer var det også i dette prosjektet interessant å teste ut blandinger av REE. I tillegg ville vi også forsikre oss om at en 0-årig smolt oppførte seg på samme måte som ettåringen.

I et nytt foringsforsøk brukte vi derfor 0-åring ved noe lavere vanntemperatur, og med fire forskjellige fôr:

MT-1: 125 mg Dy

MT-2: 125 mg Pr

MT-3: 125 mg Dy + 125 mg Pr

MT-4: 250 mg Dy

Som før brukte vi to kar pr. fôr, og femti fisk i hvert kar.

Tilvekst og dødelighet:

Tilveksten (TGC) i merkeperioden var som hos 1+ smolten relativ god og det ble heller ikke i dette forsøket funnet noen overordnet signifikant effekt mellom fôrgruppene (Tabell 7). De ulike fôringsgruppene viste derfor relativ stor homogenitet mht vektutvikling der alle hadde en avslutningsvekt på litt over 500 gram (Figur 15). Dødeligheten i forsøksperioden var tilnærmet lik null.

Tabell 7. Termisk vekst koeffisient (TGC) for hver av de ulike 0⁺ smolt diettgruppene (gjennomsnitt av tanker \pm SEM, n = 2) i løpet av de to merkingsperiodene og den totale vektete TGC for hele merkingsperioden.

Periode	TGC				P-verdi	R ²
	MT-1	MT-2	MT-3	MT-4		
P1 Merking periode	2.39 ^a \pm 0.11	2.04 ^{ab} \pm 0.16	1.97 ^b \pm 0.04	2.34 ^{ab} \pm 0.02	0.10	0.76
P2 Merking periode	2.91 \pm 0.36	3.40 \pm 0.12	3.26 \pm 0.01	3.05 \pm 0.40	0.64	0.32
Total merking periode	2.74 \pm 0.21	3.01 \pm 0.12	2.88 \pm 0.00	2.82 \pm 0.29	0.79	0.2

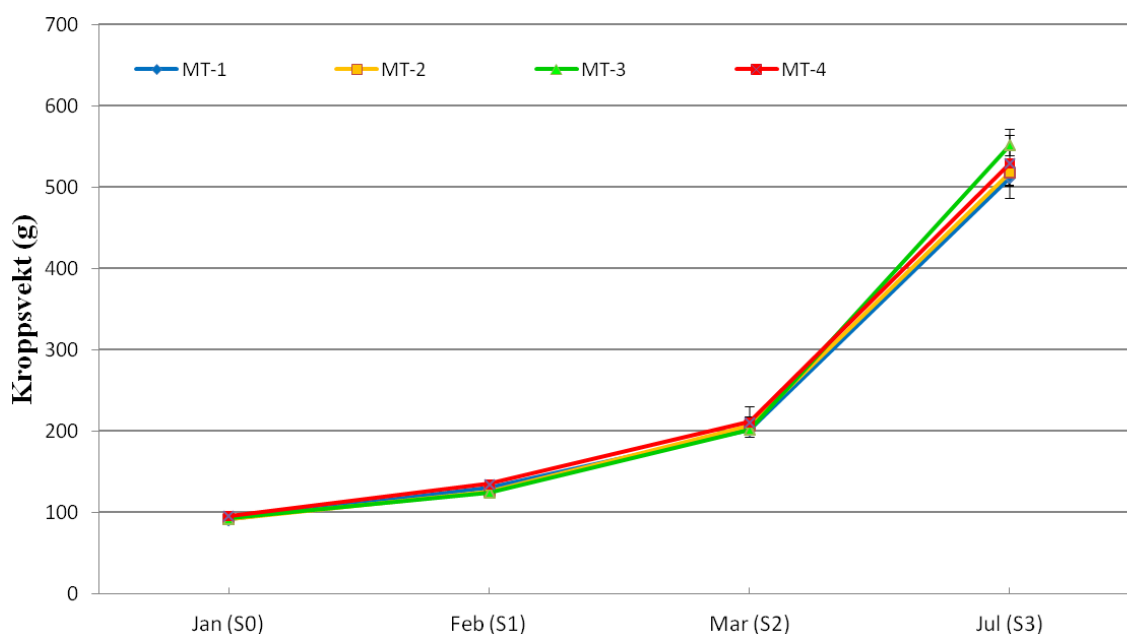
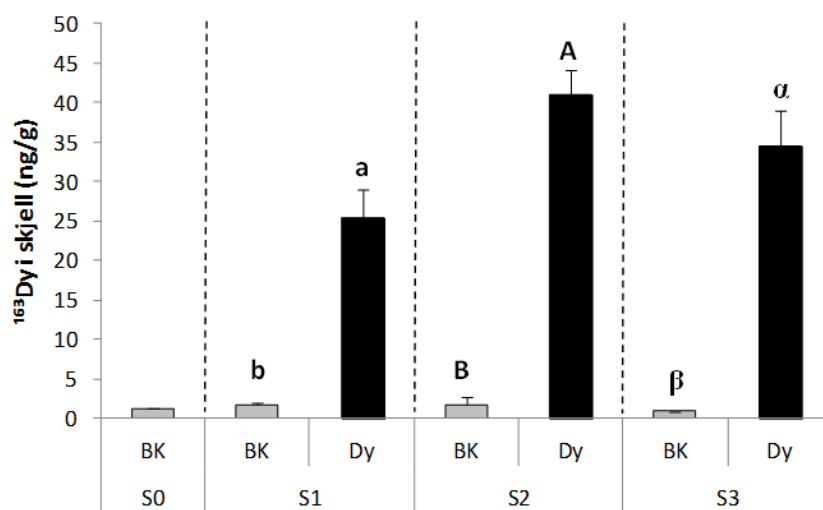


Fig.15. Utvikling i kroppsvekt for Atlantisk laks 0⁺ smolt fôret fire forskjellige REE-supplert dietter (MT-1, MT-2, MT-3 og MT-4) i løpet av forsøksperioden.

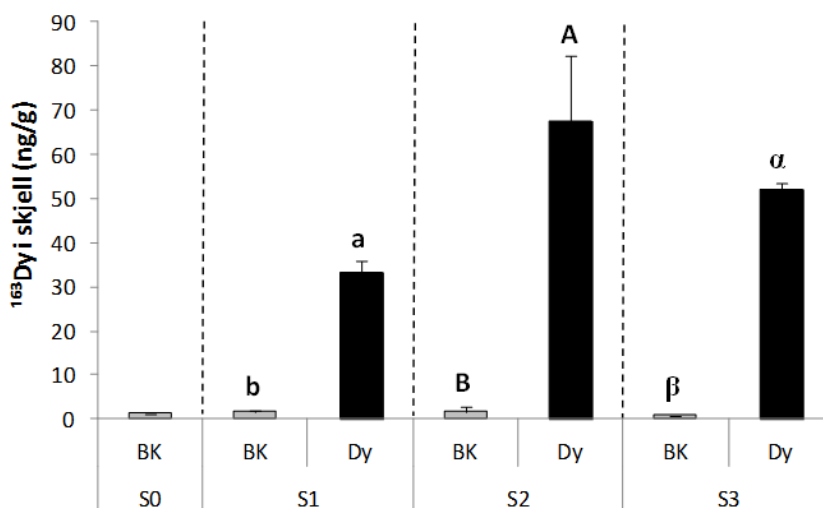
Merking:

Vi fant i dette fôringsforsøket med 0⁺-smolt at både Dy og Pr ble innkorporert i skjell tilsvarende det vi tidligere har funnet for 1-smolt. Ved bruk av 125 mg Dy var det en reduksjon i innkorporeringen sammenlignet med 250 mg/kg, men kun til ca 60%, og nivået etter 4 måneder «utvasking» var fremdeles signifikant forskjellig fra bakgrunnsverdiene (figur 16 a,b og c).

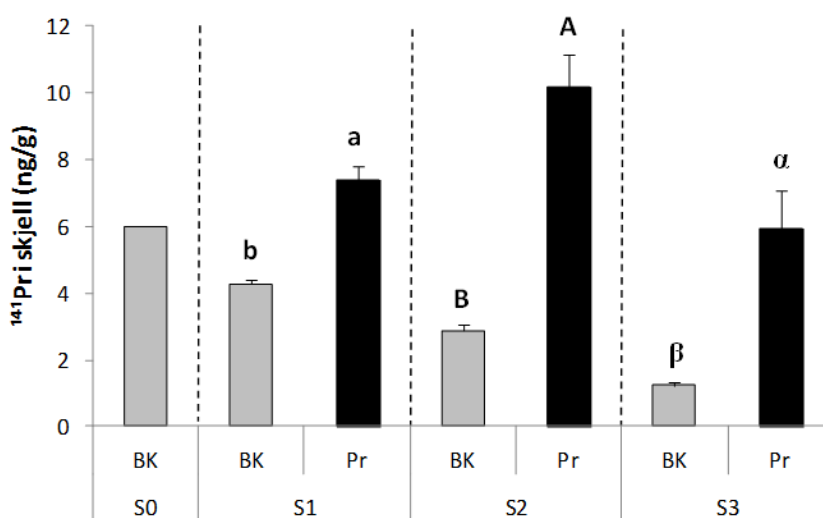
a)



b)



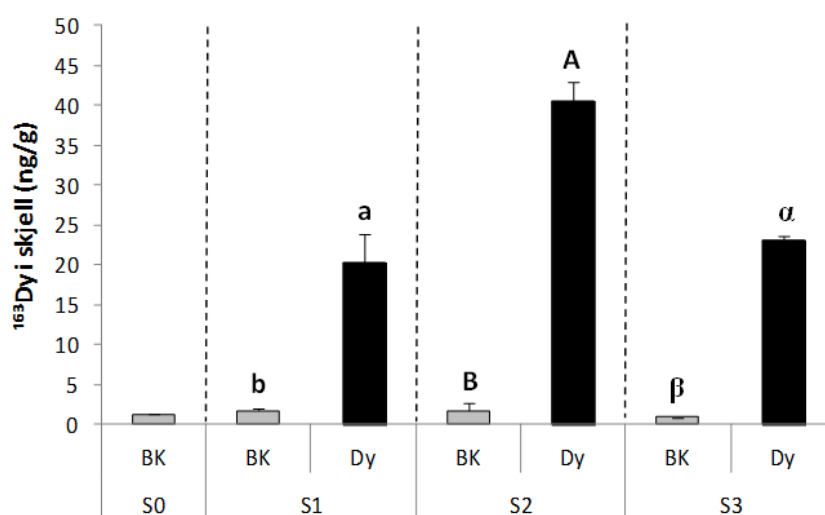
c)



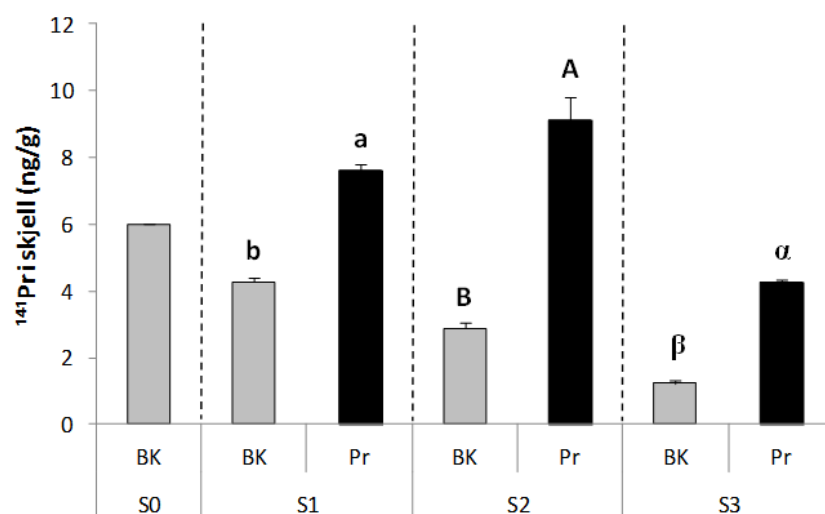
Figur 16: Inkorporering og påfølgende «utvanning» av Dy og Pr i skjell fra 0-årig smolt. a) 125 mg Dy/kg, b) 250 mg Dy/kg, c) 125 mg Pr/kg. Verdien for S0 er presentert som gjennomsnittet av enkeltfisk i en tank, mens resten av verdiene er presentert som gjennomsnitt av tankene. Variasjonen mellom individer er oppgitt som standardavviket av gjennomsnittet, mens variasjonen mellom tankene er oppgitt som standardfeilen av gjennomsnittet (SD BKS0: n = 10, SEM Dy: n = 2, SEM BKS1, S2, S3: n = 2). Signifikante forskjeller mellom behandlede og ubehandlede grupper innenfor hver prøvetakingsperiode er indikert med forskjellige bokstaver over søylene.

Ved blanding av 125 mg av hvert element i samme fôr fant vi ingen forskjell i inkorporering i forhold til bruk av kun ett av elementene, men «utvaskingen» etter fire måneder viste tendenser til å være noe større, særlig for Dy, men fremdeles var verdiene signifikant høyere enn bakgrunnsverdiene (figur 17 a og b).

a)



b)



Figur 17. Inkorporering og påfølgende «utvasking» av Dy (a) og Pr (b) når gitt i samme fôr, 125 mg/kg av hvert element for 0+ smolt. Verdien for S0 er presentert som gjennomsnittet av enkeltfisk i en tank, mens resten av verdiene er presentert som gjennomsnitt av tankene. Variasjonen mellom individer er oppgitt som standardavviket av gjennomsnittet, mens variasjonen mellom tankene er oppgitt som standardfeilen av gjennomsnittet (SD BKS0: n = 10, SEM Dy: n = 2, SEM BKS1, S2, S3: n = 2). Signifikante forskjeller mellom behandlede og ubehandlede grupper innenfor hver prøvetakingsperiode er indikert med forskjellige bokstaver over søylene.

Bakgrunnsnivåer:

Som vi så for ettårig smolt, falt også bakgrunnsverdiene for 0-åringen signifikant etter utsett i sjø for de fleste elementene. Dette er vist for Nd i figur 18 a og b.

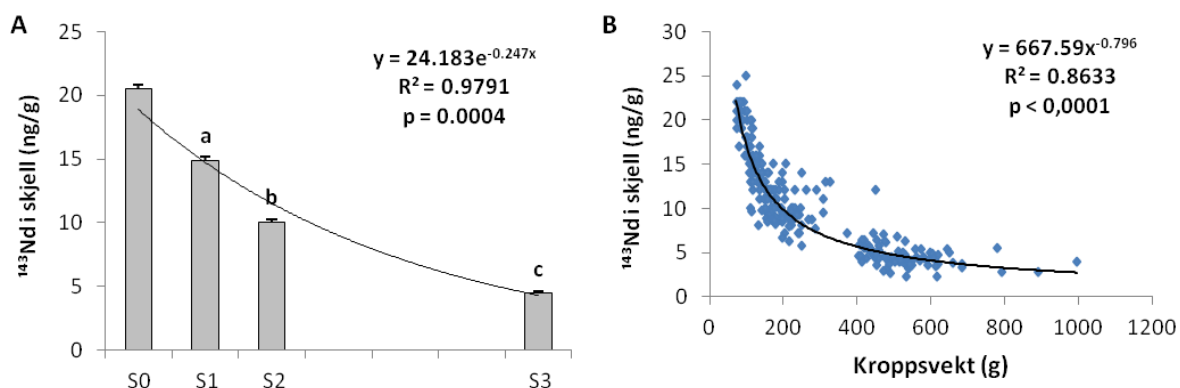
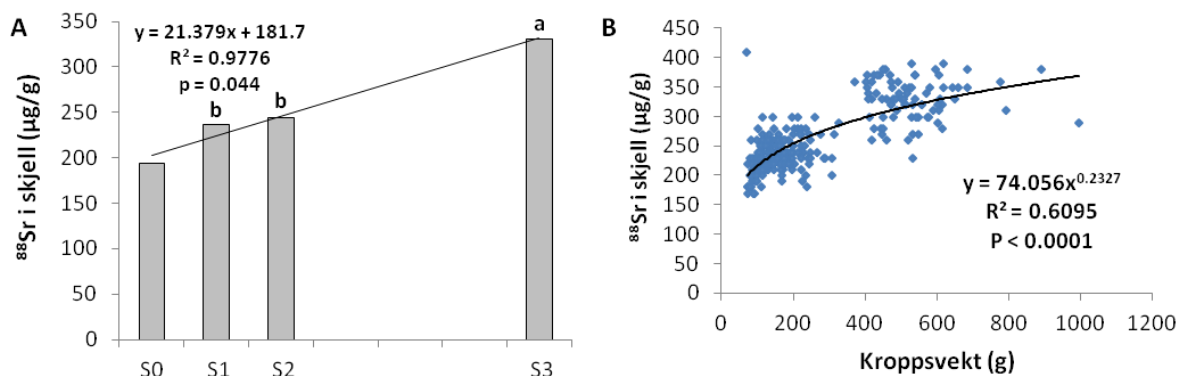


Fig. 18. Forholdet mellom ^{143}Nd konsentrasjon i skjell på ubehandlet fisk (bakgrunnsnivå) og tid (A) eller fiskens kroppsvekt (B). Verdiene for S0 er oppgitt som gjennomsnittet av individuell fisk innen en tank, mens resten av verdiene (S1-S3) er oppgitt som gjennomsnittet av tankene. Variasjonen mellom individuell fisk er oppgitt i standard avvik (S.D S0: n = 10), mens variasjonen mellom tankene er oppgitt som standardfeil (S.E S1, S2 og S3: n = 3). Forskjellige bokstaver over søylene indikerer signifikante forskjeller mellom uttaksdatoene/periodene.

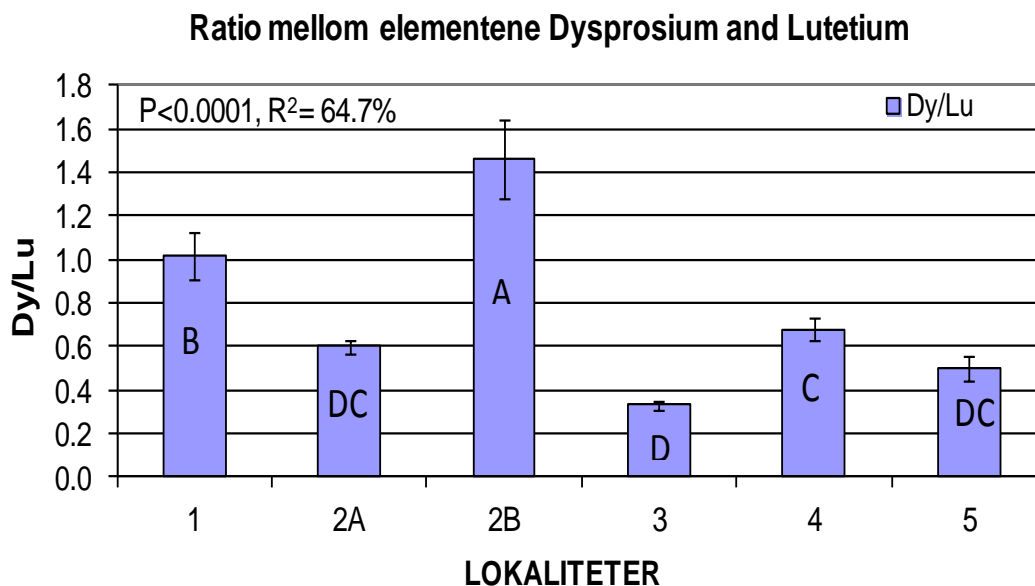
Men igjen, som demonstrert her for Sr, økte nivåene av Sr, U og Sc (figur 19 a og b).



Figur 19: Konsentrasjonen av ^{88}Sr i fiskeskjell ved de forskjellige uttaksdatoene (A) og sammenhengen mellom konsentrasjonen av ^{88}Sr og kroppsvekt (B). Verdiene for S0 er oppgitt som gjennomsnittet av individuell fisk innen en tank, mens resten av verdiene (S1-S3) er oppgitt som gjennomsnittet av tankene. Variasjonen mellom individuell fisk er oppgitt i standard avvik (S.D S0: n = 10), mens variasjonen mellom tankene er oppgitt som standardfeil (S.E S1, S2 og S3: n = 3). Forskjellige bokstaver over søylene indikerer signifikante forskjeller mellom uttaksdatoene/periodene.

5.4. Test av bakgrunnsnivåer mht identifisering av laks fra ulike kommersielle anlegg.

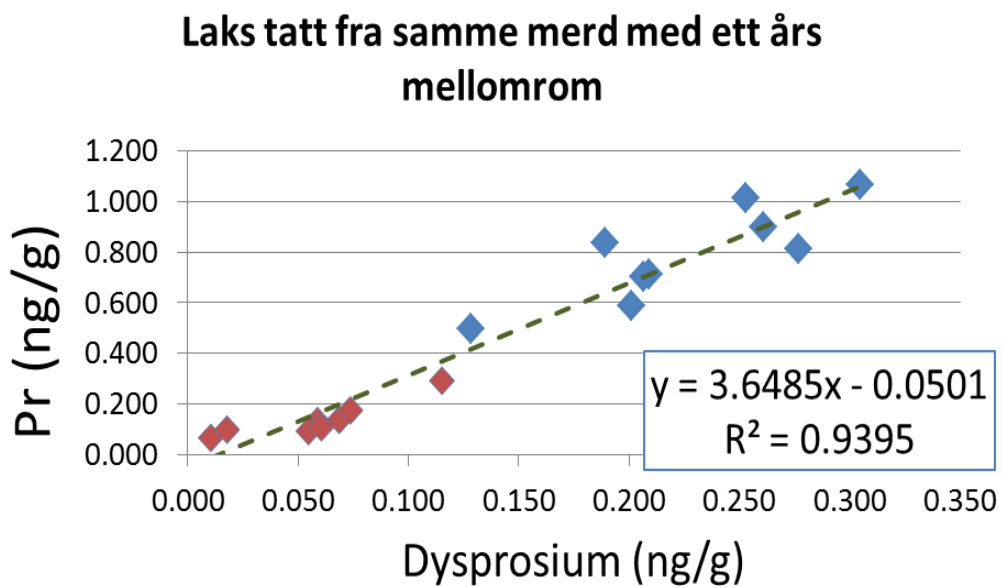
Ut i fra de analyserte nivåene av jordelementer fra smolt hos ulike oppdrettere i Norge (se seksjon 5.1) ble det observert store variasjoner mellom fisk innen merd. Dette var betenkelig, men ved å benytte forholdet mellom elementene oppdaget vi en høy grad av stabilitet. Ved å benytte slike forholdtall (ratioer) fra de ulike kommersielle anleggene vi hadde fått tilsendt skjellprøver fra, avslørte vi en spennende stabilitet hos fisk **innen** anlegg, og signifikante forskjeller **mellom** flere av anleggene. Vi viste således at det er mulig å detektere forskjeller **uten å benytte merke-fôr, men kun å studere miljørelaterte bakgrunnsverdier**, og ut i fra dette dokumentere statistisk sikre forskjeller mellom laks i ulike kommersielle anlegg. Dette er eksemplifisert med forholdet Dy/Lu i figur 20 der lokaliteter med ulike bokstaver er signifikant forskjellig. **Ved kun å benytte miljøbetingede bakgrunnsverdier på 10 laks pr lokalitet dokumenterte vi således sikre forskjeller både mellom geografisk fjerne anlegg (lokalitet 1 vs 5) og mellom geografisk nære anlegg (lokalitet 2A vs 2B).** Ut i fra de store variasjonen i bakgrunnsverdier i jordelementer i skjell analysert.



Figur 20. Forhold mellom elementene Dy og Lu i skjell smolt fra de forskjellige anleggene.

Resultatene vist i figur 20 var imidlertid et «øyeblikks-bilde» siden dette var skjell fra smolt tatt ut en gang fra hvert anlegg. Men vi var så heldige at på en av lokalitetene hadde de den samme fisken fremdeles gående i det samme anlegget ett år senere. Vi fikk da tilsendt skjell også fra denne fisken, og som vist i figur 21 var nivåene av begge elementene lavere (røde punkter), men forholdet mellom dem er det samme.

Dette mener vi tyder på at forholdene mellom de sjeldne jordelementene som vi finner hos de forskjellige oppdrettsanleggene holder seg relativt konstant. **Siden vi analyserer for totalt 19 elementer i en og samme analyse, betyr dette at vi kan studere flere hundre forskjellige forhold (ratioer), og dermed finne et «fingerprint» som er spesifikt for de enkelte anleggene.**



Figur 21. Forhold mellom Pr og Dy i skjell fra laks tatt ut fra samme merd med ett års mellomrom. Blå merker: 0-års smolt like etter utsett i sjø, røde merker: den samme fisken fra samme merd ett år etter.

6. DISKUSJON

6.1. Bakgrunnsnivåer

Så vidt vi vet har det ikke tidligere blitt analysert på mengder av sjeldne jordelementer i skjell fra oppdrettslaks. Derfor var det nødvendig med en form for bakgrunnsundersøkelse før vi startet med de planlagte fôrings-eksperimentene.

Nivåene av de enkelte elementene viste seg å være svært forskjellig, fra 0,03 ng/g skjell for Tm til 3,90 ng/g skjell for Lantan. Scandium og Yttrium blir også ofte medregnet i begrepet sjeldne jordelementer, men for disse er nivåene enda en tierpotens høyere. Noen andre elementer (As, Sr og Uran) ble også inkludert i analysene. Disse forekommer i større mengder enn de sjeldne jordelementene.

Kanskje noe uventet fant vi en ganske stor variasjon i bakgrunnsnivåene i laksesmolt fra de forskjellige oppdrettsanleggene. Dette så ut til å kunne skape problemer, men de spesifikke og konstante forholdene (ratioene) som vi så oppdaget, gjør denne variasjonen i absoluttmengder egentlig bare mer interessant.

Ved kun å benytte miljøbetingede bakgrunnsverdier på 10 laks pr lokalitet ble de demonstrert sikre forskjeller både mellom geografisk fjerne og nære anlegg, men stabile forholdstall innen lokalitet over en tidsperiode på ett år. Siden vi kan analysere for totalt 19 elementer i en og samme analyse, betyr dette at vi kan studere flere hundre forskjellige forhold (ratioer), og dermed trolig finne et «fingerprint» som er spesifikt for de enkelte anlegg.

6.2 Fôringsstudier

Gjennom dette prosjektet har vi vist at både ettårig og nullårig smolt fra Atlantisk laks kan merkes ved tilsetning av små mengder dysprosium (Dy), neodym (Ne), praseodym (Pr), cerium (Ce) and lantan (La) i fôr. REE-ene ble detektert i skjell, noe som stemmer med disse elementenes “bein-søkende” egenskaper. Inkorporeringen økte, med unntak for La, i løpet av fôringsperioden (Fig. 7 - 11). For La var bakgrunnsnivåene så høye at inkorporeringen fra den tilsatte mengden i fôret (250 mg/kg) ikke fullt ut kunne erstatte den fortyningen som veksten av skjellet medførte. Dette betyr at det ved en eventuell bruk av et element med forholdsvis høye bakgrunnsverdier bør tilsettes noe høyere nivåer i fôret.

For Dy testet vi også forskjellig mengde tilsatt i fôret, og fant at økningen fra 125 mg/kg til 250 mg/kg kun var på ca 65%. Selv ved bruk av 125mg/kg var forskjellen til bakgrunnsnivået høyst signifikant. For elementer med lave bakgrunsnivåer betyr dette at enda mindre mengder antakelig vil kunne brukes. Positivt var det også å se at en blanding av to elementer ikke så ut til å påvirke inkorporeringen av hverandre. Dette betyr at en også kan bruke blandinger av forskjellige elementer i fremtidige merke-fôr, noe som i sterk grad vil kunne øke alternativene.

Konsentrasjonen av de enkelte elementene vi testet sank signifikant i løpet av «utvaskingsperiodene». Denne effekten skyldes i hovedsak at skjellene vokser ettersom fisken blir større. I dette prosjektet hadde vi ikke økonomisk mulighet til å følge de merkede fiskene ut over de 2 til 4 månedene som ble benyttet, men for de flest merkede fiskene var forskjellen mellom bakgrunn og merke fremdeles signifikant. Det bør selvfølgelig testes, men våre data tyder likevel på at merkingen vil kunne detekteres i ganske lang tid i sjøen. Ved tvil kan en kun analysere den delen av skjellene som vokste den tiden da merkingen ble gjennomført, for i det området vil konsentrasjonen av merke-elementet høyst sannsynlig være tilnærmet det samme som ved slutten av merkeperioden.

Interessant var det å oppdage at nivået av disse 5 REE-ene i skjell fra ubehandlet fisk ikke holdt seg konstant gjennom fôringsperioden, men derimot avtok gradvis. I tidligere arbeider der man brukte ICP-MS (Ennevor 1991; Ennevor 1994), hadde ubehandlet fisk ikke-detekterbare mengder av elementene i skjell slik at da var man ikke i stand til å studere bakgrunns-verdiene. Dette var relativt gamle studier, og nyere utvikling i ICP-MS har gitt mye bedre deteksjonsgrenser. Nedgangen i bakgrunsnivåene kan forklares med fisk og skjellvekst siden en negativ korrelasjon ble funnet mellom konsentrasjon i skjell og fiskevekt. Men dette forutsetter at opptaket av disse elementene må ha foregått før utsett i sjø. Siden element-konsentrasjonen i skjellene synker ettersom fisken vokser, så er det sannsynlig at bakgrunns-verdiene fortsatt vil være lavere enn i de behandlede fiskene også etter lang tid i sjø, noe som trolig tillater identifisering av de merkede fiskene opp mot slaktestørrelse, selv om dette ennå ikke har blitt testet.

Det er viktig når man vurderer kjemisk merking av fisk at det er mulig å innføre slike merker uten at det går ut over tilvekst eller helse. Vi fulgte vekt-økningen gjennom hele forsøkene, og så ingen signifikante forskjeller i vekt eller TGC, og verdiene var som forventet under de forhold som ble benyttet i disse eksperimentene. Det er derfor lite trolig at de element-nivåene

som ble brukt har noen negativ betydning for laksen. For rotter, kylling og gris har det faktisk blitt vist en positiv effekt på vekst, men ennå ikke for fisk (Renard 2005; Tautenhahn 2004). I tillegg fant vi tilnærmet ingen dødelighet blant fisken, noe som også indikerer at de konsentrasjoner av REE-klorider som vi brukte (250 mg/kg fôr) ikke var toksisk for laksen. Dette stemmer godt med at LD₅₀ for sjeldne jord-elementer har blitt rapportert å tilsvare det man finner for vanlig bordsalt (NaCl) (Wald 1990). Hos mennesker har lang tids studier vist at et inntak av 3 g lantan pr dag i opp til 4 år ble godt tolerert og gav ingen ubehag eller toksiske verdier (Harrison & Scott 2004; Hutchison et al. 2004).

De interessante, og allerede diskuterte, oppdagelsene at bakgrunnsnivåene av de elementene vi brukte i forsøkene sank ettersom fisken (og skjellene) vokste gjorde oss nysgjerrig på å studere nærmere det kjemiske «finger-printet» til skjellene. Siden ICP-MS analysen samtidig ga oss kvantifisering av 14 flere elementer så vi også på disse. Dette ble illustrert for noen i resultatkapitlet. Bakgrunnsnivået for flere av disse elementene, så som Ho, Gd, Sm og As viste den samme nedgangen som vi tidligere så for test-elementene, men for noen andre elementer (Sr, U and Sc) fant vi en totalt motsatt tendens. Dette tyder på at for disse elementene skjer det en inkorporering i sjøvann! Dette kan stemme med at det for strontium for eksempel har blitt rapportert å være 200 – 400 ganger høyere konsentrasjon i sjøvann enn i ferskvann (Guillou & de la Noüe 1987). Det motsatte vil vi antakelig finne for de andre elementene, inklusive de som vi brukte til merking. Disse observasjonene er svært interessante ettersom de indikerer at laksesmolten kan få en dobbel kjemisk «fingerprint» gjennom sin livssyklus, og at denne signaturen muligens kan brukes som et naturlig merke for identifisering av oppdrettsfisk fra spesifikke anlegg!

7. KONKLUSJON

Vi har som planlagt i dette prosjektet testet ut bruk av sjeldne jordelementer i fôr til merking av smolt like etter utsett i sjø. Vi mener at resultatene er lovende. Særlig interessant var det å se at det signifikant høyere forholdet mellom merke-element og bakgrunn holdt seg tilnærmet likt gjennom «utvaskings»-periodene siden begge sank tilsvarende. Dette tyder på at en signifikant forskjell oppnådd gjennom merkeperioden vil kunne vedvare i lang tid etter merking.

Den oppdagelsen som ble gjort i dette prosjektet: at spesielle «fingerprint» ser ut til å eksistere i forholdene (ratioene) mellom de miljørelaterte bakgrunns-elementene er spesielt interessant, og dette kan trolig alene i mange tilfeller identifisere bakgrunnen til en rømt laks. Men dette krever selvfølgelig mer utfyllende studier for å dokumentere våre foreløpige funn om signifikante forskjeller mellom lokaliteter, men stabile forhold innen lokalitet over tid.

8. REFERANSER

Austreng, E. (1978). Digestibility determination in fish using chromic oxide marking and analysis of contents from different segments of gastrointestinal-tract. *Aquaculture*, 13 (3): 265-272.

Austreng, E., Storebakken, T., Thomassen, M. S., Refstie, S. & Thomassen, Y. (2000). Evaluation of selected trivalent metal oxides as inert markers used to estimate apparent digestibility in salmonids. *Aquaculture*, 188 (1-2): 65-78.

Cho, C. Y. (1992). Feeding systems for rainbow trout and other salmonids with reference to current estimates of energy and protein requirements. *Aquaculture*, 100 (1-3): 107-123.

Ennevor, B. C. (1991). *The Feasibility of Using Lanthanide Elements to Mass Mark Hatchery-production Salmon*. Master thesis. Vancouver: University of British Columbia, Department of Animal Sciences. 182 p.

Ennevor, B. C. & Beames, R. M. (1993). Use of Lanthanide Elements to Mass Mark Juvenile Salmonids. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50: 1039-1044.

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

Giles, M. A. & 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. *Transactions of the American Fisheries Society*, 122 (2): 289-297.

Goonan, T. G. (2011). Rare Earth Elements—End Use and Recyclability. *U.S. Geological Survey Scientific Investigations Report*, 2011–5094. 15 p.

Guillou, A. & de la Noüe, J. (1987). Use of Strontium as a Nutritional Marker for Farm-Reared Brook Trout. *The Progressive Fish-culturist*, 49 (1): 34-39.

Harrison, S. T. & Scott, L. J. (2004). Lanthanum Carbonate. *Drugs*, 64: 985-996.

Humphries, M. (2012). Rare earth elements: The global supply chain. *CRS Report for Congress*, 41347. 27 p.

Hutchison, A. J., Speake, M. & Al-Baaj, F. (2004). Reducing high phosphate levels in patients with chronic renal failure undergoing dialysis: a 4-week, dose-finding, open-label study with lanthanum carbonate. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 19: 1902-1906.

Kato, M. (1985). Recent information on europium marking techniques for chum salmon. In vol. 27 NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration) Technical Report NMFS (National Marine Fisheries Service), pp. 67-73.

Michibata, H. (1981). Labeling fish with an activable element through their diet. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 38: 1281-1282.

Renard, B. (2005). *Seltene Erden als Leistungsförderer in der Fischzucht - Untersuchungen an Regenbogenforellen und Karpfen*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Rørvik, K. A., Ytrestøyl, T., Lundberg, E., Jakobsen, F. A., Jakobsen, A. A. & Bjerkeng, B. (2010). How Apparent Digestibility of Carotenoids, Macronutrients, and Minerals are Differently Affected by Ration Level in Atlantic Salmon, *Salmo Salar*. *Journal of Applied Aquaculture*, 22 (2): 123-139.

Tautenhahn, J. (2004). *Effect of different concentrations of Rare Earth Elements on growth of juvenile Oreochromis niloticus*. Bachelor's thesis. Scotland: University of Stirling, Institute of Aquaculture.

Wald, P. H. (1990). A review of the literature on the toxicity of rare-earth metals as it pertains to the engineering demonstration system surrogate testing. *Lawrence Livermore National Laboratory*, UCID-21823-Rev.1. 32 p.

Zak, M. A. (1984). *Mass-marking American shad and Atlantic salmon with the rare earth element, Samarium*. Master's thesis: Pennsylvania State University. 88 p.