

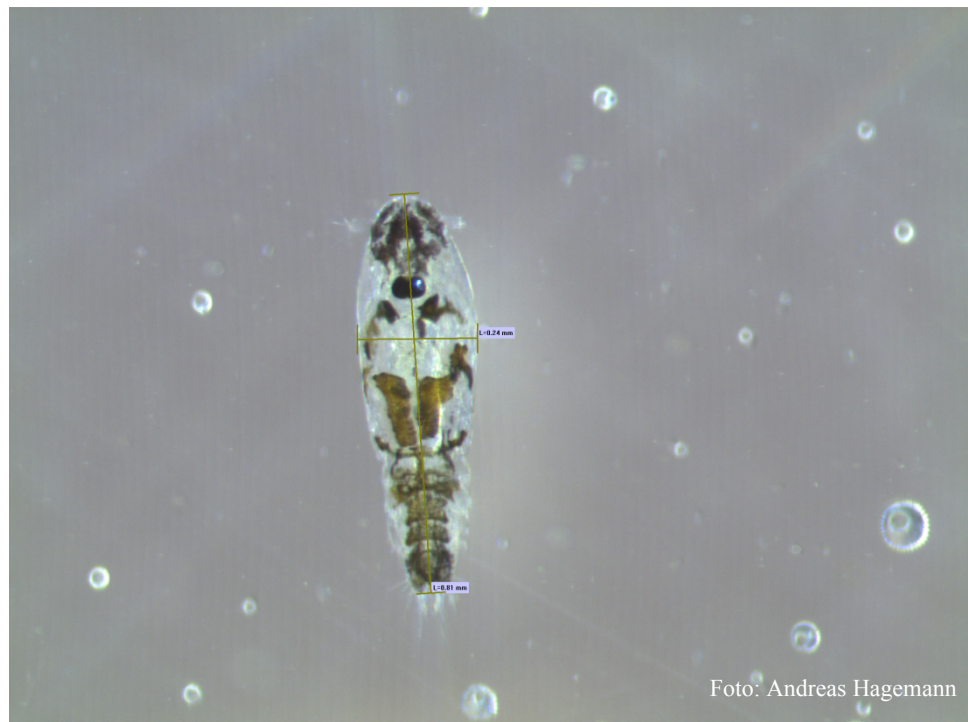
Rapport

Sporing av lakselusens opphav

Villaks eller oppdrettslaks som vertsfisk

Forfattere

Inger Beate Standal
Hans-Christian Teien



Rapport

Sporing av lakselusens opphav

Villaks eller oppdrettslaks som vertsfisk

EMNEORD:Lakselus
Analysemetoder
Fettsyrer
Isotopforhold
Elementer**VERSJON**

3

DATO

2013-01-18

FORFATTER(E)Inger Beate Standal
Hans-Christian Teien**OPPDRAGSGIVER(E)**

Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF)

OPPDRAGSGIVERS REF.

Kjell Maroni

PROSJEKTNR

FHF prosjektnr 900790

ANTALL SIDER OG VEDLEGG:

20+ vedlegg

SAMMENDRAG

I prosjektet er ulike kjemisk-analytiske metoder evaluert og testet ut for analyser av enkeltindivid av lakselus i copepodittstadiet. Prosjektet kan ses på som et første steg i arbeidet med å utvikle metodikk for bestemmelse av opprinnelse av lakseluscopepoditter (dvs om det er villaks eller oppdrettslaks som har vært vertsfisk for morlus).

Metodene som er testet ut er: fettsyresammensetning, isotopforhold ($\delta^{15}\text{N}$ og $\delta^{13}\text{C}$) og elementsammensetning. I tillegg er det gjort en evaluering av om innhold av antioksidanter og isomere av astaxanthin kan være mulige sporingsmarkører for lakselusens opphav. I prosjektet inngår også en innsamling av prøvemateriale for evt. videreføring av prosjektet. Dette går ut på å kartlegge innhold av utvalgte forbindelser i copepoditter fra flere opprinnelser (vill og oppdrettsfisk).

Resultatene viser at for noen av metodene (f.eks $\delta^{13}\text{C}$) er det mulig med analyser av enkeltindivider, mens det for andre metoder (f.eks fettsyresammensetning) er behov for ytterligere metodeutvikling for å komme så lavt ned i prøvemateriale. For flere av analyttene sees det forskjeller hos copepoditter i forhold til om morlus satt på vill eller oppdrettsfisk. Se sammendrag i rapporten for en oppsummering av resultater for de ulike analysemetodene undersøkt.

UTARBEIDET AV

Inger Beate Standal

SIGNATUR**KONTROLLERT AV**

Ulf Erikson

SIGNATUR**GODKJENT AV**

Marit Aursand

SIGNATUR**RAPPORTNR**

A23789

ISBN

978-82-14-05562-7

GRADERING

Åpen

GRADERING DENNE SIDE

Åpen

for

Innholdsfortegnelse

1	Sammendrag	3
2	Engelsk sammendrag (English summary)	4
3	Innledning	5
4	Problemstilling og formål	6
5	Prosjektgjennomføring	6
5.1	Innsamling av lakselus.....	6
5.2	Metode: Fettsyresammensetning.....	8
5.3	Metode: isotop- og elementsammensetning	8
6	Resultater	10
6.1	Fettsyresammensetning	10
6.2	Isotopanalyser $\delta^{13}\text{C}$ ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) og $\delta^{15}\text{N}$ ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$).....	12
6.3	Bestemmelse av elementsammensetning, screening av ulike elementer	17
6.4	Astaxanthin, antioksidanter fra fôr, evt andre vegetabiliske indikatorer.....	20
7	Konklusjoner	20
8	Forslag til videre arbeid	21
9	Planer for publisering	21
10	Kvalitetssikring av prosjektgjennomføring og resultater	22
11	Referanser	22

BILAG/VEDLEGG

Bilag 1. English Summary

1 Sammendrag

Bakgrunn:

Bakgrunnen for prosjektet er en forespørsel fra FHF om det er mulig å benytte (kjemisk-) analytiske metoder for å spore lakseluslarvers opphav, dvs. undersøke om det er villaks eller oppdrettslaks som har vært vertsfisk for morlus.

Siden det er lakseluslarver (mer spesifikt: copepodittstadiet) som setter seg på sin nye vert, er det et behov for å utvikle metoder som kan analysere enkeltindivider (evt. få individer) av dette stadiet (før lusa tar til seg næring fra sin nye vert evt senere stadier avhengig av stabilitet av markør). Ut fra en bredere prosjektbeskrivelse, finansierte FHF utførelse av deloppgave 1 og 2. Prosjektet kan ses på som et første steg i arbeidet med å utvikle metodikk for bestemmelse av opprinnelse av lakselus i copepodittstadier. Det finansierte prosjektet har **som målsetning å evaluere ulike metoder, og se om disse metodene kan benyttes til å analysere individuelle lus i copepodittstadiet**. I prosjektet inngår også en innsamling av prøvemateriale for evt. videreføring av prosjektet. Dette går ut på å kartlegge innhold av utvalgte forbindelser i copepoditter fra flere opprinnelser (vill og oppdrettsfisk).

Metoder:

Metodene som er testet ut er: fettsyresammensetning, isotopforhold $\delta^{15}\text{N}$ ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$), og $\delta^{13}\text{C}$ ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$), og elementsammensetning. I tillegg er det gjort en evaluering av om innhold av antioksidanter og isomere av astaxanthin kan være mulige sporingsmarkører.

Resultatene oppsummert:

Prøveinnsamling:

Voksne hunnlus med eggstrenger fra fire ulike opprinnelser ble samlet inn og klekket, og til sammen ble det tatt ut ca 850 eppendorfrør med ulike antall copepoditter. Prøver av eggstrenger, muskel/skinn, vann og copepoditter er frosset ned for evt videreføring av prosjekt, hvor det vil være relevant å se på innhold av sporingsmarkører i copepoditter fra ulike opprinnelser, og se nærmere på hvordan markør i fisk er gjenspeilet i eggstreng og videre i copepoditt.

Fettsyresammensetning:

Når det gjelder fettsyresammensetning, har det vært utfordrende å få pålitelige målinger av på enkeltcopepoditter, og det har ikke lyktes i prosjektperioden å gå så lavt ned i prøvemateriale som $n=1$, 5 eller 10 copepoditter. Imidlertid viser analyser av samleprøver ($n=100$) og eggstrenger (vesentlig større prøvemengde) at fettsyresammensetning med stor sannsynlighet er en god markør for opphavet til lakselus. Det er en relativt ny metode hos SINTEF og med ytterlige metodeutvikling/optimalisering vil man trolig kunne få bedre reproduserbarhet (på prøver på $n=10$), og kunne si med mer sikkerhet om det er mulig å gå enda mer ned i prøvemateriale. Det er mulig å kunne standardisere metoden slik at det blir større sikkerhet, og evt teste andre GC systemer (hos f.eks NTNU).

Isotopanalyser:

Isotopanalyser av $\delta^{13}\text{C}$ er mulig for enkeltcopepoditter. Resultatene viser at det er forskjell i verdiene på vill vs oppdrett, men at denne forskjellen er mindre ved analyser av copepoditter enn ved analyser av fiskemuskel. For å få en økt forståelse av stabiliteten av $\delta^{13}\text{C}$ som fingeravtrykk bør det utføres en utvidet og kontrollert studie. Isotopanalyser av $\delta^{15}\text{N}$ har en nedre grense på $n=5$ copepoditter.

Elementsammensetning: det er mulig å bestemme enkelte elementer (eks. fosfor) for enkeltcopepoditter, men resultater viser imidlertid at det ikke er forskjell i verdiene på vill vs oppdrett. Evt videre analyser vil bli

utført med optimalisert prøveopparbeidelse for å se om det er mulig å bestemme andre elementer hvor det kan være forskjell mellom vill og oppdrett.

Antioksidanter/astaxanthin: tilbakemeldinger fra annet laboratorie viser at slike analyser ikke er tilgjengelig på enkeltindivider av copepoditter (3-10 μ g) pr tid pga den lave prøvemengde og deteksjonsgrenser (dvs at det kreves innsats i metodeutvikling/nye metoder). I tillegg vil for eksempel ikke astaxanthin alltid være en pålitelig indikator dersom nye/naturlige fôrkilder blir benyttet.

Generell nytteverdi:

Utvikling av en pålitelig metode for å bestemme opprinnelse på lakselus vil være viktig for å forstå mekanismer bak spredning av lakselus, og dermed kunne verifisere spredningsmodeller. Metoden vil da også være nyttig i kontroll og bekjemping av lakselus. Dette prosjektet har vist at flere av analysemetodene har potensiale til å inngå i en slik analysemetodikk, og med videre utvikling/screening vil det kunne være mulig å utvikle en metodikk for sporing av opphavet til lakseluscopepoditter.

2 Engelsk sammendrag (English summary)

The project was initiated after a request from FHF regarding the possibility of using chemical-analytical techniques to trace the origin of salmon lice larvae, that is, to determine if the host fish of the mother lice was of wild or farmed origin. From a wider project input, FHF financed in the first round work to evaluate which/if methods are able to analyze individual salmon lice larvae (copepodid stage), and to collect samples for possible future screening on the levels of the chosen analytes in lice larvae from different sources (wild or farmed).

It is lice larvae (more specifically, the copepodid stage) that settle on the new host, and there is a need to develop methods able to analyze individual lice larvae, and preferably before it feeds on the new host (early copepodid stage). Analysis of individual copepods is challenging due to the small size of sample (3-10 μ g), and also low concentration of analytes present.

In the project, adult female lice from four different sources were collected and hatched. Copepods in different sample amounts (n=1, 5, 10 and 100) were collected, and the following techniques were evaluated/optimized for possible analysis of individual copepods: fatty acid composition by GC, isotopic ratios $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ by IRMS, and level of different elements by ICP-MS. An evaluation of content of antioxidants and isomers of astaxanthine as possible tracers is also given. Egg-strings, adult salmon lice, salmon fish/skin and water samples were collected for future analysis.

The results show that isotopic ratios of carbon ($\delta^{13}\text{C}$) is possible to measure on individual copepods, and also that samples of wild and farmed source differs in this ratio (even though the difference is smaller than in salmon muscle). Isotopic ratios of nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) require somewhat larger sample amounts (n=5 copepods) to give reliable results. Analysis of several elements is also possible on individual copepods, but the ones determined for individuals at this sampling date, did not show any difference according to origin of host (wild vs farmed). Further analysis (with optimized sample preparation) might result in possible determination of elements that indeed show differences according to wild or farmed origin of host.

When it comes to fatty acid composition, satisfactory results on individual, n= 5 or n= 10 copepods were not achieved during the project period. However, the experience in the project indicates that with further optimization of the methods, it is possible to analyze n= 10 copepods, and it cannot be excluded that also individual lice can be measured in near future. The differences in fatty acid composition between copepods from the different groups, indicate that fatty acid composition is a good marker for wild/farmed origin of host fish (the fatty acid composition of the fish is reflected in eggstrings and also in the non-feeding

copepodid stage). Analysis of astaxanthin and antioxidants on small samples such as individual copepods, are not available at laboratories today (would require method development/new methods).

The project has produced important knowledge on the possibility of, and challenges in, analysis of individual lice of the copepodid stage for the different techniques tested. Some information on the levels of analytes in copepods from adult lice of different hosts (wild/farmed origin) has been produced. Further financing would increase this knowledge, and would also permit more conclusive results on the applicability of techniques where results in this project have not been unanimous.

3 Innledning

Bakgrunn for at prosjektet ble igangsatt

Prosjektgruppen sendte tidligere (8.8.2011) inn et prosjektinnspill til FHF angående "Identifisering og sporing av opphav av rømt oppdrettlaks". I etterkant av dette fikk SINTEF Fiskeri og havbruk en forespørsel fra FHF om å utarbeide en skisse der det skulle beskrives om og hvordan kjemiske analysemetoder kan benyttes til å spore lakselusens opphav, dvs. om copepoditter av lakselus stammer fra hunnlakselus som har vært festet på villaks eller oppdrettlaks.

Prosjektets omfang

Fra det opprinnelige prosjektinnspillet " Sporing av lakselusens opphav- villaks eller oppdrettlaks som vertsfisk" (datert 25.01.2012), tildelte FHF 17.04.2012 midler til gjennomføring av deloppgave 1 og 2 (totalbudsjett på 950 000 NOK). Prosjektet har prosjektnr# 900790 hos FHF. I tillegg ønsket FHF en vurdering på om andre markører, som innhold av astaxanthin fra fôr, rester av antioksidanter eller andre vegetabiliske indikatorer kan være mulige kandidater for sporing.

Opprinnelige prosjektbeskrivelse:

Målsetning: utvikle og evaluere metode for å bestemme om en lakseluslarve (copepoditt evt senere stadier) stammer fra en hunnlus som har sittet på en villaks eller på en oppdrettlaks.

- Oppgave 1. Innsamling av lus, juni/juli 2012
- Oppgave 2. Evaluering av ulike analysemetoder mhp. prøvemengde fra en enkelt lus fra ulike stadier, juni/juli 2012.
- Oppgave 3. Screening av sammensetning av fisk og lus (voksne hunnlus og egg) fra vill og oppdrettet laks (feltforsøk).
- Oppgave 4. Undersøke stabilitet av fingeravtrykket når lakselus er på sin nye vert i kontrollerte infiseringsforsøk

Det finansierte prosjektet har dermed som målsetning å evaluere hvilke/om metoder kan benyttes på individuelle lus i copepodittstadiet samt å samle inn prøvemateriale for evt videreføring av deloppgave 3.

Prosjektorganisering.

SINTEF FH ProsessTeknologi: Inger B Standal, Marit Aursand, Merethe Selnes, Ana Karina Carvajal, Marte Schei (prosjektledelse, prøvetaking, analyser)

SINTEF FH Marin Ressursteknologi: Gunvor Øie, Andreas Hagemann (klekking av lakselusegg)

UMB, Inst for plante og miljøvitenskap: Brit Salbu og Hans-Christian Teien (analyser)

NINA, Bengt Finstad og Ingebrigt Uglem: (innsamling av voksne hunnlus, villaks)

ACE : Guttorm Lange: (innsamling av voksne hunnlus, oppdrettlaks)

University of the Basque Country: Iciar Martinez (rådgiver)

Prosjektet følges opp av Kjell Maroni på vegne av FHF og fiskeri og havbruksnæringen.

4 Problemstilling og formål

Spredningsdynamikk av lus mellom oppdrettsfisk og villfisk er lite kjent. Men ulike modeller for spredning av lus er utviklet. Vi vet at tilstedeværelse av oppdrettsaktivitet øker påslaget av lus på villfisk (Revie et al. 2009), men sporing av lus mellom oppdrettsfisk og villfisk er lite kjent.

Formålet i prosjektet er knyttet opp imot arbeidet med å utvikle metodikk for bestemmelse av opprinnelse på lakselus i larvestadier. Prosjektet kan ses på som et første steg i dette arbeidet. **FHF og næringen trenger analyser av enkeltlarver og mer spesielt copepodittstadiet**, siden det er dette stadiet som setter seg på en ny vert, og man må (trolig) analysere lusa før den tar til seg næring fra den nye verten.

Målet i prosjektet er å bestemme hvilke/om ulike analytiske metoder er egnet til å analysere så små mengder som individuelle lus i copepodittstadiet (vekt på ca 3-10 µg). I prosjektet inngår også en innsamling av prøvemateriale for evt videreføring av deloppgave 3, hvor en screening av innhold av ulike analytter i copepoditter av ulik vill/oppdrettet opprinnelse vil bli utført.

Nytteverdi for næringen

Utvikling av en pålitelig metode for å bestemme opprinnelse på lakselus vil være viktig for å forstå mekanismer bak spredning av lakselus, og dermed kunne verifisere spredningsmodeller og være nyttig i kontrollere/bekjemping av lakselus.

Dersom man lykkes i dette prosjektet, og i en videreføring ved deloppgave 3, vil man i senere prosjekt kunne bygge opp en database med analytiske data på sammensetning av lakselus, egg og larver (bredt utvalg av opprinnelser), som blir et verktøy for å spore lakseluslarver og dermed verifisere spredningsmodeller. Et videre steg kan være å finne spesifikke sporings-elementer i anlegg regionalt for å sjekke grad av påslag på villfisk i disse regionene og spore dette tilbake til anlegg. Resultater av disse undersøkelsene vil ha stor nytteverdi både for industri, forskning og forvaltning

5 Prosjektgjennomføring

Prosjektet er i hovedtrekk utført som planlagt, med en utvidet prosjektperiode.

Den opprinnelige prosjektperiode var 07.05.2012-31.08.2012, men pga at man fikk samlet inn lus senere enn planlagt, utfordringer i metodeutvikling, og på grunn av tokt for prosjektdeltakere fikk man innvilget en utsettelse av rapporteringsfrist.

Når det gjelder budsjettet gikk det en del mer tid til koordinering og prosjektledelse enn budsjettet. Klekking og prøvepreparering av copepoditter og lus tok også noe lenger tid enn planlagt. Siden ACE ikke hadde behov for det opprinnelige budsjettet ved innsamling av lus (de fikk bla. bistand fra Salmar) så har man kunnet omfordele noen av midlene (55 000 NOK).

5.1 Innsamling av lakselus

I løpet av juni/juli 2012 ble det samlet inn og klekket lus fra fire lokaliteter, dvs det ble gjort to uttak fra kilenotstasjoner, og to fra oppdrettsanlegg. Det var et mål å samle inn lus fra både villaks og oppdrettslaks fra nærliggende områder, og dette ble oppnådd. Et relativt stort antall prøver ble frosset ned (eggstrenger, muskelprøver, vannprøver og copepoditter), for testing og evaluering av ulike analysemetoder for sporing av enkeltlus, og for evt. videreføring av prosjekt.

Metodikk: innsamling av lus og klekking

Voksne hunnlus med eggstrenger (Figur 1) ble plukket av både Havbruktjenesten, ACE (oppdrettsanlegg) og NINA (fra kilenotstasjoner). Lusa ble i hovedsak levert til SINTEF i plastflasker med sjøvann, men noen lus ble også overlevert i eppendorfrør for nedfrysning. Det ble samlet inn 40-110 lus fra hver opprinnelse (Tabell 1). For villaksen var det, pga noen fisk med høyt lusepåslag, mulig å samle inn flere lus enn dette. Voksne hunnlus, vannprøver og muskelbit med skinn fra fisk (bit fra epaksial muskel) ble fraktet til SINTEF på is. For villfisken ble det samlet inn muskelbit fra all fisken som det ble plukket lus av, mens for oppdrettsfisken ble dette ikke prioritert (pga høyt antall fisk for å samle inn nok lus). Hos SINTEF ble eggstrenger klippet av og klekket i 60L plasttanker med lufttilførsel (sjøvann, 10°C).



Foto: Bengt Finstad



Foto: Inger B Standal

Figur 1. Det er blitt samlet inn 40-110 stk voksne hunnlus m/eggstreng fra hver opprinnelse.

Tabell 1. Oversikt som viser antall lus samlet inn og klekket.

PrøveID	Dato samlet inn	Ant. v.hunnlus	Ant lus klekket	Dato Copepodittinnsaml.	Fôr
HT1=AT (Oppdrett 1)	10.06	40	30 lus	21.06.2012	Opal 120 Ewos
A (Vill 1)	19-20.06 og 25-26.06	ca110	40 lus	29.06.2012	
O2 (Oppdrett 2)	28.06	40	25 lus	12.07	BioMar
VS (Vill 2)	2.07	78	20 lus	16.07	

Tiden fra eggstrengene ble overført til tank, til det i hovedsak ble observert copepoditter i tanken var ca. 2 uker, men varierte noe pga. ulik modningsgrad på eggstrengene. Copepodittene ble filtrert av ved hjelp av en liten sil (cell strainer, 100µm, BD Falcon), etterfulgt av en kort skylning med destillert vann på ca 3 sekunder, før man overførte dem til plastbeger sammen med så lite vann som mulig (Figur 2). Copepodittene ble deretter overført med pipette (glass/plast) til 0.5mL og 1.5 mL eppendorfrør (i mengder på 1, 5, 10 og 100 stk) så raskt som mulig. Man ønsket en rask overførsel pga. av at det osmotiske trykket kan "spreng" lusa når den er i ferskvann. Eppendorfrørene (ca 250 stk for hver opprinnelse) ble så frosset ned på -80°C.



Figur 2. Copepoditter ble filtrert av, overført med litt vann til plastbeger, og pipettert over til rør (her 100 stk lus i et rør).

Prøvemateriale til evt. senere analyser

En relativt stor mengde prøver er lagret i fryser (-80°C) (eggstrenger, muskel, vannprøver). Det vil kunne være mulig i evt videreført prosjekt å se på hvordan fingeravtrykket i fisk/eggstreng er gjenspeilet i copepoditt, og få mer informasjon om variasjon i eggstrenger fra lus på samme fisk / forskjellige fisk fra samme opprinnelse etc.

5.2 Metode: Fettsyresammensetning

Bakgrunn: Fettsyresammensetning er forskjellig mellom villaks og oppdrettslaks, og den viktigste årsaken til dette er forskjeller i dietten. Siden laksefôr inneholder vegetabiliske mel/olje, kan man skille oppdrettslaks fra villaks ved å studere fettsyresammensetning av fiskemuskel, skjell og andre organer (Martinez et al., 2009a og b, Standal et al., 2009, Grahl-Nielsen et al., 2010). Videre viser en nylig studie at denne forskjellen i fettsyresammensetning mellom oppdrettsfisk og villfisk, gjenspeiles i lakselus og eggstreng (Tocher et al., 2010). Etter at lusa som copepoditt har satt seg på sin nye vert, og begynner å ta til seg næring, vil sammensetningen gradvis forandre seg. Det er usikkert i hvor lang tid man kan spore tilbake til opphavet ved de ulike kjemiske fingeravtrykkene, derfor er fokus i dette prosjektet analyser av copepoditt (som ikke tar til seg næring).

Hos SINTEF Fiskeri og havbruk ble metoden fettsyresammensetning ved gasskromatografi (GC) evaluert. Tradisjonelt blir fett ekstrahert ut før man metylerer fettsyrer for analyse, men ved så små prøver/fettmengder er det ikke hensiktsmessig med dette trinnet i prøveprepareringen siden det er urealistisk at man kan ekstrahere ut så små mengder fett nøyaktig. Metoden som ble benyttet var derimot en direkte trans-metyleringsprosedyre beskrevet av Abdulkadir og Tsuchiya (metylering av prøve direkte uten fett ekstraksjon først). Metoden er nylig benyttet på individuelle *Calanus finmarchicus* (rauåte) som beskrevet av Bergvik et. al. 2012, som fikk et høyere utbytte av fettsyrer ved direkte-metylering, noe som viser at denne metoden var mer effektiv for å ekstrahere ut fettsyrer fra *C. finmarchicus* (enn ved forgående ekstraksjon av fett).

Utførelse: Løsningen med vann og lus ble tinet og overført til innveide GC glass, hvor de ble frysetørket og innveid. Frysetørket prøve ble tilsatt 0,5 ml isooktan (med internstandard C21:0) og 0,2 ml BF₃-metanol, og satt på varmeblokk ved 100°C i 2 timer. Deretter ble prøvene avkjølt på is, tilsatt 0,1 ml isooktan og 0,2 ml dest.vann og satt på vortex-rister i 1 min. Etter sentrifugering ble toppfasen tatt over i et annet rør, og dampet inn til alt fikk plass i det lille innerrøret i GC-glasset. Det er utført 87 analyser av copepoditter, og 21 analyser av eggstreng, og 6 analyser av voksne hunnlus, fra de fire ulike klekkingene.

Vekten på enkeltindivider varierte relativt mye (fra ca 2 μg til 14 μg), dette viser at det er vanskelig med nøyaktig mål på så små prøver. Gjennomsnittlig med standardavvik er vekten $10 \pm 5 \mu\text{g}$ pr enkeltopepoditt. Siden det var en utfordring å veie inn så små mengder med høy nok nøyaktighet før selve analysen på GC er resultatene gitt som % innhold ut fra totalinnhold av fettsyrer (mol%).

5.3 Metode: isotop- og elementsammensetning

To analysemetoder med ulik prøveopparbeiding ble testet på UMB-IPM:

1. Bestemmelse av isotopforhold for stabile isotoper, $\delta^{15}\text{N}$ ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) og $\delta^{13}\text{C}$ ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$)
2. Bestemmelse av elementsammensetning, screening av ulike elementer

Copepodittene i antall på 1, 5, 10 og 100 stk lagret i eppendorfrør sammen med ca 0.5 ml destillert vann ble etter postgang fra SINTEF lagret i -20°C på UMB før videre opparbeiding til analyser.

Tilknyttet begge metodeuttestingene ble det først tatt utgangspunkt i en samleprøve på 100 lus for å fastsette sammensetningen i copepodittene. Deretter ble det opparbeidet prøver fra samleprøver med 10 og 5 lus samt prøver med 1 lus for å få informasjon om hvilke mengde prøvemateriell som var påkrevet for analysene og om det var mulig å utføre måling på prøvemengder som tilsvarer en copepoditt.

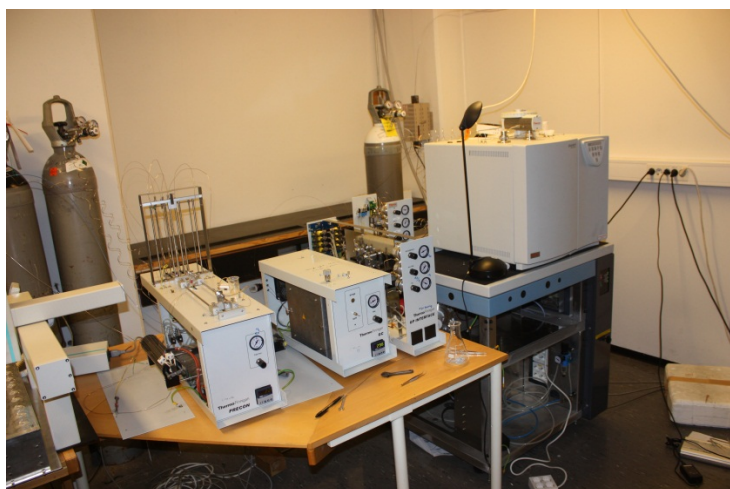
Bakgrunn: isotopanalyser for sporing:

IRMS (Isotope Ratio Mass Spectrometry) benyttes til å bestemme isotopforholdet mellom isotoper av grunnstoffer. Typiske isotopforhold av interesse er $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $\text{O}18/\text{O}16$ og $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$. Måling av isotopforhold er av stor geologisk og biologisk relevans fordi det i kjemiske og biologiske prosesser hele tiden skjer en fraksjonering der isotopforholdet til mange grunnstoffer stadig forandres. En mye brukt anvendelse av isotopforhold er sporing av kilder. I dette arbeidet var målet å vurdere om isotopforholdet for $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ($\delta^{15}\text{N}$) og $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ($\delta^{13}\text{C}$) er forskjellig i lakselus fra villfisk og oppdrettsfisk for slik å kunne spore lakselus copeditter tilbake til opphavet. Det benyttede instrumentet var ikke installert for måling av $^2\text{H}/^1\text{H}$ og $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ isotoper og disse kunne derfor ikke identifiseres.

I kjemiske reaksjoner og fysiske og biologiske prosesser vil lette isotoper reagere raskere enn tyngre. Dette gjør at vi vil få en fraksjonering mellom isotopene av et grunnstoff. Fisk som er høyt i næringskjeden vil derfor ha et høyere $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ isotopforhold enn fisk som er lavere i næringskjeden. Denne fraksjoneringsgraden uttrykkes i promille basert på forskjell i isotopforhold mellom prøven og en kjent standard, som eksempel isotopforholdet for nitrogen og karbon i luft.

Utførelse:

For å få informasjon om isotopforholdene for nitrogen; $\delta^{15}\text{N}$ og karbon; $\delta^{13}\text{C}$ i copepoditter av lakselus ble lusene frysetørket, før bestemmelse av tørrvekt og pakking i tinnkapsler og måling ved IRMS. Prøver av 100 lus ble frysetørket i opprinnelige eppendorfrør fra lagringen før overføring til tinnkapsler og bestemmelse av vekt, mens samleprøver av 10 og 5 lus samt enkelt lus ble tint og overført til tinnkapsler ved pipette før frysetørket i tinnkapsel, pakking og måling ved IRMS (continuous flow –IRMS, Figur 3). Ved overføring ved bruk av pipette ble ikke alt vann fra eppendorfrøret inkludert og riktig antall copepoditter ble bekreftet ved å telle innhold i pipetten under lupe. Husstandard ble brukt som referansemateriale.



Figur 3. Continuous flow – Isotope Ratio Mass Spectrometer (IRMS)

Bestemmelse av elementsammensetning, screening av ulike elementer

For å få informasjon om elementsammensetning i copepoditter av lakselus ble lusene oppsluttet ved hjelp av Ultraclave før måling. Samleprøver av 100 og 5 lus samt prøver av enkeltlus ble sammen med vannet de var lagret i overført til teflonrør og oppslutning. Før oppslutning ble prøver tilsatt ultrapure HNO₃, MQ-vann og internstandard. Oppsluttede prøver ble fortynnet til 5 ml før måling ved ICP-MS. Til målingene ble det benyttet en 8800 ICP-MS Triple Quad (Agilent) (Figur 4). For å få informasjon om nøyaktighet ble standard referansemateriale inkludert som egne prøver under oppslutningen og målingen ved ICP-MS. For å få informasjon om elementsammensetningen i copepoditter ble samleprøven på 100 copepoditter screenet for ulike elementer. Elementer som hadde lavere konsentrasjon enn bestemmelsesgrensen ble vurdert som uaktuelle i det videre arbeidet med analyser av prøver med 5 copepoditter og 1 copepoditt. ICP-MS triple Quad er sensitiv og nivåer av elementer eller elementforhold som kommer via maten til oppdrettsfisk kan derfor anvendes til sporing hvis dette ikke kommer via maten til villfisk.

A



B



Figur 4. A) Samleprøve av 100 lus i et eppendorfrør før og etter oppslutning i et 15 ml falcon rør, B) 8800 ICP-MS Triple Quad instrumentet.

6 Resultater

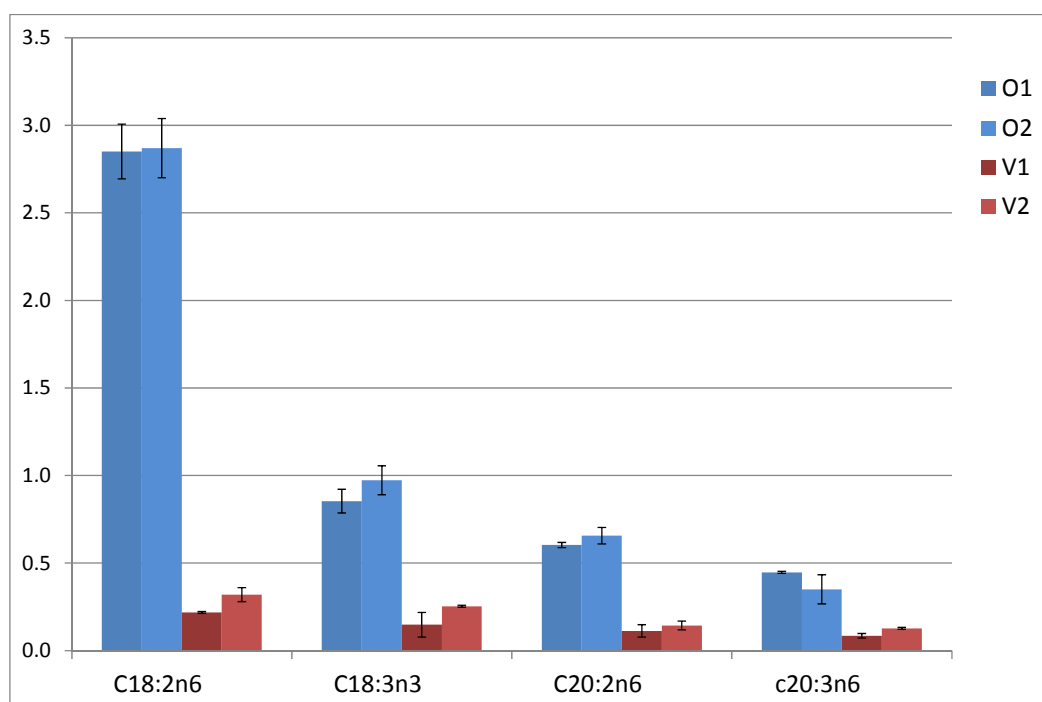
6.1 Fettsyresammensetning

Det er jobbet med å utvikle en analysemetode for fettsyresammensetning på små mengder av lakseluscopepoditter. Utgangspunkt er metode for analyse av enkeltindivider av raudåte (vesentlig større enn lakseluscopepoditter). Prøver på 100 copepoditter ble analysert først, for å fastsette hvilke fettsyrer som var tilstede og innholdet av disse. Deretter ble prøver på n=1, n=5 og n=10 copepoditter analysert.

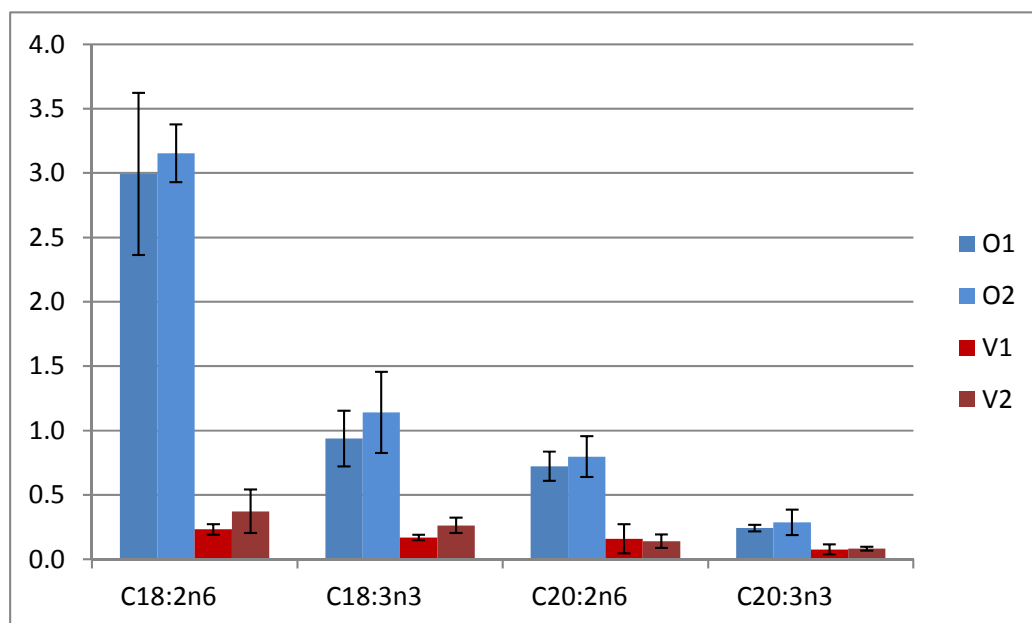
Resultatene viser at analyser av prøver på n= 100 copepoditter gir tilfredstillende signal/støyforhold for fettsyrene som detekteres. Imidlertid var det utfordringer ved nedskalering til n=10, n= 5 og n= 1 copepoditter. Reproduserbarheten var dårlig, og det ble observert støy i kromatogrammene pga lavt prøvemateriale. Noen av eksperimentkjøringene viste gode spekter på n=5 og n=10 copepoditter, men det

lykkes ikke å reproducere disse i senere analyser. Det er et behov for videre metodeutvikling for å fremskaffe en metode som er pålitelig for å bestemme fettsyresammensetning i enkeltcopepoditter. Erfaringene i prosjektet tilsier at det vil være mulig å analysere n=10 copepoditter, mens det ligger større usikkerheter i analyser av n=1, og n= 5 copepoditter. Prosjektdeltakerne vil ikke utelukke at med annet utstyr og videreutvikling av metodene vil være mulig å analysere enkeltindivider.

Imidlertid viser analyser av prøver på n= 100 copepoditter lovende resultater for fettsyre som markør, siden "vegetabiliske" fettsyrer (18:2n-6, 18:3n-3) har et forhøyet nivå i copepoditter hvor vertsfisk var oppdrettet (Figur 5a). Dette betyr at forskjellene i fettsyresammensetning av fisk gjenspeiles i lus/eggstreng/ og videre til copepoditter. Man ser også de samme trendene i analyse av eggstrenger av ulik opprinnelse (Figur 5b).



Figur 5a. Analyser av copepoditter (samleprøver på 100 individ). Innhold av utvalgte fettsyrer med standardavvik for de fire gruppene copepoditter med ulikt opphav (O1= oppdrett1, O2=oppdrett 2, V1= vill1, V2=vill2). Resultatene er gitt som mol% av totale fettsyrer kvantifisert (N= 3-6 prøver analysert for hver gruppe).



Figur 5b. Analyser av eggstreng. Innhold av utvalgte fettsyrer med standardavvik for de fire gruppene (O1= oppdrett1, O2=oppdrett 2, V1= vill1, V2=vill2). Resultatene er gitt som mol% av totale fettsyrer kvantifisert (N= 3-10 prøver analysert for hver gruppe).

Nytteverdi av analyser av samleprøver for sporing av opphav (f.eks n= 10 copepoditter).

Om man analyserer en samleprøve på f.eks 10 lus, får man gjennomsnittlig fettsyresammensetning for disse. Resultatene i prosjektet tyder på (men dette bør undersøkes grundigere) at innholdet av den vegetabiliske fettsyren 18:2n-6 er lavere enn 0.5% hos "vill", og høyere enn 2.5% hos "oppdrett". Dersom man for samleprøven får en gjennomsnittsverdi for 18:2n-6 som er noe høyere enn 0.5%, vil man kunne si at det trolig er "noen" individer av lus med oppdretts-opprinnelse, men det er vanskelig å si eksakt antall, pga av den forventede naturlige variasjonen i vekt/størrelse og fettinnhold/fettsyresammensetning blant copepodittene. Dersom det er stor sannsynlighet at copepoditter på en fisk stammer fra morlus både fra vill og oppdrettsfisk, vil det derfor være en stor fordel å kunne analysere enkeltindivider.

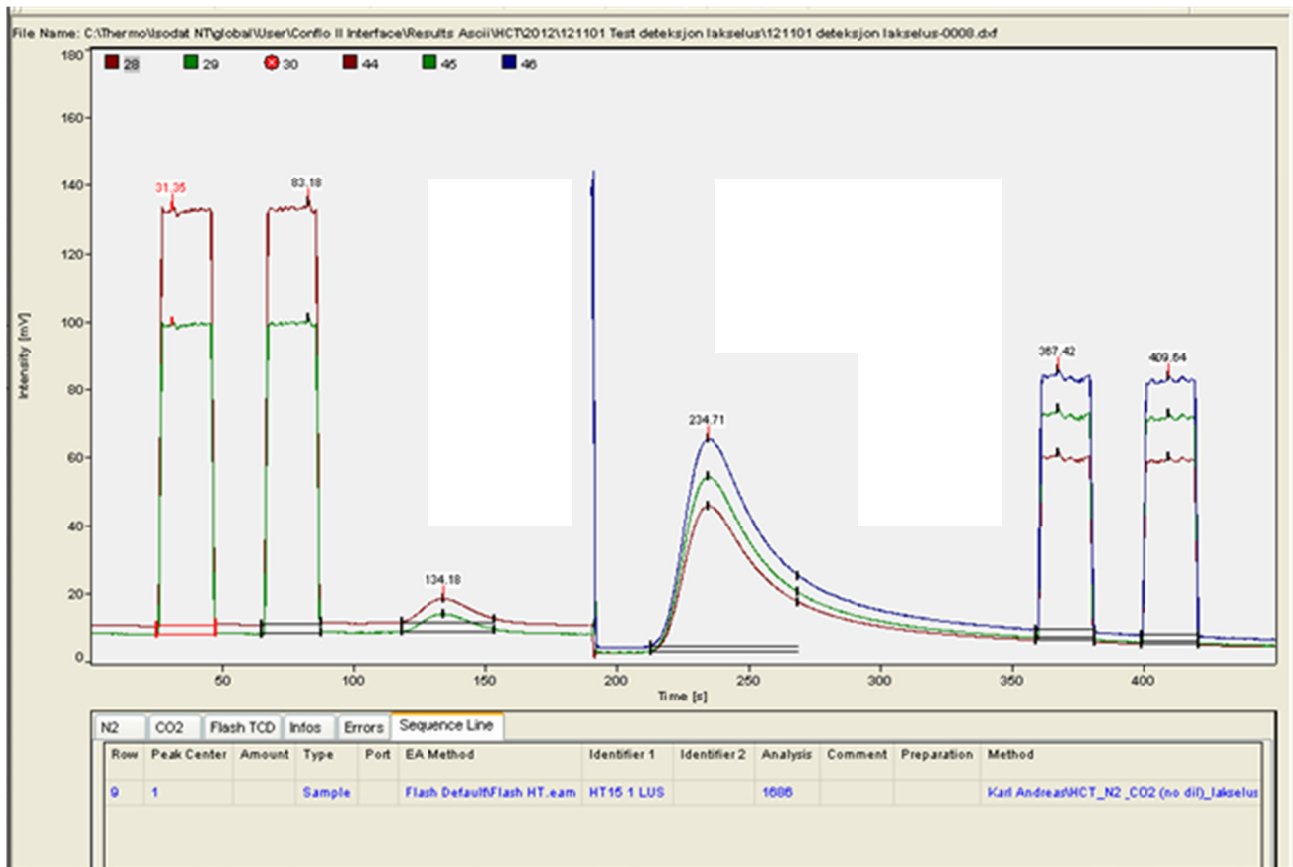
Konklusjon: Det lyktes ikke i løpet av prosjektperioden å få pålitelige målinger av fettsyrer på enkeltcopepoditter av lakselus. Imidlertid viser analyser av samleprøver (n=100) og eggstrenger at fettsyresammensetning med stor sannsynlighet er en god markør for opphavet til lakselus. Med ytterlige metodeutvikling/optimalisering vil man trolig kunne få mer stabile resultater, også på mindre prøver av lakselus.

6.2 Isotopanalyser $\delta^{13}\text{C}$ ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) og $\delta^{15}\text{N}$ ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$)

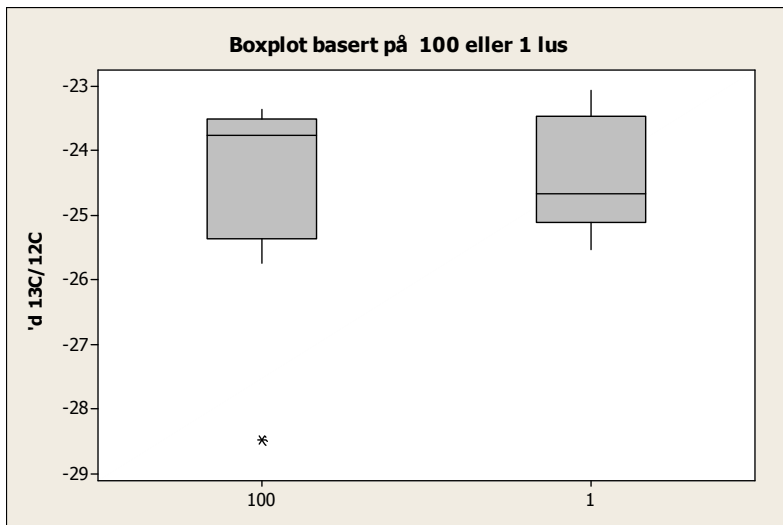
Analyser av enkeltindivid: $\delta^{13}\text{C}$ ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$)

Kromatogrammet fra IRMS for en copepoditt er gjengitt i Figur 6. Resultatene viser at innholdet av karbon er tilstrekkelig i en copepoditt for å kunne få bestemme isotopforholdet. Noe som må sies å være svært bra. Toppen for karbon som kommer etter 234,71 s er godt over bakgrunnsnivået. $\delta^{13}\text{C}$ basert på enkeltcopepoditt er også tilsvarende som basert på samleprøver av 100 copepoditter (Figur 7). Dette indikerer god sammenheng uavhengig av antall copepoditter som inkluderes i prøven og at det er mulig å fastsette isotopforholdet for karbon i et individ. Nylige resultater (Dean et al., 2011) viste at $\delta^{13}\text{C}$ er lovende for sporing av opphav av lakseluscopepoditter (i den studien ble samleprøver på 10 copepoditter analysert).

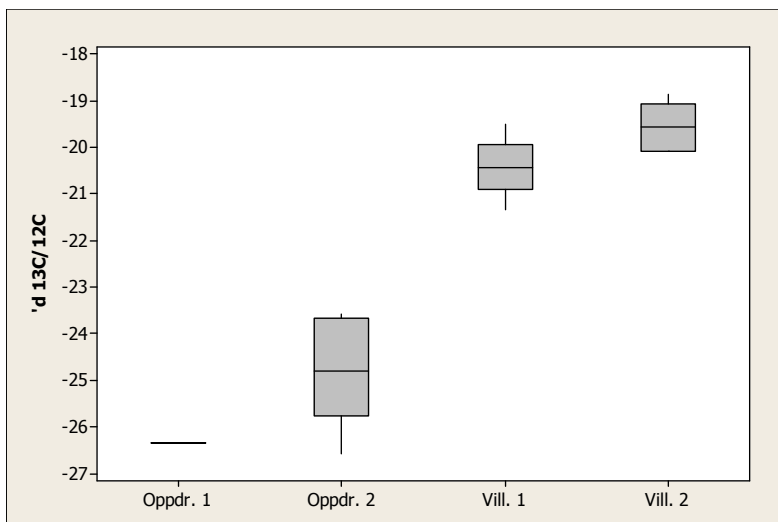
Basert på analyser av muskelprøver fra vertsfisken (Figur 8) så er det forskjell i $\delta^{13}\text{C}$ mellom villfisk. Selv om det opprettholdes en forskjell i $\delta^{13}\text{C}$ mellom copepoditter med hhv vill- og oppdrettet opphav så er forskjellen mindre enn ved analyser av fiskemuskel (Figur 9). For å få en større forståelse av hvordan isotopforholdet endrer seg fra vertsfisk til lus og videre til en copepoditt bør det utføres en utvidet studie.



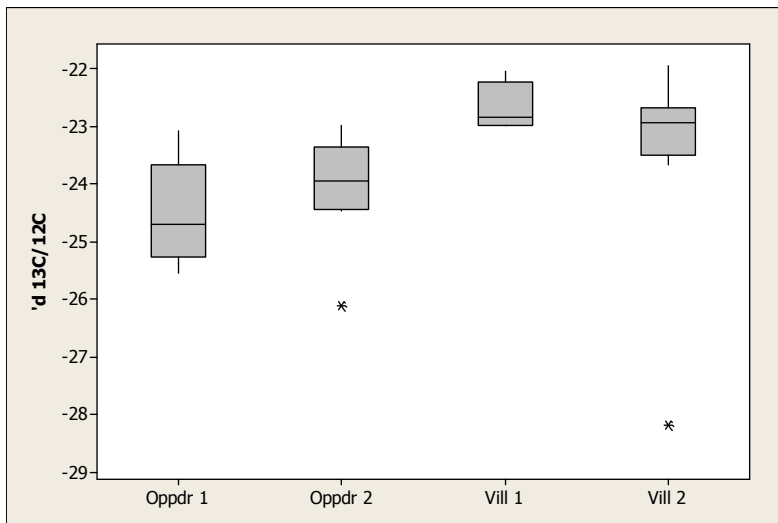
Figur 6. Kromatogram fra IRMS ved analyser av enkeltcopepoditt og standardprøver. Fra venstre kommer følgende topper: standardprøver for nitrogen (31 s og 83 s), prøvens nitrogenisotoper (134.89 s), prøvens karbonisotoper (234.71 s) og standardprøver for karbon (367 og 409 s). Fargene på linjene representerer ulike masser/isotoper (for nitrogen : rød = ^{14}N , grønn = $^{15}\text{N} + ^{14}\text{N}$), for karbon: (rød og blå = ^{12}C , grønn = ^{13}C).



Figur 7. Boxplot av $\delta^{13}\text{C}$ etter analyser av samleprøve på 100 copepoditter (N=6) og på enkeltcopepoditter (N=5). (Boxplottet viser max og min observert verdi, median, nedre og øvre kvartil, og *outlier)



Figur 8. Boxplot av $\delta^{13}\text{C}$ etter analyser av fiskemuskel fra vertsfisken (N=5 eller 6), unntak er oppdrett 1 hvor det er bare én muskelp prøve. (Boxplottet viser max og min observert verdi, median, nedre og øvre kvartil.)



Figur 9. Boxplot av $\delta^{13}\text{C}$ etter analyser av enkeltcopepoditter fra oppdrettsfisk og fra villfisk (oppdrett 1 og oppdrett 2, N=5) (vill 1, vill 2, N=10). (Boxplottet viser max og min observert verdi, median, nedre og øvre kvartil, og *outlier)

Den totale biomassen i prøver på n= 1, 5 og 10 copepoditter var så liten at det var urealistisk å fastsette vekten med god nøyaktighet. Prøvene ble derfor målt uten å bestemme biomassen, bare skilt på antall copepoditter i de enkelte prøvene.

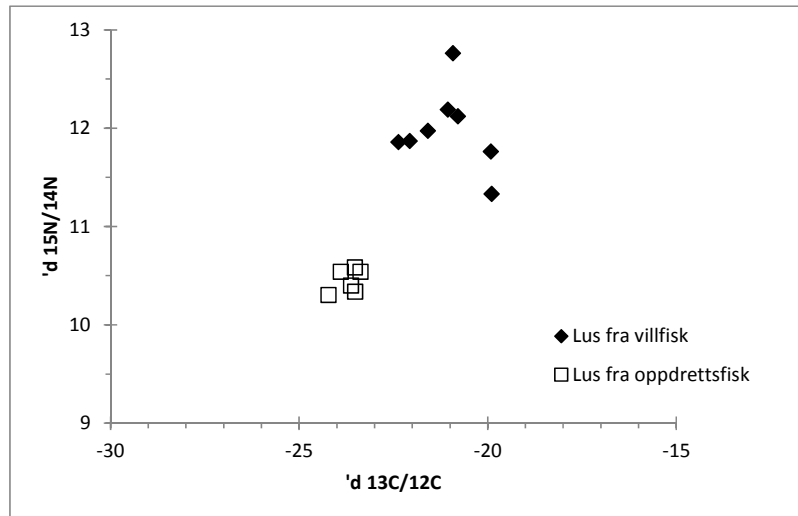
Analysen av enkeltindivid: $\delta^{15}\text{N}$ ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$)

For $\delta^{15}\text{N}$ viser resultatene at innholdet av nitrogen i en copepoditt er så lite at det ikke er mulig for instrumentet å skille dette fra bakgrunn og fastsette nivået av nitrogen og da heller ikke forholdet mellom isotoper av nitrogen. Kromatogrammet fra IRMS for en copepoditt er gjengitt i figur 6, hvor toppen for nitrogen kommer etter 134,18 s er på samme nivå som bakgrunnsnivået. Resultatene viser at en må minimum ha 5 copepoditter for å kunne identifisere innholdet av nitrogen og derav forholdet mellom $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$.

Resultater fra samleprøver (100 stk copepoditter), $\delta^{13}\text{C}$ og $\delta^{15}\text{N}$

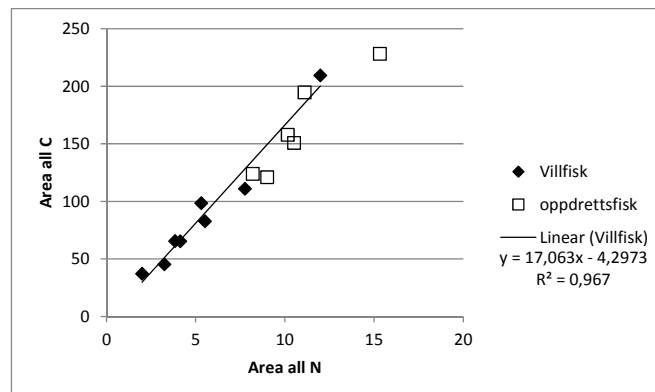
Resultatene viser at isotopforholdet for nitrogen og karbon er forskjellig for copepoditter med morlus fra oppdrettsfisk og copepoditter med morlus fra villfisk (Figur 10, to grupper analysert). $\delta^{15}\text{N}$ er høyere i copepoditter fra villfisk enn i copepoditter fra oppdrettsfisk, noe som indikerer en anrikning av $\delta^{15}\text{N}$ i copepoditter fra villfisk i forhold til fra oppdrettsfisk og dermed at villfisk er i et høyere trofisk nivå.

$\delta^{13}\text{C}$ er høyere i copepoditter fra villfisk enn i copepoditter fra oppdrettsfisk. På samme måte som for $\delta^{15}\text{N}$ vil $\delta^{13}\text{C}$ øke oppover i næringskjeden. $\delta^{13}\text{C}$ er i stor grad påvirket av diettkilden, dvs. om fisken har livnært seg på vannlevende organismer eller landlevende organismer som fluer og mygg osv. Ved å sammenlikne $\delta^{13}\text{C}$ i vannlevende organismer, landlevende organismer og i fisken selv, er det mulig å anslå dietten. Resultatene viser at $\delta^{13}\text{C}$ er høyere i copepoditter med opprinnelse fra villfisk, enn fra oppdrettsfisk.



Figur 10. Sammenhengen mellom isotopforholdet for nitrogen og karbon i copepoditter med morlus fra oppdrettsfisk (oppdrett1) og villfisk1 (vill1).

Resultater fra analysene indikerer at det er et stabilt forhold mellom nitrogen og karbon i prøvene (Figur 11). Copepoditter fra lus på villfisk inneholder mindre karbon og nitrogen enn copepoditter fra oppdrettsfisk, noe som kan forklares med en lavere biomasse. Dette er imidlertid ikke noe som påvirker resultatene.



Figur 11. Sammenhengen mellom innhold av nitrogen og karbon i copepoditter fra villfisk (vill1) og oppdrettsfisk (oppdrett1).

Nytteverdi av analyser av samleprøver (f.eks n= 10 copepoditter) for sporing av opphav. Utføres analysen på en samleprøve som inneholder en blanding av copepoditter fra oppdrett og villfisk vil dette gi et samlet analysesvar med et isotopforhold i verdi mellom oppdrett og villfisk som slik ikke kan identifisere villfisk eller oppdrettsfisk som vert.

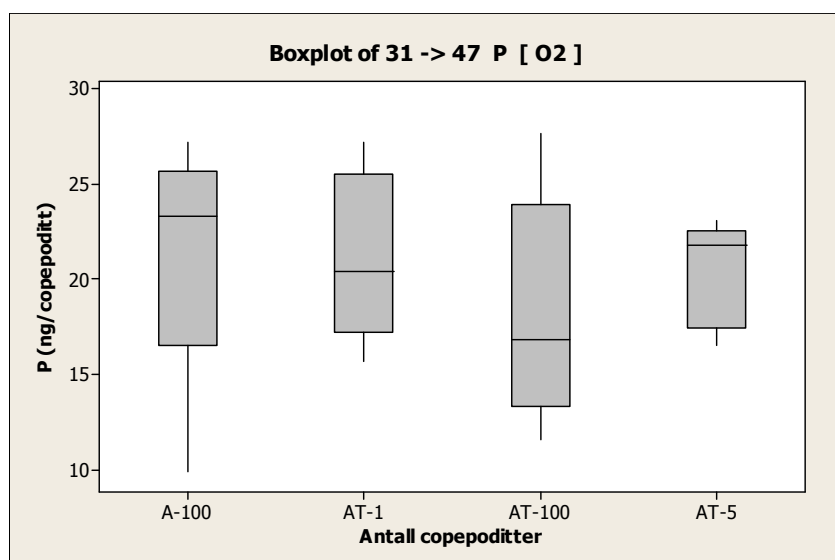
Konklusjon: isotopanalyser

Når det gjelder muligheten for å måle på enkeltindivider av lakseluscopepoditter viser resultatene i prosjektet at $\delta^{13}\text{C}$ er mulig, mens $\delta^{15}\text{N}$ krever 5 copepoditter for å få pålitelige måleresultater. Resultatene viser at isotopforholdet for nitrogen og karbon er forskjellig for copepoditter med morlus fra oppdrettsfisk og copepoditter med morlus fra villfisk. Forskjellen i $\delta^{13}\text{C}$ mellom vill og oppdrett er imidlertid mindre ved analyser av copepoditter enn ved analyser av fiskemuskel. For å få en økt forståelse av stabiliteten i isotopforholdet og om det er egnet til å bruke som fingeravtrykk for å spore lakselus så bør det utføres et

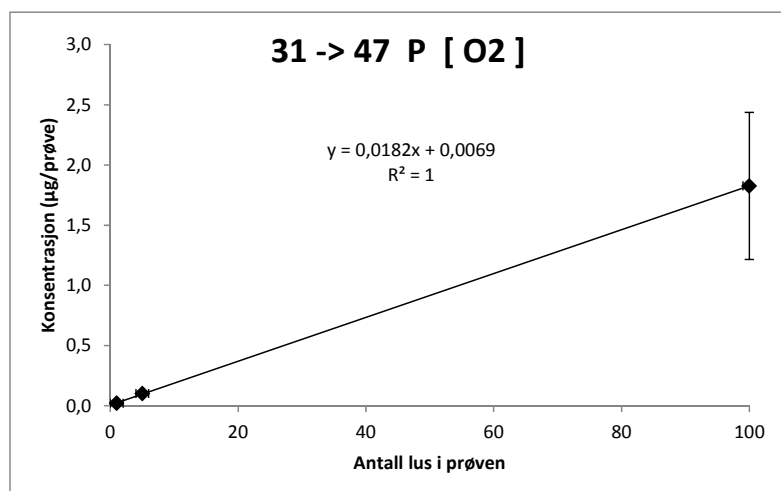
utvidet og kontrollert studie – med fokus på stabilitet av fingeravtrykk mellom ulike ledd. Isotopanalyser av karbon bør utføres på enkeltindivid.

6.3 Bestemmelse av elementsammensetning, screening av ulike elementer

Resultater viser at det er en rekke elementer som kan detekteres i samleprøver av 100 copepoditter. Basert på fortykning til 5 ml og uavhengig av om en baserer seg på 100 eller 5 copepoditter i en samleprøve eller 1 copepoditt så viser resultatene samme verdi for fosfor (Figur 12). Noe som må sies å være svært bra og som viser at metoden er følsom nok til å bestemme elementer med relativ høy konsentrasjon for copepoditter. Konsentrasjonen av fosfor er imidlertid identisk for copepoditter av lus fra villfisk og oppdrettsfisk (Figur 12). Fosfor kan derfor ikke brukes for å kunne spore lakselus copepoditter tilbake til opphavet, men fosfor kan benyttes som et mål på størrelse/antall copepoditter i en prøve og nivåer av andre elementer kan slik relateres til konsentrasjon av fosfor som vil være et bedre mål enn konsentrasjon pr copepoditt (Figur 13).



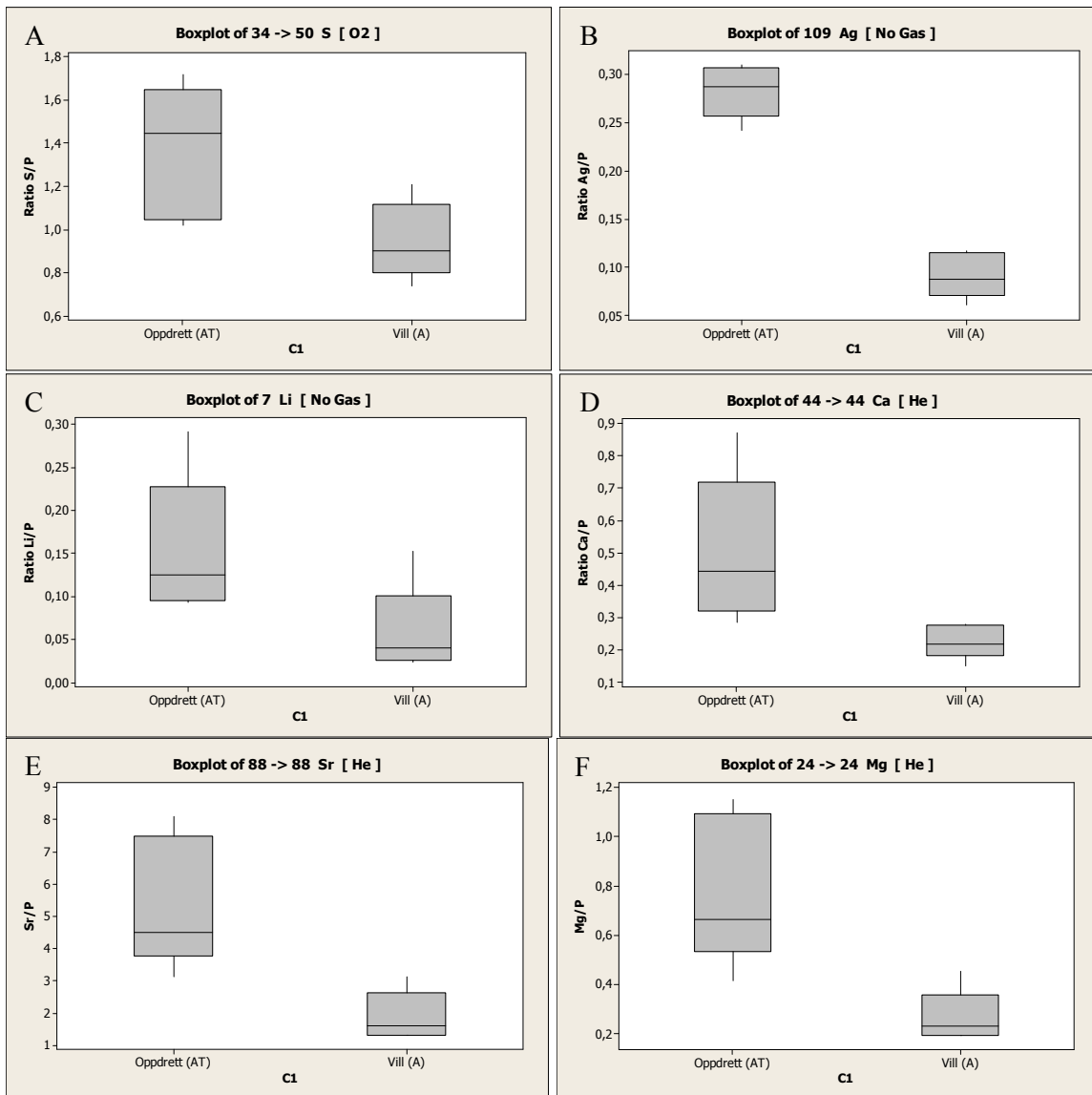
Figur 12. Boxplot av konsentrasjonen av fosfor pr copepoditt med utgangspunkt i prøver av 100 copepoditter med opphav i villfisk (A-100= vill1), og i prøver med opphav i oppdrettsfisk (AT= oppdrett1) med hhv 1, 5 og 100 copepoditter. N=5.



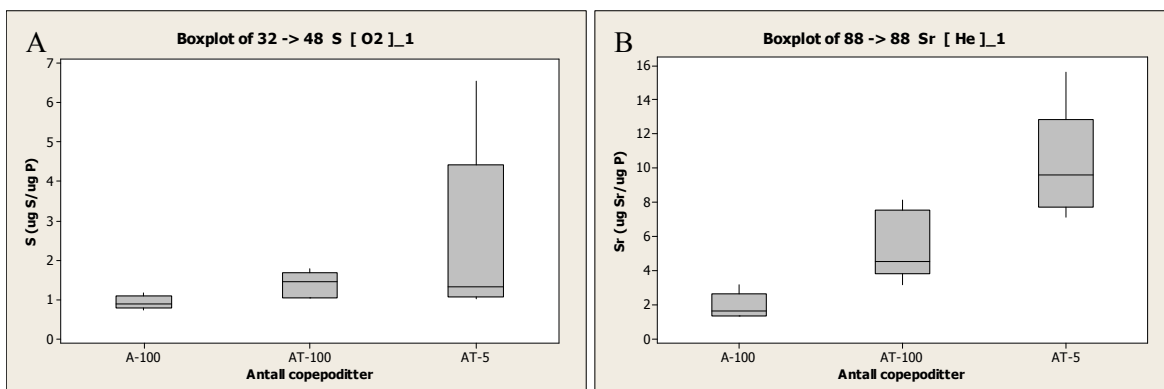
Figur 13 Sammenhengen mellom antallet copepoditter og målt konsentrasjon av fosfor (copepoditter med opphav "oppdrett 1" analysert).

Basert på analysene utført ved ICP-MS så er det også en rekke elementer med forskjell mellom copepoditter fra lus som stammer fra ulike fiskegrupper (Figur 14). Kartleggingen av disse elementene er ikke ferdig. Resultatene indikerer imidlertid at konsentrasjonen for disse elementer er for lav til å fastsette konsentrasjonen i enkeltindivider av copepoditter innenfor den metoden som har blitt benyttet for prøveoppbehandling. Arbeidet med metodeutviklingen så langt viser at vi ikke er helt i mål. Usikkerheten for å fastsette innholdet av ulike elementer som Sr er fortsatt for stor til å få gode målinger på en samleprøve på 5 copepoditter (Figur 15).

Det er mulig å forbedre oppslutningsteknikken slik at sluttvolumet blir halvert og konsentrasjonen i prøvene blir dobbelt så høy, samtidig er det mulig å forbedre forbehandlingen av prøveutstyret før bruk. Dette vil gi økt følsomhet for metoden og redusert støy i prøver basert på lite prøvemateriale. Det er også behov for å gjøre en screening på flere analyser for å få økt informasjon om reproduksjon av data.



Figur 14 Konsentrasjon av A) Svovel (S), B) sølv (Ag), C) Litium (Li), D) kalsium (Ca), E) Strontium (SR) og F) Magnesium i copepoditter fra oppdrett 1 og vill 1. Enheten er oppgitt pr μg element pr. μg fosfor (P).



Figur 15 A) Konsentrasjon av S i copepoditter og B) konsentrasjonen av Sr i copepoditter. Verdier er oppgitt pr μg fosfor (P). Resultater er basert på analyser av samleprøver for 5 og 100 copepoditter som stammer fra

lus fra oppdrettsfisk (AT=oppdrett 1). Resultater er også vist for en samleprøve for 100 copepoditter fra lus som stammer fra villfisk (A). N=5.

Konklusjon: Det er mulig å bestemme enkelte elementer (eks. P) for enkeltcopepoditter, resultater viser imidlertid at det ikke er forskjell i verdiene på vill vs oppdrett. Resultatene indikerer at konsentrasjonen for flere av elementene er forskjellig mellom vill og oppdrett, men at den er for lav til å fastsette konsentrasjonen i enkeltindivider av copepoditter innenfor den metoden som har blitt benyttet for prøveopparbeidelse. Forslag til videre arbeid vil være å forbedre oppslutningsteknikken, og også forbehandling av utstyr, i tillegg til å teste ut reproduserbarheten.

6.4 Astaxanthin, antioksidanter fra fôr, evt andre vegetabiliske indikatorer

Det ble gjort henvendelser til eksterne laboratorier som utfører analyser av astaxanthin og antioksidanter (Eurofins med deres underleverandører), men tilbakemeldingen var at det krevdes prøvemateriale i vesentlig større mengder enn snakk om i dette prosjektet (som var 10 µg). I tillegg er trolig konsentrasjonen av slike forbindelser relativt lave i copepoditter. Med dagens metoder er analyser av antioksidanter/astaxanthin dermed ikke tilgjengelig for enkeltcopepoditter, og det vil kreve metodeutvikling for å kunne fastslå om det er mulig eller ikke. Analyser av ulike former(isomere) av astaxanthin har tidligere vist at oppdrettsfisk har høyere innhold av 3R,3'S isomeren enn villfisk pga. at syntetisk astaxanthin tilsatt i fôret. Imidlertid vil innholdet av denne isomeren variere ut fra hvilken kilde astaxanthin er hentet fra (Ostmeyer og Schmidt, 2004).

Videre ble det vurdert som at den viktigste vegetabiliske indikatoren, kjent fra tidligere studier, er vegetabiliske fett syrer (som allerede inngikk i prosjektbeskrivelsen).

7 Konklusjoner

Leveransen i prosjektet er å beskrive om/hvilke metoder som kan fungere for enkeltindivider av lakselus på copepodittstadiet. Oppsummert for metodene testet ut:

- når det gjelder bestemmelse av **fettsyresammensetning** har man i prosjektperioden ikke lyktes i å få pålitelige resultater på enkeltcopepoditter (eller n=5). Imidlertid viser analyser av samleprøver (n=100) og eggstrenger at fettsyresammensetning med stor sannsynlighet er en god markør for opphavet til lakselus. Med ytterligere metodeutvikling/optimalisering vil man trolig kunne få mer stabile resultater, også på mindre prøver av copepoditter (n=10) og det utelukkes ikke at det er mulig å gå enda lavere ned i prøvemateriale.
- **Isotopanalyser $\delta^{13}\text{C}$ ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$)** er **mulig** for enkeltcopepoditter, og resultater viser at det er forskjell i verdiene på vill vs oppdrett, men at forskjellen er mindre enn for vertsfiskene (muskelp prøver). For å få en økt forståelse av stabiliteten av $\delta^{13}\text{C}$ som fingeravtrykk bør det utføres en utvidet og kontrollert studie.
- **Isotopanalyser $\delta^{15}\text{N}$ ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$)** har en nedre grense på n= 5 copepoditter.
- Elementsammensetning: **det er mulig å bestemme enkelte elementer** (eks. P) for enkeltcopepoditter, resultater viser imidlertid at det ikke er forskjell i verdiene på vill vs oppdrett. Videre arbeid vil være å optimalisere prøveopparbeidelse for å se om det er mulig å bestemme andre elementer med forskjell mellom vill og oppdrett.
- Antioksidanter/astaxanthin, pga prøvemengde og konsentrasjon av disse metabolitter i copepoditter er slike analyser ikke tilgjengelig pr tid (dvs at det kreves innsats i metodeutvikling/nye metoder).

8 Forslag til videre arbeid

Det finansierte prosjektet hadde som målsetning å evaluere hvilke/om metoder kan benyttes på individuelle lus i copepodittstadiet samt å samle inn prøvemateriale for evt videreføring av deloppgave 3. Man har tilgjengelig både prøver av copepoditter, eggstrenger, muskel/skinn og vann til en videreføring av prosjektet.

Resultatene viser at det er mulig å benytte ulike følsomme analyseteknikker for å fastsette kjemisk sammensetning i copepoditter enten i enkeltindivid eller i samleprøver. Generelt vil en robust metode for å spore lakselus kreve at minst to parametere blir analysert. Prøvematerialet til en copepoditt er imidlertid så liten at det vil være umulig å kombinere disse analyseteknikkene, og en må derfor velge enten fettsyresammensetning, isotopanalyser eller elementsammensetning. For å vurdere hvilken metode som er best egnet bør det utføres en utvidet studie for å se på stabilitet av det kjemiske fingeravtrykket, men også videre metodeutvikling/optimalisering for å fastslå med sikkerhet hvilke metoder som tillater analyser av enkeltcopepoditter.

Resultatene har vist at analyser av isotopforhold $\delta^{13}\text{C}$ er mulig for enkeltcopepoditter. Imidlertid så var forskjellen i $\delta^{13}\text{C}$ mellom vill og oppdrett mindre ved analyser av copepoditter enn ved analyser av fiskemuskel. For å få en økt forståelse av stabiliteten i isotopforholdet og om det er egnet til å bruke som fingeravtrykk for å spore lakselus så bør det utføres en utvidet og kontrollert studie – med fokus på stabilitet av fingeravtrykk mellom ulike ledd. Isotopanalyser av karbon bør utføres på enkeltindivid.

Man kom ikke helt i mål når det gjelder egnetheten til fettsyresammensetning ved GC for analyser av enkeltindivider, men ut fra de klare resultatene på forskjeller mellom copepoditter av ulikt opphav, vil det være nyttig med mer forskning på dette området. Siden det virker sannsynlig at copepoditter på en fisk kan stamme fra morlus med ulikt opphav, vil det være en stor fordel å kunne analysere enkeltindivider. Metoden benyttet er relativt ny hos SINTEF, og med ytterligere metodeutvikling/optimalisering vil man trolig kunne få bedre reproduserbarhet (på prøver på $n=10$), og kunne si med mer sikkerhet om det er mulig å gå enda mer ned i prøvemateriale. Det vil også være nyttig å sammenligne med resultater på andre GC systemer (hos f.eks NTNU).

For de elementene som kunne bestemmes for enkeltcopepoditter, viste ikke resultatene forskjell mellom vill og oppdrettet opphav. Resultatene indikerer at konsentrasjonen for flere andre elementer er forskjellig mellom vill og oppdrett, men at den er for lav til å fastsette konsentrasjonen i enkeltindivider av copepoditter innenfor den metoden som har blitt benyttet for prøveopparbeidelse. Videre arbeid vil være å forbedre oppslutningsteknikken, og også forbehandling av utstyr, i tillegg til å teste ut reproduserbarheten.

9 Planer for publisering

Rapporten blir publisert på FHF sine hjemmesider, og det vil bli vurdert fortløpende ang aktuelle fagdager/konferanser hvor resultatene kan bli formidlet. I det finansierte prosjektet var det ikke budsjettert inn publisering, men prosjektgruppen mener det er viktig å synliggjøre prosjektet også for en eventuell videreføring. Det kan være aktuelt med populærvitenskapelig publisering i form av nyhetsbrev fra European Aquaculture Society, eller som artikkel i Aquaculture Europe. Publisering av resultater i vitenskapelig artikkel med referee vil være mer aktuelt etter at man har samlet inn mer datamateriale.

10 Kvalitetssikring av prosjektgjennomføring og resultater

Kvalitetssikring ifølge interne retningslinjer hos SINTEF Fiskeri og havbruk. Seniorforsker Ulf Erikson er kvalitetssikrer i prosjektet.

11 Referanser

- Bergvik, M., Leiknes, Ø., Altin, D., Rennan Dahl, K., Olsen, Y. (2012) Dynamics of the lipid content and biomass of *Calanus finmarchicus* (copepodite V) in Norwegian Fjord. *Lipids* 47, 881-895.
- Dean, S., DiBacco, C., McKinley, R. S. (2011) Assessment of stable isotopic signatures as a means to track the exchange of sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*) between host fish populations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 68, 1243-1251.
- Grahl-Nielsen, O., Glover, K. A. (2010) Fatty acids in fish scales. *Marine Biology* 157, 1567-1576.
- Martinez, I. Standal, I. B. Finstad, B., Aursand, M. (2009a) Identification of the farm origin of salmon by fatty acid and HR ¹³C NMR profiling. *Food Chemistry* 116, 766-773.
- Martinez, I. Standal, I. B. Aursand, M. Yamashita, Y., Yamashita, M. (2009b) Analytical methods to differentiate farmed from wild seafood. In: Handbook of Seafood and Seafood Products Analysis. (Nollet, L., Toldra, F. eds). CRC Press, pp. 215-232.
- Ostmeyer, U., Schmidt, T. (2004). Differentiation of wild salmon, conventionally and organically farmed salmon. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 100, 437-444.
- Revie, C., Dill, L., Finstad, B., Todd, C.D. (2009) Sea Lice Working Group Report. NINA Special Report 39, 1-117.
- Standal, I. B. Axelson D. E., Aursand, M. (2009) Differentiation of Fish Oils According to Species by C-13-NMR Regiospecific Analyses of Triacylglycerols. *J Am Oil Chem Soc* 86, 401-407.
- Tocher, J.A., Dick, J. R., Bron, J. E., Shinn, A. P., Tocher, D. R. (2010) Lipid and fatty acid composition of parasitic caligid copepods belonging to the genus *Lepeophtheirus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 156, 107-114.

BILAG 1. English Summary

The project was initiated after a request from FHF regarding the possibility of using chemical-analytical techniques to trace the origin of salmon lice larvae, that is, to determine if the host fish of the mother lice was of wild or farmed origin. From a wider project input, FHF financed in the first round work to evaluate which/if methods are able to analyze individual salmon lice larvae (copepodid stage), and to collect samples for possible future screening on the levels of the chosen analytes in lice larvae from different sources (wild or farmed).

It is lice larvae (more specifically, the copepodid stage) that settle on the new host, and there is a need to develop methods able to analyze individual lice larvae, and preferably before it feeds on the new host (early copepodid stage). Analysis of individual copepods is challenging due to the small size of sample (3-10 µg), and also low concentration of analytes present.

In the project, adult female lice from four different sources were collected and hatched. Copepods in different sample amounts (n=1, 5, 10 and 100) were collected, and the following techniques were evaluated/optimized for possible analysis of individual copepods: fatty acid composition by GC, isotopic ratios $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ by IRMS, and level of different elements by ICP-MS. An evaluation of content of antioxidants and isomers of astaxanthine as possible tracers is also given. Egg-strings, adult salmon lice, salmon fish/skin and water samples were collected for future analysis.

The results show that isotopic ratios of carbon ($\delta^{13}\text{C}$) is possible to measure on individual copepods, and also that samples of wild and farmed source differs in this ratio (even though the difference is smaller than in salmon muscle). Isotopic ratios of nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) require somewhat larger sample amounts (n=5 copepods) to give reliable results. Analysis of several elements is also possible on individual copepods, but the ones determined for individuals at this sampling date, did not show any difference according to origin of host (wild vs farmed). Further analysis (with optimized sample preparation) might result in possible determination of elements that indeed show differences according to wild or farmed origin of host.

When it comes to fatty acid composition, satisfactory results on individual, n= 5 or n= 10 copepods were not achieved during the project period. However, the experience in the project indicates that with further optimization of the methods, it is possible to analyze n= 10 copepods, and it cannot be excluded that also individual lice can be measured in near future. The differences in fatty acid composition between copepods from the different groups, indicate that fatty acid composition is a good marker for wild/farmed origin of host fish (the fatty acid composition of the fish is reflected in eggstrings and also in the non-feeding copepodid stage). Analysis of astaxanthin and antioxidants on small samples such as individual copepods, are not available at laboratories today (would require method development/new methods).

The project has produced important knowledge on the possibility of, and challenges in, analysis of individual lice of the copepodid stage for the different techniques tested. Some information on the levels of analytes in copepods from adult lice of different hosts (wild/farmed origin) has been produced. Further financing would increase this knowledge, and would also permit more conclusive results on the applicability of techniques where results in this project have not been unanimous.



Teknologi for et bedre samfunn

www.sintef.no