# Rapport

## Fremskaffe metodikk for sporing av opphav for lakseluslarver (SPORLUS)

**FHF 901859**

Foto: Andreas Hagemann, SINTEF


## Forfattere:

Inger B. Standal, Hans Christian Teien, Cecilie Miljeteig, Anna Båtnes, Trond R. Størseth, Karl Andreas Jensen, Marianne U. Rønsberg, Merethe Selnes



## Rapportnummer:

2024:00596 - Åpen

## Oppdragsgiver:

FHF

SINTEF Ocean AS
Postadresse:
Postboks 4762 Torgarden
7465 Trondheim
Sentralbord: 46415000

Foretaksregister:
NO 937 357 370 MVA

# Rapport

# Fremskaffe metodikk for sporing av opphav for lakseluslarver (SPORLUS)

FHF 901859

**EMNEORD**
lakselus
sporing
opprinnelse
lipid
fettsyrer
grunnstoff
stabile isotoper

**VERSJON**
2.1

**DATO**
2024-06-05

**FORFATTER(E)**
Inger B. Standal, Hans Christian Teien, Cecilie Miljeteig, Anna Båtnes, Trond R. Størseth, Karl Andreas Jensen, Marianne U. Rønsberg, Merethe Selnes

**OPPDRAGSGIVER(E)**
FHF

**OPPDRAGSGIVERS REFERANSE**
Kjell Maroni

**PROSJEKTNUMMER**
FHF 901859

**ANTALL SIDER**
37

**KORT SAMMENDRAG**
Ulike kjemisk-analytiske metoder er blitt testet ut for å evaluere deres potensiale til å spore opphav av enkeltlarver av lakselus, nærmere bestemt om morlus satt på en villaks eller oppdrettslaks. Arbeidet har omfattet innsamling av prøver fra villfisk og oppdrettsfisk, med påfølgende klekking av eggstrenger og oppsamling av copepoditter. Metoder som har blitt testet ut i prosjektet er lipidanalyser (fettsyresammensetning og lipidomics) og grunnstoffanalyser. Prosjektet lyktes med å utvikle metodikk for måling av flere grunnstoff i enkeltindivider av luselarver. Flere grunnstoff-forhold (som As/K, AS/P og U/K) varierte mellom vill- og oppdrettsopprinnelse, og har dermed potensiale for å inngå i en metodikk for sporing av opphav. Lipidsammensetningen var en god markør for å skille vill- og oppdrettsopprinnelse av samleprøver av luselarver, men ytterligere metodeutvikling må til for å kunne analysere enkeltindivider. Et mer omfattende sammendrag er gitt i rapporten.

**UTARBEIDET AV**
Inger Beate Standal (hovedforfatter)

SIGNATUR
Inger B. Standal (Jun 5, 2024 15:24 GMT+2)

**KONTROLLERT AV**
Hanne Dalsvåg

SIGNATUR
Hanne Dalsvåg (Jun 6, 2024 08:44 GMT+2)

**GODKJENT AV**
Ana Karina Carvajal

SIGNATUR
Ana K. Carvajal (Jun 5, 2024 16:24 GMT+2)

| RAPPORT NR. | ISBN | GRADERING | GRADERING DENNE SIDE |
|---|---|---|---|
| 2024:00596 | 978-82-14-07247-1 | Åpen | Åpen |

COMPANY WITH MANAGEMENT SYSTEM CERTIFIED BY DNV
ISO 9001 • ISO 14001
ISO 45001

# Historikk

| VERSJON | DATO | VERSJONSBESKRIVELSE |
|---|---|---|
| 1.0 | 2024-05-15 | Første utkast av sluttrapport oversendt FHF |
| 2.0 | 2024-05-31 | Andre utkast av sluttrapport oversendt FHF |
| 2.1 | 2024-06-05 | Tredje utkast av sluttrapport oversendt FHF |

# Innholdsfortegnelse


**1 Sammendrag/Summary ..... 4**

**2 Innledning ..... 6**

2.1 Faglig bakgrunn for at prosjektet ble igangsatt ..... 6

2.2 Prosjektets omfang ..... 8

2.3 Prosjektorganisering ..... 8

**3 Problemstilling og formål ..... 9**

3.1 Betydning for næringen ..... 9

3.2 Prosjektmål ..... 9

**4 Prosjektgjennomføring ..... 9**

4.1 Innsamling av prøver ..... 10

4.2 Klekking av eggstrenger og prøvetaking ..... 11

4.3 Frysetørking og forsendelse av prøver til ulike analyser ..... 12

4.4 Analyser av fettsyresammensetning ved GC FID ..... 12

4.5 Analyser ved LC-MS/MS (lipidomics) ..... 13

4.6 Analyser av grunnstoffsammensetning ..... 15

**5 Resultater og diskusjon ..... 17**

5.1 Vurdering av innsamlet referansemateriale ..... 17

5.2 Resultater fra fettsyreanalyser ved GC-FID ..... 17

5.3 Resultater fra lipidomicsanalysene ..... 20

5.4 Resultater fra analyser av grunnstoffsammensetning ..... 24

5.5 Vurdering av mulighetene for anvendelse av resultater fra prosjektet i næringen ..... 31

5.6 Vurdering av i hvilken grad og på hvilken måte resultatene vil bidra til styrket bærekraft ..... 32

**6 Hovedfunn ..... 32**

**7 Acknowledgements ..... 33**

**8 Referanser ..... 33**

**9 Ferdigstilte leveranser ..... 35**


**BILAG/VEDLEGG**


Vedlegg 1. Eksempelkromatogram fra GC-FID

Vedlegg 2. Resultater fra grunnstoffanalyser av vevsprøver fra fisk

# 1 Sammendrag/Summary


**Norsk Sammendrag**

Forebygging og kontroll av lakselus og skottelus er en vedvarende utfordring for havbruksnæringen. Økt kunnskap om spredningen av lakselus er viktig for å bedre kunne håndtere denne utfordringen. Ulike modeller er utviklet for å estimere lusespredningen, men verifisering av modellene har ikke vært mulig uten en egnet metode for å identifisere opprinnelsen til luselarver. Utvikling av en pålitelig metode for å bestemme opprinnelsen til lakseluslarver vil være grunnleggende viktig for å forstå mekanismer bak spredning av lakselus, for å verifisere og forbedre spredningsmodeller og for å kontrollere og bekjempe lakselus. Siden det er sannsynlig at luselarver på en fisk (eller i vannprøver fra samme lokalisasjon) kan stamme fra morlus med ulikt opphav, vil det være viktig å kunne analysere enkeltindivider.

I prosjektet "Fremskaffe metodikk for sporing av opphav for lakseluslarver (SPORLUS)" har ulike kjemisk-analytiske metoder blitt testet ut for å evaluere deres potensiale til å spore opphav av enkeltlarver av lakselus, nærmere bestemt om morlus satt på en villaks eller oppdrettslaks. Arbeidet har omfattet innsamling av vevs- og luseprøver, klekking av lus fra villfisk og oppdrettsfisk, og evaluering av hvor egnet ulike analysemetoder er for å spore enkeltindivider av luselarver i copepodittstadiet tilbake til om morlus satt på en vertsfisk som var vill eller oppdrettet. Metoder som har vært testet ut i prosjektet er grunnstoffanalyser og lipidanalyser (fettsyresammensetning og lipidomics). Arbeidet bygger videre på prosjektet "Sporing av lakselusens opphav: Villaks eller oppdrettslaks som vertsfisk" (#900790), hvor også isotopanalyser ble evaluert som en mulig sporingsmetode.

Resultatene viste at det var flere grunnstoff som var målbare i enkeltindivider av luselarver med metoden som ble utviklet (ApexQ -ICP-MS). Man har i prosjektet derfor fokusert på å analysere et bredere utvalg av prøver (skinn, slim, muskel, morlus, larver) fra ulike opprinnelser med denne metoden - for å få informasjon om variasjon i og robusthet av grunnstoffanalyser for å spore opphav. Resultatene viser at det er flere grunnstoff-forhold som varierer mellom vill og oppdrettsopprinnelse; enkelte forskjeller man finner i vevsprøver fra oppdrettsfisk og villfisk, er også forskjellig i morlus, og i copepoditter fra de ulike opprinnelsene. Blant annet er As/K, As/P og U/K forskjellig mellom vill og oppdrettsopprinnelse. Forskjellene skyldes i hovedsak at villfisken har høyere innhold av grunnstoffer som oppkonsentreres i marine organismer. Metoden bør valideres for et større geografisk område og testes under reelle betingelser slik metoden er tenkt brukt. Dersom metoden viser seg å være robust nok, kan det potensielt være mulig å utvikle en metodikk for sporing av opphavet til lakseluscopepoditter basert på analyser av forhold mellom ulike grunnstoff.

Resultatene viser at fettsyresammensetningen i luselarvene varierer mellom vill og oppdrettsopprinnelse når man analyserer samleprøver, men det var utfordrende å få pålitelige resultater fra analyser ved GC-FID for så små prøvemengder som enkeltcopepoditter er. Lipidomicsresultatene, som gir et mer detaljert bilde av fettsammensetning, viser også god separasjon mellom vill- og oppdrettsopprinnelse på samleprøver av copepoditter. Selv om lipidomics ved LC-MS generelt er en mer sensitiv analysemetode enn GC-FID var metoden ikke sensitiv nok til å gi pålitelige resultater fra fettekstrakt fra enkeltlarver. Ytterligere metodeutvikling kreves for å kunne benytte lipidprofil av luselarver for å spore vill og oppdrettsopprinnelse av enkeltluselarver.

En robust og pålitelig metode for å bestemme opprinnelse på lakseluslarver er viktig for å kunne verifisere lusespredningsmodeller og for økt kunnskap om mekanismer bak spredningen. Dette prosjektet har vist at grunnstoffanalyser har potensiale til å inngå i en slik analysemetodikk og at informasjon om grunnstofforhold kan benyttes til å skille på opprinnelse, men at det er behov for å teste på et større prøvemateriale og

optimalisere og videreutvikle prøvehåndteringen for slike analyser før metoden kan tas i bruk. Metoden vil dermed på sikt kunne være nyttig i kontroll og bekjempelse av lakselus.

**English Abstract**

The prevention and control of salmon lice pose ongoing challenges for the aquaculture industry. Increased knowledge about the spread of salmon lice is important for better control and prevention. Several models have been developed to estimate lice dispersion, but verifying these models has been difficult without methods able to analyze the origin of the lice larvae.

Developing a reliable method to determine the origin of individual salmon lice larvae is essential for understanding the mechanisms behind their spread, improving spread models, and effectively controlling and combating lice. Since lice larvae on a fish (or in water samples) may come from parent lice with different origins, the method should be capable of analyzing individual lice.

In the SPORLUS project, the main goal has been to develop methods for tracing the origin of individual salmon lice. The work involved collecting samples of fish tissues, and lice, for subsequent hatching lice from wild fish and farmed fish, as well as evaluating various analytical methods for studying individual lice larvae in the copepodite stage. Methods tested in the project include lipid analysis (fatty acid composition and lipidomics) and elemental analysis. This project builds upon the previous study “Tracing the Origin of Salmon Lice: Wild or Farmed Salmon as Host Fish” (#900790), which also explored isotopic analysis as a potential tracing method.

Results from elemental analyses show that it was possible to measure several elements in copepodites by the developed approach by ApexQ-ICP-MS. Based on this, the project focused on analyzing a broader range of samples (skin, mucus, muscle, parent lice, larvae) from different origins using elemental analysis for increased knowledge on variation and robustness for tracing origin of lice larvae. The results revealed variations in elemental ratios between wild and farmed origins for the samples analyzed in the project. Differences found in tissue samples from farmed fish and wild fish were also distinct in mother lice and copepodites from different origins. Among others, the elemental ratios As/P, As/K, and U/K differed between wild and farmed origins. The main differences are primarily attributed to the higher concentrations of certain elements present in the marine environment, which accumulates in wild fish. The method should be validated across a larger geographical area and tested under practical conditions as intended. If the method proves robust enough, it could potentially be used to develop a methodology for tracing the origin of salmon lice copepodites based on several elemental ratios.

The results indicate that the fatty acid composition in copepodites varies between wild and farmed origins on pooled samples but obtaining reliable results from GC-FID analyses on individual larvae proved challenging. Lipidomics results, which provide a more detailed picture of fat composition, also demonstrate that lipid profiles can distinguish between wild and farmed origins in pooled samples of copepodites. However, despite lipidomics by LC-MS/MS is in general a more sensitive analysis method than GC-FID, it was not sensitive enough to yield reliable results from lipid extracts of individual larvae. Further method development is necessary to utilize the lipid profile of individual lice larvae for tracing wild and farmed origins.

A robust and reliable method for determining the origin of individual salmon lice larvae is essential for verifying lice dispersal models and gaining insights into the mechanisms behind their dispersion. While this project demonstrates the potential of elemental analyses in such a methodology, further testing, optimization, and development are needed before the method can be implemented. Ultimately, this method could prove useful in controlling and combating salmon lice.

# 2 Innledning

## 2.1 Faglig bakgrunn for at prosjektet ble igangsatt

Forebygging og kontroll av lakselus og skottelus er en vedvarende utfordring for havbruksnæringen. Økt kunnskap om spredningen av lakselus er viktig for å bedre kunne håndtere denne utfordringen. Det er utført flere studier med mål om å forstå mekanismer for smittespredning (Båtnes et al., 2021, Nilsen et al., 2017), og det er også utviklet ulike modeller for å estimere lusepredningen (Aldrin et al., 2013, Asplin et al., 2020, Lien et al., 2022) som også er basis for trafikklyssystemet. Utvikling av en pålitelig metode for å bestemme opprinnelse på lakselus vil være grunnleggende viktig for å forstå mekanismer bak spredning av lakselus, for å verifisere og forbedre spredningsmodeller og for å kontrollere og bekjempe lakselus. Siden det er sannsynlig at luselarver på en fisk (eller i vannprøver fra samme lokalisasjon) kan stamme fra morlus med ulikt opphav, vil det være viktig å kunne analysere enkeltindivider.

**Bakgrunn lakseslus: ulike stadier og spredning av larver**

Lakselus er et parasittisk krepsdyr som er spesialisert på laksefisk og lever av vertens slim, hud og blod. Livssyklusen består av 8 stadier (Hamre et al. 2019 der lusa først lever planktonisk i vannmassene som naupliuslarver (nauplius I og II) og deretter copepoditt. Copepoditten er det infektive stadiet, som finner og setter seg på en vert, før den etter hvert utvikler seg til fastsittende chalimuslarver (chalimus I og II). Deretter går den via preadulte stadier (I og II) før den blir voksen. I de mobile stadiene (preadult og adult lus), der lusa beveger seg fritt rundt på fisken, øker hudskadene som følge av lusas beiting, og dette kan resultere både i nedsatt sykdomsforsvar, redusert vekst og økt dødelighet (Finstad & Bjørn 2011).

Eggene til lakselus blir befruktet inni hunnen og legges deretter i to eggstrenger som henger fra kroppen. Etter å ha parret seg kan en hunn lage opp til 11 par strenger, med ca. 300-800 egg i hvert par (Pike & Wadsworth 1999; Boxaspen 2006; Båtnes et al., 2024). Utviklingshastigheten er avhengig av vanntemperatur (Hamre et al. 2019) og ved lave temperaturer kan man også forvente et større spredningspotensiale på grunn av lengre utviklingstid for de ulike frittlevende stadiene. Lakseluslarver (nauplier og copepoditter) er små (0,6-0,7 mm lengde), men har en viss svømmekapasitet. De responderer på lys (Heuch et al. 1995, Flamarique et al. 2000), ulike temperaturer (Crosbie et al. 2020) og saliniteter (Crosbie et al. 2019), og fordeler seg i vannmassene avhengig av disse faktorene. Denne egenbevegelsen foregår hovedsakelig vertikalt i vannmassene, mens havstrømmene transporterer luselarvene i alle plan, potensielt over store avstander.

**Prosjektbakgrunn**

SPORLUS svarer på delmål 6: Fremskaffe metodikk for sporing av opphav for lakseluslarver i fellesutlysning fra FHF juni av mars 2023 med tittel *Forebygging og kontroll av lakselus med best mulig fiskevelferd.* Bedre kunnskap om hvor lakseluslarvene kommer fra er viktig for å sette inn riktige tiltak som skal redusere lakselusproblemene både på villfisk og oppdrettsfisk. Å skille larver fra hunnlus som har sittet på hhv oppdrettet og villfisk vil kunne gjøres ved å analyser ulike sporingsmarkører i larvene.

Prosjektgruppen gjennomførte i 2012 det FHF finansierte prosjektet "Sporing av lakselusens opphav: Villaks eller oppdrettslaks som vertsfisk" (#900790). I prosjektet ble ulike kjemisk-analytiske metoder som fettsyresammensetning, isotop- og grunnstoffsammensetning evaluert og testet ut for analyser av enkeltindivid av lakselus i copepoditt-stadiet. Metodene som ble testet ut var fettsyresammensetning, isotopforhold $\delta^{15}N$ ($^{15}N/^{14}N$), og $\delta^{13}C$ ($^{13}C/^{12}C$), og grunnstoffsammensetning. For flere av metodene ble det funnet forskjeller hos copepoditter avhengig av om mor-lus satt på vill eller oppdrettsfisk. Det ble vist at $\delta^{13}C$ kunne identifiseres i enkeltlarver, men det var utfordrende å få gode resultater av de andre kjemiske analysene på enkeltlarver. På bakgrunn av at det er fremkommet nye og mer sensitive metoder for lipid –

og grunnstoffanalyser siden den gang, ble det vurdert at metodene tilgjengelig i dag kunne ha potensiale til å kunne analysere flere kjemiske markører i enkeltlarver. Metoder som har vært testet ut i SPORLUS prosjektet er analyser av lipider og grunnstoff.

**Bakgrunn analysemetoder for sporing av vill/oppdretts opprinnelse**

Resultater fra 2013 viste **at fettsyresammensetning** med stor sannsynlighet er en god markør for opphavet til lakselus (Standal & Teien, 2013) på grunn av forskjeller i fettsyresammensetning av vill og oppdrettsfisk, men også at det var utfordrende å få en metode som fungerer for så små mengder (2-6 ug) som enkeltlarver representerer. Resultatene i prosjektet viste at innholdet av den vegetabilske fettsyren 18:2n-6 var lavere enn 0.5% av total FA hos "vill", og høyere enn 2.5% hos "oppdrett" i sampleprøver av lakseluslarver. Dette er i samsvar med tidligere studier som viser at lipidsammensetning av en hunnlus delvis gjenspeiler lipidsammensetningen til verten (Tocher et al. 2010). Det er kjent at oppdrettsfisk (muskel, skjell og andre organer) har en annen sammensetning av fettsyrer enn villfisk, og at man ved analyser av fettsyrer kan skille vill/oppdrettslaks (Martinez et al.,2009, Aursand et al., 2009, Axelson et al., 2009, Grahl-Nielsen et al., 2010, Olsen et al., 2013, Skilbrei, et al. 2015).

Hos SINTEF ble fettsyresammensetning av lus i 2012 analysert ved gasskromatografi (GC-FID) etter en direkte trans-metyleringsprosedyre (metylering av prøve direkte uten fettekstraksjon først), som benyttet på enkeltindivider av raudåte i Bergvik et.al (2012). I SPORLUS prosjektet har man testet ut lipidanalyser ved LC-MS/MS som er en mer sensitiv analysemetode enn tradisjonell GC-FID. I prosjektet har man benyttet en triple quadropole detektor (TQD), som har noe mindre oppløsning en HR-MS(MS) - men har fordelen ved at den har en høyere sensitivitet (Chatterjee et al., 2019). Metoden gir også informasjon om fettsyrer i ulike lipidklasser, noe som er en fordel siden det er kjent at fettsyrer i triglyserider i fisk er mer påvirket av dietten enn fettsyrer i fosfolipider (Henderson and Tocher 1987, Olsen et al., 2013). Metoden er nylig benyttet hos SINTEF for analyse av fiskeegg (Malzahn et al., 2022).

I tillegg til å reflektere den kjemiske sammensetningen av fôret, vil forholdet mellom **ulike grunnstoff** også kunne påvirkes av sammensetningen av vannet. Det foreligger en betydelig database hos NMBU på spormetaller i gjeller til villfisk og oppdrettsfisk som viser geografiske forskjeller og at konsentrasjonen av spormetaller er forskjellig i oppdrettsfisk og villfisk. Selv om det er naturlig å anta at sammensetning av sporgrunnstoff i villfisk og oppdrettsfisk er så stor at den medfører forskjell i den kjemiske sammensetningen av lakselus, er det flere ukjente faktorer om grad av overføring for ulike spormetaller mellom vertsfisk og lakselus, og hvor raskt den kjemiske sammensetningen i lakselus endres over tid. Analyseteknikker benyttet ved NMBU i 2012 var ikke følsomme nok for å detektere flere grunnstoff i enkeltindivid av lakselarver noe som er nødvendig for å ha egnet fingeravtrykk. I SPORLUS prosjektet er det testet om en mer følsom metode (Micro auto sampler -Apex Q - ICP-MS/MS Agilent 8900#100) er egnet for å analysere grunnstoffsammensetning i enkeltindivid av lakselus. Denne metoden har nylig blitt benyttet på NMBU for å måle Sr90 i insekter (Ormaasen, 2021). For grunnstoffanalyser er det viktig å evaluere overføring mellom fisk – morlus- og egg/larve av de stoffene som man lykkes i å kvantifisere i enkeltlarver, siden det er mindre kjent hvordan ulike grunnstoff overføres i denne verdikjeden.

Resultater fra det tidligere FHF prosjektet viste at forhold mellom ulike **stabile isotoper** av karbon ($^{3}C/^{12}C$, eller $\delta^{13}C$) kan bestemmes i enkeltindivid av lakseluslarver mens $\delta^{15}N$ krevde n= 5 copepoditter (Standal & Teien, 2013). Det er kjent at $\delta^{13}C$ er forskjellig i terrestriske og akvatiske karbonkilder, og at isotopforholdet i liten grad endres i næringskjeden. Fôret til oppdrettslaks er basert på andre karbonkilder enn næringsorganismene til villaks, imidlertid så var forskjellen i δ13C mellom vill og oppdrett mindre ved analyser av copepoditter enn ved analyser av fiskemuskel (Standal & Teien, 2013). Andre studier på lakselus viser også at δ13C isotopsignaturer i lakselus fra villaks er forskjellig fra lakselus på oppdrettslaks (Butterworth et al., 2004, Dean et al., 2011), men at $\delta^{13}C$ med fordel kan kombineres med andre analyser for sikker klassifisering (fettsyrer og/eller grunnstoff). Prøvematerialet til en luselarve er imidlertid så liten at det vil være vanskelig å kombinere ulike analyseteknikker. Siden det ikke er fremkommet nye

analysemetoder for $\delta^{15}N$ (-eller tilsvarende isotopforhold for isotoper med lavere naturlig forekomst enn $^{13}C$) har man ikke fokusert på ytterligere analyser av isotoper i prosjektet.

## 2.2 Prosjektets omfang

Totalbudsjettet var på 2.5 mill. NOK, og fullfinansiert av FHF. Prosjektansvarlig hos FHF har vært Kjell Maroni. Prosjektperioden var 1 år.

## 2.3 Prosjektorganisering

Prosjektet ble utført med **SINTEF Ocean** som prosjekteier, og med NTNU (Institutt for Biologi) og NMBU-MINA som samarbeidspartnere. Inger Beate Standal har vært prosjektleder.
SINTEF Ocean har videre hatt ansvar for arbeidet med å optimalisere lipidanalyser for analyse av enkeltcopepoditter. Sentrale medarbeidere fra SINTEF Ocean har videre vært Trond S. Størseth og Marianne U. Rønsberg for lipidomics-analyser og Merethe Selnes for fettsyreanalyser. Deni Ribičić har vært kvalitetssikrer i prosjektet.

**NTNU,** Institutt for Biologi (Taskforce Lakselus) har hatt ansvar for innsamling av prøvemateriale, og klekking av lakselus for å få luselarver for analyse. Sentrale medarbeidere har vært Cecilie Miljeteig og Anna S. Båtnes.

**NMBU:** NMBU-MINA har hatt ansvaret for arbeidet med å optimalisere metoder med mål å kunne analysere grunnstoffsammensetning i enkeltindivid av lakseluslarver. Hans-Christin Teien og Karl Andreas Jensen har deltatt fra NMBU-MINA.

Alle prosjektpartnere har vært aktive i planlegging av prosjektgjennomføringen, og vurdering av resultater og egnethet av metoder som har blitt testet i prosjektet.

Prosjektet var delt i seks arbeidspakker som vist nedenfor:

**Arbeidspakke 1: Prøveinnsamling og påfølgende klekking av eggstrenger**
Ansvarlig: NTNU
**Arbeidspakke 2: Optimalisering av lipidanalyser for analyser av enkeltlarver**
Ansvarlig: SINTEF Ocean
**Arbeidspakke 3: Optimalisering av grunnstoffsammensetning/isotopanalyser for analyse av enkeltlarver**.
Ansvarlig: NMBU
**Arbeidspakke 4: Fremskaffe informasjon om variasjon i og robusthet av mulige sporingskomponenter**
Ansvarlig: SINTEF Ocean
**Arbeidspakke 5: Prosjektledelse og formidling**
Ansvarlig: SINTEF Ocean

# 3 Problemstilling og formål

## 3.1 Betydning for næringen

Forekomst og bekjempelse av lakselus er en av de største utfordringene for havbruksnæringen. Utvikling av en pålitelig metode for å bestemme opprinnelse på lakselus vil gi verdifull kunnskap for å forstå mekanismer bak spredning av lakselus, og for å kunne validere og forbedre spredningsmodeller, noe som vil være viktig for å sette inn riktige tiltak for å forhindre og bekjempe lusespredningen. Å skille larver fra hunnlus som har sittet på hhv oppdretts- og villfisk vil kunne gjøres ved å analyser ulike kjemiske sporingsmarkører i larvene.

I prosjektet har man bygget videre på eksisterende kunnskap om mulige sporingskomponenter som kan skille mellom lakseluslarver fra hunnlus fra vill- og oppdrettsfisk. Det er vurdert at grunnstoffanalyser har størst potensiale på grunn av muligheten for å analysere enkeltindivid, samtidig som at resultatene viser forskjell mellom grunnstoff-forhold i prøver fra vill- og oppdrettsopprinnelse. Et videre steg vil være å teste ut metoden slik den er tenkt brukt i felt, studere stabiliteten, og opparbeide en database på variasjon. Metodikken vil være et viktig hjelpemiddel i FoU prosjekter hvor man vil verifisere eller forbedre spredningsmodeller. En annen mulig anvendelse er at man i forsøk kan tilsette spesifikke sporgrunnstoff/tracere til fôret til oppdrettsfisk hvis det har stor overføringsgrad til lus og slik kan brukes til sporing av vertsfisk. En robust metode for å spore opprinnelse til lakseluslarver vil kunne ha stor nytteverdi både for industri, forskning og forvaltning. Prosjektet har også fremskaffet data og analysemetodikk som vil kunne ha nytteverdi for næringen i andre sammenhenger.

## 3.2 Prosjektmål

**Hovedmål**
Å fremskaffe metodikk for sporing av opphav for enkeltlarver av lakselus.

**Delmål**

1. Innsamling av prøver inkludert lakselus med egg, og klekking for å frembringe lakseluslarver for analyse
2. Optimalisering av lipidanalyser for analyser av enkeltlarver
3. Optimalisering av grunnstoffsammensetning/isotopanalyser for analyse av enkeltlarver
4. Fremskaffe informasjon om variasjon og robusthet av mulige sporingskomponenter

Prosjektet har hatt som innledende målsetning å evaluere om ulike metoder kan benyttes på individuelle lakseluslarver. Prosjekter omfatter optimalisering og ytterligere metodeutvikling fra resultatene fra 2012. Instrument/metoder med høyere sensitivitet vil benyttes for analyser av lipid – og sporgrunnstoffanalyser. Man vil fremskaffe informasjon om variasjon og robusthet av markører som tillater analyser av enkeltindivid.

# 4 Prosjektgjennomføring

Siden det er sannsynlig at luselarver på en fisk kan stamme fra morlus med ulikt opphav, var utgangspunktet at det var ønskelig med analysemetoder for enkeltlarver av lus. I oppstarten av prosjektet ble det gjort en vurdering om man skulle undersøke lakseluslarvene i nauplius-stadiet (Nauplius II) eller copepodittstadiet. Det er nauplier man som oftest finner i vannmassene ved prøvetaking, mens det er copepodittene som fester seg på fisken. Erfaring fra tidligere arbeid med prøvetaking av lakseluslarver tilsier at nauplilarvene er mer sensitive for endringer i salinitet, som ved vasking for å fjerne salter fra sjøvann, og sprekker lett, noe

som kan føre til tap av materiale. Etter at det ble utført innledende tester som viste at copepodittene tålte vasking godt, ble det bestemt at det var copepoditter som var fokus i prosjektet, men at prøvetakingen skulle skje tidlig i copepodittstadiet (innen 1-2 dager etter skallskifte) for å ha høyest mulig lipidnivåer i larvene.

Copepoditter fra lakselus er små av størrelse, med en vekt på ca 2-6 µg. I prosjektet har man derfor innledningsvis hatt som mål å finne en markør som 1) kan analyseres i enkeltlarver uten behovet for å fastsette vekten og 2) er forskjellig for vill vs. oppdrettsopprinnelse (AP1-3). Man lyktes med å utvikle metodikk for å måle grunnstoffer i enkeltlarver, og bruke forholdstall mellom grunnstoff for å slippe å relatere grunnstoffinnholdet til massen av prøven, og det er gjort analyser av et bredere utvalg prøver (fiskemuskel, skinn, slim, morlus, larver) av ulike opprinnelser for å få informasjon om variasjon i og robusthet av forhold mellom grunnstoff til å spore opphav av lakseluslarver (AP4).

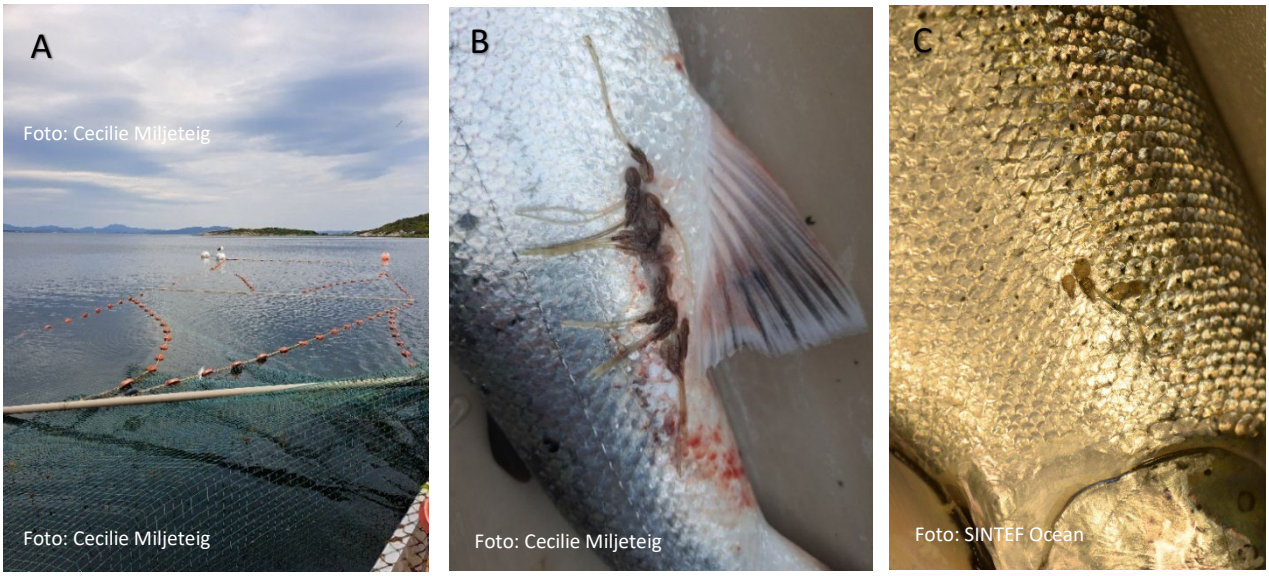
## 4.1 Innsamling av prøver

Innsamling av prøver ble utført i juni til november 2023. **Figur 1 og 2** viser bilder fra innsamlingen. Prøvemateriale fra villaks ble samlet inn fra kilenotfangst ved Agdenes (to innsamlinger; juni og august) og Namsfjorden (én innsamling). Det ble samlet inn prøvemateriale fra oppdrettslaks fra tre ulike oppdrettsanlegg i Produksjonsområde (PO) 6, samt at prøver til testing av metodikk for opparbeiding av prøver (copepodittprøver og lakselus i ulike stadier) ble tatt av overskuddsmateriale fra innsamling av lus i et annet prosjekt (også fra oppdrettsanlegg i PO6). Fagssted, fangsttid og lokaliteter ble gitt ulik ID slik det framkommer i prøveoversikten i **Tabell 1**. Som vist i **Figur 2** var det som forventet høy tetthet av lus på villfisken, og dermed muligheter å samle inn mange hunnlus med eggstrenger fra samme fisk, mens for oppdrettsfisken er tettheten av lus mye lavere. De fleste morlus samlet inn var dermed fra ulik fisk, men i noen få tilfeller ble det samlet inn to morlus fra samme oppdrettsfisk. Fiskeprøvene ble tatt fra fisk fra samme merd, men ikke nødvendigvis fra fisk som hadde kjønnsmoden lus. Av samme grunn har man ikke fiskeprøver fra oppdrettsfisk for alle morlus samlet inn.

Lakselus (som vist i **Figur 2B**) ble plukket av laks med pinsett og lagt i inkubatorrør med filtrert sjøvann for transport til NTNU Sealab (inkubatorrørene er vist i **Figur 3A**). Fiskeprøver (slim, skinn, muskel) ble tatt av inntil 3 fisk ved hver innsamling (**Figur 1B**). Ved kilenotfangst ved Agdenes og Namsfjorden merkes levedyktig laks og settes ut igjen. Prøvetaking av fiskeprøver var derfor begrenset til antall fisk som var død i not eller måtte avlives på grunn av fiskens tilstand. Fiskeprøver ble tatt ved å skrape slim av fisken med en engangsspatel (Spatel PP opak standard 210x7 mm, VWR) som ble overført til 1,5 ml eppendorfrør, og ta ut 2x2 cm skinn og 2x2x2 cm muskel fra like bak ryggfinnen (**Figur 1B**) med en steril engangsskalpell (Skalpellblad nr 11 og 21, VWR) og en steril engangspinsett (Pinsett PS 125mm steril, VWR). Det ble tatt to replikater av alle fiskeprøver. Det ble tatt tre vannprøver (50 ml sentrifugerør, VWR) i nærheten av kilenot eller oppdrettsanlegg på prøvetakingsdag. Ved oppdrettsanlegg ble det også tatt to fôrprøver (50 ml sentrifugerør, VWR). Vann og fôrprøver er oppbevart i fryser for eventuelle senere analyser.

Prøver av fisk, fôr og vann ble lagt i en portabel fryseboks (-20 °C) eller kjøleboks (~4 °C) før transport til NTNU Sealab, der prøvene ble overført til fryser (-80 °C) for oppbevaring.

**Figur 1. A**: Villaks med lakselus før prøvetaking. **B**: Prøvetaking av muskel, skinn og slim av villaks.

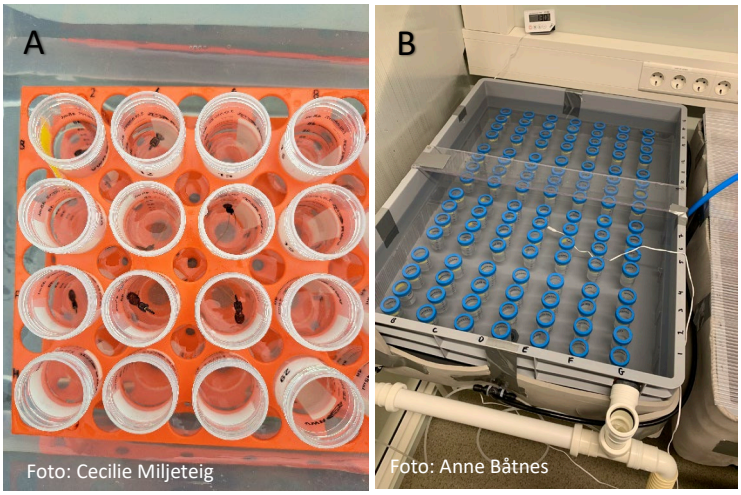



**Figur 2**. **A**: Kilenot ved Agdenes. **B**: Høy tetthet av voksne lakselushunner på villaks. **C**: Representativ bilde av lakselus på oppdrettslaks, hvor man vanligvis ikke finner flere voksne hunnlus på samme fisk

## 4.2 Klekking av eggstrenger og prøvetaking

Eggstrenger ble plukket forsiktig av kjønnsmodne hunnlus med en pinsett og lagt i inkubatorrør og plassert i klekkeri med gjennomstrømming ved Taskforce Lakselus sitt laboratorium ved NTNU SeaLab (**Figur 3**). Eggstrenger fra enkeltlus ble klekket i individuelle rør for å holde oversikt over opphav, og rørene ble sjekket daglig for klekking for å holde oversikt over larvenes alder for prøvetaking av copepodittstadiet. Klekkerioppsettet er beskrevet i Båtnes et al. (2024). Alle innsamlede parasittiske stadier av lakselus ble kort dyppet i ultrarent vann ved hjelp av pinsett for å fjerne salter fra sjøvannet som fulgte med prøvetakingen, og deretter lagt i 1,5 mL eppendorfrør og frosset ned (-80 °C) for senere analyser.

Prøvetaking av copepodittlarver ble utført innen 2 dager etter overgang til copepodittstadiet. Copepoditter i antall på n=1, 5, 20 og 100 ble talt opp i veieskip og overført med pipette (plast) til 1,5 ml eppendorfrør. Sjøvannet ble deretter pipettert ut, og ultrarent vann ble tilsatt for å fjerne salter fra prøven. Dette ble gjentatt 1-2 ganger og overskuddsvann ble pipettert ut til slutt. Prosedyren ble utført raskt (innen 2 min, i henhold til innledende tester) for å unngå at larvene «sprengtes» av det osmotiske trykket i ferskvann. Prøvene ble til slutt frosset ned (-80 °C). For prøvene samlet inn fra oppdrettsanlegg i november 2023 ble det brukt syrevaskede 1,5 ml eppendorfrør til copepodittprøver. For de øvrige prøveinnsamlingene ble det brukt uvaskede 1,5 ml eppendorfrør direkte fra produsent. Oversikt over innsamlet materiale er gitt i **Tabell 1.**




**Figur 3**. **A**: Inkubatorrør med kjønnsmodne hunnlus med eggstrenger for transport. Inkubatorrør med planktonduk i bunn benyttes for å sikre noe utskifting av vann under transport. **B**: Gjennomstrømmingsklekkeri med individuelle inkubatorrør.

**Tabell 1.** Oversikt over innsamlet materiale. En copepodittserie består av 10 stk prøver à 1 copepoditt, 5 stk prøver à 5 copepoditter, 5 stk prøver à 20 copepoditter og 3 stk prøver à 50 eller 100 copopoditter. Noen av seriene har færre prøver. Et sett fiskeprøver består av 2 stk prøver av slim, skinn og muskel.

| | | Villaks | | Oppdrettlaks | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Lokalitet | Agdenes | Agdenes | Namsfjorden | | | |
| ID | A1 | A2 | C1 | B1 | D1 | E1 |
| Tid for innsamling | Juni 2023 | August 2023 | August 2023 | Juni 2023 | Juni 2023 | November 2023 |
| Antall copepodittserier | 7 | 9 | 5 | 5 | 7 | 7* |
| Antall lakselus (AF, AM, preadult) | 31 | 36 | 12 | 17 | 21 | 25 |
| Antall fisk det ble samlet lakselus fra | 4 | 2 | 3 | 16 | 14 | 20 |
| Antall fisk det ble tatt fiskeprøver av | 1 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Vannprøver | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Fôrprøver | NA | NA | NA | 2 | 2 | 2 |

*I tillegg til copepodittserier ble det samlet inn 13 sett med 4-10 prøver av enkeltcopepoditter fra søskengrupper.

## 4.3 Frysetørking og forsendelse av prøver til ulike analyser

Prøver ble frysetørket hos SINTEF Ocean, og lagret ved -80 °C i påvente av analyser og forsendelser til de ulike analysene hos SINTEF og NMBU. Analyse av prøver fra innsamlingene vist **Tabell 1** ble gjort med de ulike analysemetodene for å kartlegge egnetheten av disse for å analysere enkeltlarver. Mer informasjon om prøver analysert er gitt i metodebeskrivelsene som følger.

## 4.4 Analyser av fettsyresammensetning ved GC FID

Hos SINTEF Ocean er det kjørt tilsvarende analyser som i 2013 (GC-FID etter direktemetylering) for å få oppdaterte data på fettsyresammensetning av lakseluscopepoditter.

**Bakgrunn**

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 utfordrende å ekstrahere ut så små mengder nøyaktig. Metoden som ble benyttet var som beskrevet i 2013,

en direkte trans-metyleringsprosedyre beskrevet av Abdulkadir og Tsuchiya (metylering av prøve direkte uten fettekstraksjon først). Metoden er benyttet på individuelle *Calanus finmarchicus* (raudåte) som beskrevet av Bergvik et. al. 2012, som fikk et høyere utbytte av fettsyrer ved direkte-metylering, noe som tydet på at denne metoden var mer effektiv for å ekstrahere ut fettsyrer fra *C. finmarchicus* (enn ved forgående ekstraksjon av fett).

**Prøver analysert**

Det er analysert copepodittprøver fra de seks innsamlingene. Ut ifra resultatene fra 2013 ble det valgt å fokusere på samleprøver innledningsvis for å få pålitelige resultater på fettsyresammensetning av luselarvene. Det ble analysert prøver både med n= 5, n=20 og n= 50 individer. Totalt er det rapportert resultater fra 36 prøver fra de seks opprinnelsene (noen av kromatogrammene hadde for dårlig kvalitet til å integreres og er dermed ikke rapportert). Antall prøver rapportert er minst 5 for alle opprinnelsene bortsett fra A2 hvor kun 3 av kromatogrammene var av god nok kvalitet til å integreres.

**Utførelse**

Innledningsvis ble copepodittprøvene frysetørket i eppendorfrør som de var samlet i. For å få de tørkede prøvene over i røret de skulle metyleres i ble det tilsatt 0,5 ml isooktan i eppendorføret. Isooktan med prøvene ble så pipettert over i et tett kimaxrør. For å unngå steget med overføring ble innsamlingen av copepoditter for den siste innsamlingen utført direkte i GC rør (prøver fra E1, se tabell 1). Det er likevel vurdert at senere analyser bør gjøres i kimaxrør med tette skrutopper. Det ble tilsatt 0,2 ml BF3-metanol, og rørene satt på varmeblokk ved 100 °C i 2 timer. Deretter ble prøvene avkjølt på is, tilsatt 0,1 ml isooktan og 0,2 ml destillert vann og ristet på vortex-rister i 1 min. For de største prøvene (50 copepoditter) ble det brukt 2 ganger 0,5 ml isooktan for å få ut alt. Her er det da brukt dobbel mengde av alle løsningene videre i prosedyren. Etter sentrifugering (1640 g, 3 min) ble den øvre issoktan-fasen tatt over i et annet rør, og dampet inn til alt fikk plass i det lille innerrøret i GC-glasset. For å sjekke at det ikke ble noen ekstra topper i kromotogrammet av å tilsette isooktan i eppendorfrørene ble prosedyren gjennomført på 2 tomme eppendorfrør.

De methylerte fettsyrene ble analysert på en Agilent Technologies 7890A gasskromatograf med FID (GC-FID) utstyrt med 7693 autosampler (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Detektortemperaturen ble holdt på 270 °C, og flammen ble opprettholdt med 25 mL/min H2-gass og 400 mL/min filtrert luft. Kromatografi ble utført ved hjelp av en Cp-wax 52CB, 25 m x 0,25 mm med id = 0,2 µm kolonne (del nr. CP7713, Agilent Technologies). Hydrogen ble brukt som bæregass med en strømningshastighet på 1,5 mL/min. GC-inngangene ble holdt på 250 °C. Den innledende ovnstemperaturen ble holdt på 80 °C og økt til 180 °C med 25 °C/min, etterfulgt av en 2 minutters holdetid, hvoretter temperaturen ble økt til 205 °C med 2,5 °C/min, etterfulgt av en 6 minutters holdetid, hvoretter temperaturen ble økt til 215 °C med 2,5 °C/min, etterfulgt av en 4 minutters endelig holdetid. Fettsyrer ble karakterisert ved sammenligning med retensjonstidene til kommersielle standarder og kvantifisert ved intern standard. Resultater er oppsummert ved bruk av Minitab Statistical software 22.

## 4.5 Analyser ved LC-MS/MS (lipidomics)

**Bakgrunn**

LC-MS er en mer sensitiv analysemetode enn tradisjonell GC-FID. I prosjektet har man benyttet en triple quadropole detektor (TQD), som har mindre oppløsning en HR-MS(MS) - men har fordelen ved at den har høyere sensitivitet (Chatterjee et al., 2019).

LC-MS/MS -metoden består av separasjon av lipidklasser ved væskekromatografi, før man ved ionisering og MS/MS – tilordner masser tilbake til spesifikke lipidforbindelser (molekyler) som var tilstede basert på molekylvekt (f.eks TAG: 48:0). Metoden har potensiale til å identifisere over 500 lipidforbindelser. Tilordningene vil være tentative siden det kan finnes flere forbindelser med samme masse. Metoden vil ikke være kvantitativ på de ulike forbindelsene uten at man kjører standarder- men det gir et fingeravtrykk av prøven og ved multivariat analyse kan man klassifisere prøver basert på eventuelle forskjeller i sammensetningen.

**Prøver analysert**

Prøver er analysert for å optimalisere betingelser, teste muligheten for opprinnelsestesting med 1 vs. 20 copepoditter, og til slutt ble et større datasett med 20 copepoditter kjørt for å verifisere resultater. I første runde ble det ekstrahert 3 paralleller av enkeltcopepoditter med to ulike metoder for å homogenisere/ekstrahere prøven, hhv ved bruk av Precellys-homogenisator (zirkoniumoksid-kuler) og metode med pistill, som beskrevet nedenfor. Dette ble gjort først for å fastsette om deteksjon av lipider er mulig på enkeltcopepoditter. I neste runde ble det ekstrahert 12 prøver, 6 prøver av enkeltcopoditter og 6 prøver av 20 copepoditter fordelt på de to ulike ekstraksjonsmetodene. Dette ble gjort for å etterprøve funn i første runde. De to innledende forsøkene viste at man for enkeltcopepoditter ikke fikk ekstrahert ut nok prøvemateriale ved bruk av pistill, da de hadde en profil som var lik kontrollprøvene. Videre ble det derfor fokusert på metoden hvor Precellys-homogenisator ble benyttet (med zirkoniumoksid-kuler). Det ble ekstrahert 12 prøver hvorav halvparten var fra villfisk og halvparten fra oppdrettsopprinnelse (hhv A1 og B1). Prøvesettet var fordelt på prøver av 1 eller 20 copepoditter. Etter denne runden var det fastsatt at LC-MS som metode ikke ville fungere som tiltenkt. For å sikre muligheter for publisering av studiene og for å ha grunnlag for å kunne si med sikkerhet at det var prøvemengde og ikke metode som var utfordringen ble en fjerde runde med 5, 20 og 50 copepoditter analysert.

**Utførelse**

*Metode med Precellys-homogenisator med zirkoniumoksid-kuler:*

Copepodittene ble overført ved hjelp av statisk elektrisitet med en pipettespiss til en 2mL bertin-tube og tilsatt 10 zirkoniumoksid-kuler og 600µL 1mM butyl hydroxytoluene (BHT) i CHCl3/MeOH (2:1, v/v). Homogenisert i 4 minutter ved hjelp av Precellys. Deretter ble prøvene satt i ultralydbad med is i 2 minutter. 300µL iskaldt MQ-vann ble tilsatt og prøvene vortexet i 2 minutter. For å oppnå godt faseskille, ble prøvene sentrifugert ved 2000rpm i 5 minutter ved 4 °C. Vannfasen på toppen ble fjernet og 400µl av den organiske fasen ble overført til 2mL mørke ampuller. Prøvene ble tørket under $N_2$ ved romtemperatur og rekonstituert i 20µL isopropanol for analyse.

*Metode med pistill (utført på is når mulig):*

Det ble tilsatt 600µL 1mM butyl hydroxy toluene (BHT) i CHCl3/MeOH (2:1, v/v) direkte i eppendorfrøret. En pistill (PP) ble brukt til å knuse copepoditten(e) mot veggene i eppendorfrøret. Deretter ble prøvene satt i ultralydbad med is i 2 minutter. 300µl iskaldt MQ-vann ble tilsatt og prøvene vortexet i 2 minutter. For å oppnå godt faseskille, ble prøvene sentrifugert ved 2000rpm i 5 minutter ved 4 °C. Vannfasen på toppen ble fjernet og 400µl av den organiske fasen ble overført til 2mL mørke vials. Prøvene ble tørket under N2 ved romtemperatur og rekonstituert i 20µL isopropanol for analyse.

Prøvene ble analysert på en Agilent 6470 trippel quadropol massespektrometer med en Infinity II 1260 væskekromatograf. Kolonne brukt er en CSH Acquity 100x2.1mm, 1.7µm kolonne fra Waters med mobilfaser (A) 0.1% FA i ACN/MQ-vann (4:6, v/v), (B) 0.1% FA i IPA/ACN (9:1. v/v) og (C) 0.1% FA i MQ-vann. Kolonneovn var satt til 45°C. En lineær gradient fra 70% til 3% mobilfase A til B med C som en gradient fra 1.5% til 5%, over 12.5 minutter med flow på 0.25mL/min. 5µL prøve ble injisert.

Resultater fra metoden blir gitt som targeted lipidomics med 557 komponenter (putativ- ikke verifisert): 19 fatty acids (FA), 31 lysophosphatidyl cholines (LPC), 85 phosphatidyl cholines (PC), 85 phosphatidyl ethanolamines (PE), 45 phosphatidyl inositols (PI), 62 phosphatidyl serines (PS), 117 sphingomyelins (SM), 2 sterols (ST) og 100 triacylglycerols (TAG). Disse blir detektert med bakgrunn i massespektre og fragmentering assosiert med de ulike typene forbindelser.

Med utgangspunkt i tidligere resultater hvor det er vist at ratioer mellom ulike fettsyrer kan differensiere mellom vill- og oppdrettsopphav på GC-FID med metylerte fettsyrer, ble det gjort et forsøk med metylerte standarder, og prøver for å se om LC-MS kan 1) Benytte metylerte prøver og 2) Om sensitiviteten er god nok til å kunne brukes på copepoditter av lakselus. Dette ble gjort etter modell av Eroshchenko et al. (2023) men med samme eluering som i lipidomicsmetoden. Data er analysert ved bruk av R.

## 4.6 Analyser av grunnstoffsammensetning

Det har blitt utført flere tester for å få informasjon om grunnstoffsammensetningen i copepoditter og om ApexQ - ICP-MS var tilstrekkelig sensitiv for å måle grunnstoffene i en enkelt copepoditt.
Copepodittene benyttet i testene ble behandlet som beskrevet i kapittel 2.3, og frysetørkede prøver ble sent fra SINTEF til NMBU, og lagret i romtemperatur frem til oppslutning.

**Bakgrunn:**
I prosjektet har det blitt benyttet en Mikro-autosampler, Apex Q forstøver, og en ICP-MS/MS Agilent 8900#100. En mikro-autosampler gjør det mulig å overføre svært små volum av prøvematriks til instrumentet. Prøven kan derfor prepareres i et 10-ganger mindre volum i forhold til en vanlig autosampler. Forstøvereffektiviteten til en Apex Q, for introduksjon av prøven til ICP-MS, er større enn 90%. En normal forstøver har en effektivitet på ca. 5%. En kombinasjon av mikro-autosampler og høy forstøvereffektivitet gjør at svært lave absoluttmengder fra prøven kan detekteres. Tradisjonelt rapporteres grunnstoff i konsentrasjon som vekt av grunnstoff pr vekt prøve. Når det er knyttet stor usikkerhet til bestemmelse av vekten av prøven, og grunnstoffinnholdt skal benyttes til sporing, så er det mer hensiktsmessig å oppgi forholdet mellom grunnstoff i en prøve. Forholdet av grunnstoff er ikke påvirket av prøvens vekt, og derav måling av vekten.

**Dekomponering:**
Syredekomponering ble benyttet for å gjøre det faste prøvematerialet om til en væske som kan måles ved ApexQ-ICP-MS. Gjennom prosjektet ble metoden for syredekomponering optimalisert. I starten av prosjektet ble syredekomponering utført som en totrinns oppslutning. Konsentrert ultrapure $HNO_3$ ble tilsatt prøve av copepoditter som deretter ble varmet opp til 80 ˚C før inndamping til tørt. Etter inndamping ble prøvene løst i ultrapure $HNO_3$ på nytt med lokket på ved 80 ˚C før fortynnet til 10 volum % med ultrarent vann (Type I- vann) med 1 µg In/L som internstandard. Oppslutning ble utført direkte i eppendorfrøret tilsendt fra NTNU/SINTEF (for å hindre kontaminering med overføring til andre beholdere) og tilsvarende tilsetning med syre før oppvarming ble utført i minst 5 parallelle eppendorfrør uten copepoditter som kontroll.

De innledende analyseresultatene antydet godt målbare konsentrasjoner av flere grunnstoff i kontrollprøvene med den svært følsomme analysemetoden. Metoden ble derfor ytterligere optimalisert for å redusere mulig kontaminering.

Eppedorfrør ble syrevasket fordi resultater antydet utlekking av grunnstoffer fra plasten. 100 µl ultrapure $HNO_3$ ble tilsatt nye eppendorfrør som deretter ble varmet opp til 80 ˚C med lokket på i 3 timer. Etter inndamping ble rørene skyldt med ultrarent vann (Type I vann) tre ganger.

Syrevasket og frysetørket eppendorfør ble send til NTNU for prøvetaking av copepoditter direkte i rørene. Dette ble gjort tilknyttet prøveutaket i desember 2023. For copepoditter som allerede var prøvetatt i nye, men ikke syrevaskede eppendorfrør, ble copepoditter overørt til syrevaskede ependorfrør på NMBU. Overføring ble utført ved å tilsette ultrarent vann (Type I vann) i eppendorfrøret og overføre copepoditt med pipette. Copepoditter i syrevaskede eppendorfrør ble frysetørket før videre dekomponering.

Dekomponering ble utført lukket som en entrinnsoppslutning. Ultrapure $HNO_3$ ble tilsatt syrevasket eppendorfrør med copepoditter som deretter ble varmet opp til 80 ˚C med lokket på i 3 timer. Etter avkjøling ble prøvene fortynnet til 10 volume % $HNO_3$ med ultrarent vann (Type I vann) tilsatt In som internstandard og 0.5% ultrapure $HNO_3$.

Volum til dekomponering:

- 1 til 50 copepoditter ble dekomponert med 30µl Ultrapure $HNO_3$ og tilsatt 270 µl 0.5% ultrapure $HNO_3$ med 1.11 µg In/L internstandard. Totalt volum 300 µl.
- 100 copepoditter, morlus og slim av fisk ble dekomponert med 100 µl Ultrapure $HNO_3$ og tilsatt 900 µl 0.5% ultrapure $HNO_3$ med 1.11 µg In/L internstandard. Totalt volum 1 ml.

Prøver av skinn og muskel av fisk ble dekomponert ved bruk av UltraWave. Ca 1 gram med prøve (muskel eller skinn) ble overført til syrevaskede teflonrør før tilsetning av 5 ml ultrapure $HNO_3$ og dekomponering ved UltraWave. Etter dekomponering ble prøvene overført til syrevaskede 50 ml prøverør og fortynnet til 50 ml med ultrarent vann (Type I vann).

**Analyser:**
Prøver er analysert i fire runder for å optimalisere betingelser. I første runde ble det utført en screening av morlus og samleprøver av copepoditter for å identifisere hvilke grunnstoff som en kunne forvente å måle i prøver av enkelt copepoditter. I andre runde ble ApexQ-ICP-MS optimalisert med kun oksygen gassmodus for å måle på et lite prøvevolum, totalt 300 µl, og benyttet til å måle prøver av enkelt copepoditter med opprinnelse fra både villfisk og oppdrettsfisk. I tredje runde ble prøvebehandlingen optimalisert for å redusere kontaminering. Prøvebeholdere ble syrevasket før dekomponering og analyse, samtidig ble prøver kun dekomponert lukket en gang da dette viste seg å være tilstrekkelig og ApexQ-ICP-MC flushet lenge med en svak syreløsning for vask før analyse. I fjerde runde ble optimalisert metode benyttet til å screene en rekke prøver av enkelt copepoditter fra ulike oppdrettsfisk og villfisk. Samtidig ble morlus og vevsprøver av fisk dekomponert og målt med samme metode (Mikro-autosampler - ApexQ-ICP-MS) for å identifisere sammenhengen mellom prøver av fisk, morlus og copepoditter. Vevsprøver av fisk ble deretter også målt med ICP-MS i mindre fortynnede løsninger for sammenligning.

Resultater er analysert ved bruk av Minitab Statistical software 22.

# 5 Resultater og diskusjon

## 5.1 Vurdering av innsamlet referansemateriale

I prosjektet har man analysert referanseprøver av fiskevev og lus fra et omfattende prøvemateriale samlet inn fra vill- og oppdrettsopprinnelse som vist i tabell 1. Hovedfokus har vært å analysere lus i copepodittstadiet, og referanseprøvene av copepoditter ble produsert ved klekking av eggstrenger fra voksne hunnlus samlet inn fra hhv vill og oppdrettsfisk. Voksne hunnlus med eggstrenger har vært på vertsfisken over lengre tid (Hamre et al., 2019), og den er mangedoblet i størrelse basert på næring fra vertsfisken. Det er derfor overveiende sannsynlig at sporingsmarkørene (lipid/grunnstoff) i all hovedsak vil gjenspeile vertsfisken som morlus satt på. Det vil si at fingeravtrykk fra vertsfisken til luselarven ikke er vurdert å ha noe vesentlig innvirkning på fingeravtrykket til den voksne hunnlusa eller på eggstrenger eller larver fra denne.

Referansematerialet fra vill- og oppdrettsopprinnelse vil imidlertid ha noe ulike karakteristikker for variasjon. Villfisken vil kunne ha stor variasjon i miljø og diett selv om de er fangstet i samme kilenot, mens oppdrettsfisken vil ha svært like betingelser (samme merd, samme fôr, etc.) og dermed mindre variasjon mellom individuelle laks mhp lipid- og grunnstoffinnhold.

For villfisk er det klekket 1-6 hunnlus med eggstrenger fra samme fisk, mens for oppdrettsfisken var det bare mulig å samle inn 1-2 morlus per fisk fordi tettheten av lus mye lavere (maksgrensen for lus i oppdrett varierer mellom 0.5- 0.2 voksne hunnlus i gjennomsnitt pr fisk). De fleste morlus samlet inn var dermed fra ulik fisk for oppdrettsfisken. På grunn av at man ikke forventer vesentlig variasjon mellom individuelle fisk fra samme merd, behandles luselarvene fra oppdrett som grupper ut fra lokalitet (B1, D1, E1). For villfisken er resultatene også gruppert i forhold til fangsttidspunkt og fangststed (A1, A2, C1), men disse fiskene er forventet å ha større variasjon i miljø og diett, og dermed også i lipid- og grunnstoffsammensetning.

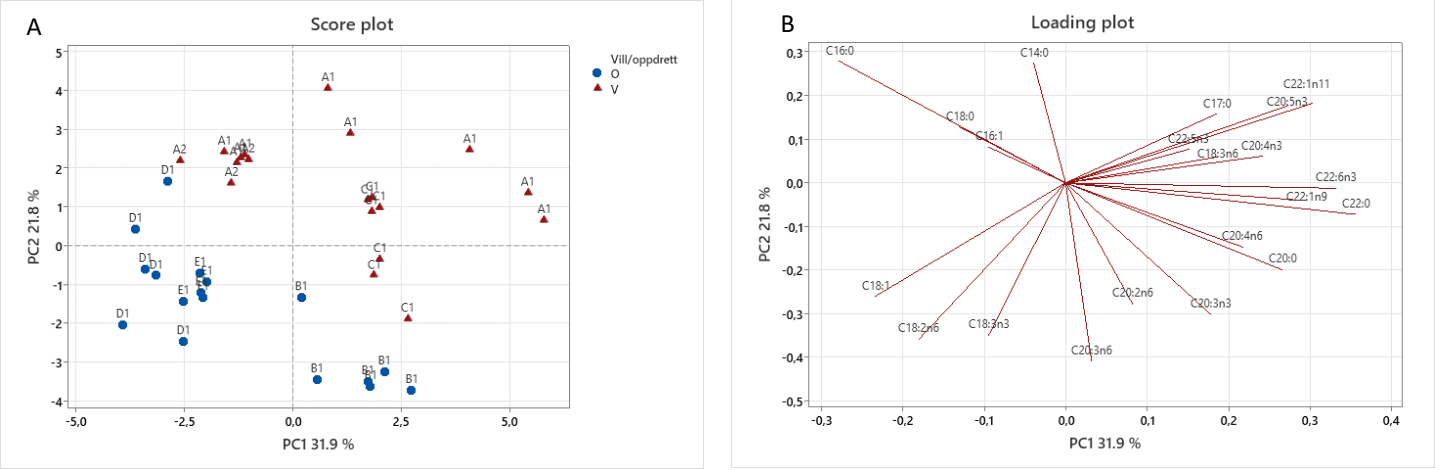
## 5.2 Resultater fra fettsyreanalyser ved GC-FID

Resultatene fra 2013 viste at fettsyresammensetningen i copepoditter varierer ut fra om morlus satt på en villfisk eller oppdrettsfisk, men at det var vanskelig å få pålitelige resultater på enkeltindivider. Selv om det ikke er tilkommet ny metodikk for å analysere fettsyresammensetning ved GC-FID siden den gang, ble det gjort analyser av prøvene i SPORLUS prosjektet for å vurdere om man ser tilsvarende forskjell mellom vill og oppdrett nå, eller om det har vært vesentlige endringer i fettsyresammensetning. Info om fettsyresammensetning er også nyttig for å tolke resultater fra lipidomicsanalysene.

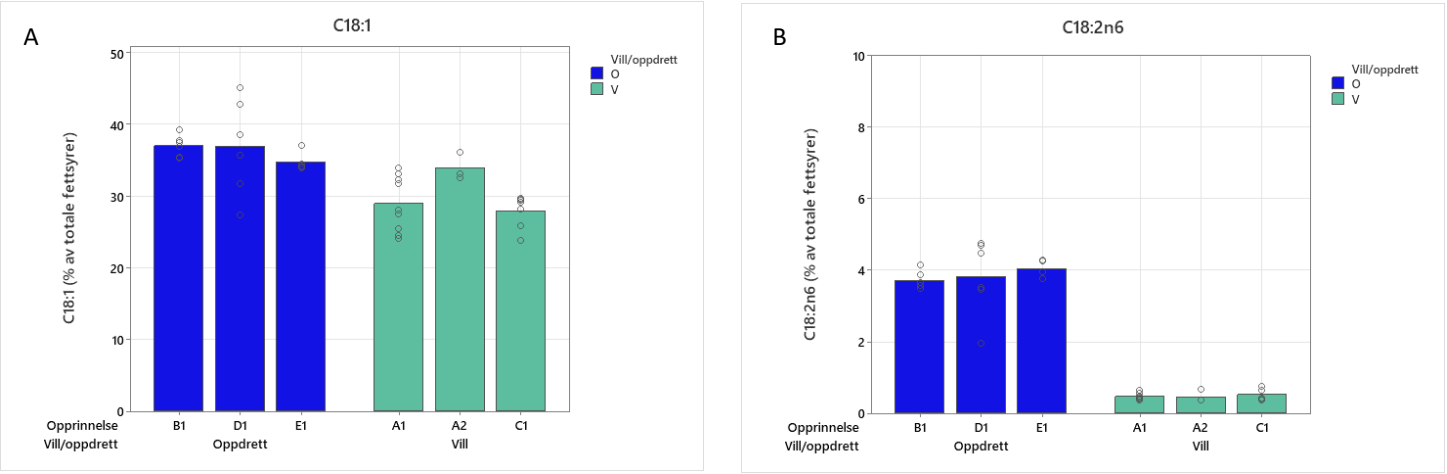
Resultater fra prinsipalkomponentanalyse (PCA) av fettsyresammensetning i samleprøver av n=5, 20 og 50 copepoditter viser tydelig separering mellom vill – og oppdrettsopprinnelse (**Figur 4**)**.** Ut fra loadings-plottet er posisjoneringen av luselarver fra oppdrettsopprinnelse bestemt ut fra innhold av typiske vegetabilske fettsyrer som C18:1, C18:2n-6, og C18:3n-3, mens posisjoneringen av lus fra villfiskopprinnelse blant annet er bestemt ut fra fettsyren C22:1n-11. Man kan også se en viss gruppering av prøvene ut fra de ulike oppdrettsanleggene, anlegg D1 og E1 har benyttet fôr fra samme fôrprodusent og grupperes nærmere hverandre enn prøver fra anlegg B1.

Innhold av disse fettsyrene for de ulike gruppene av oppdrett- og villfiskopprinnelse er vist i **Figur 5**. Copepoditter med oppdrettsopprinnelse har tydelig høyere innhold av C18:2n-6 enn de fra

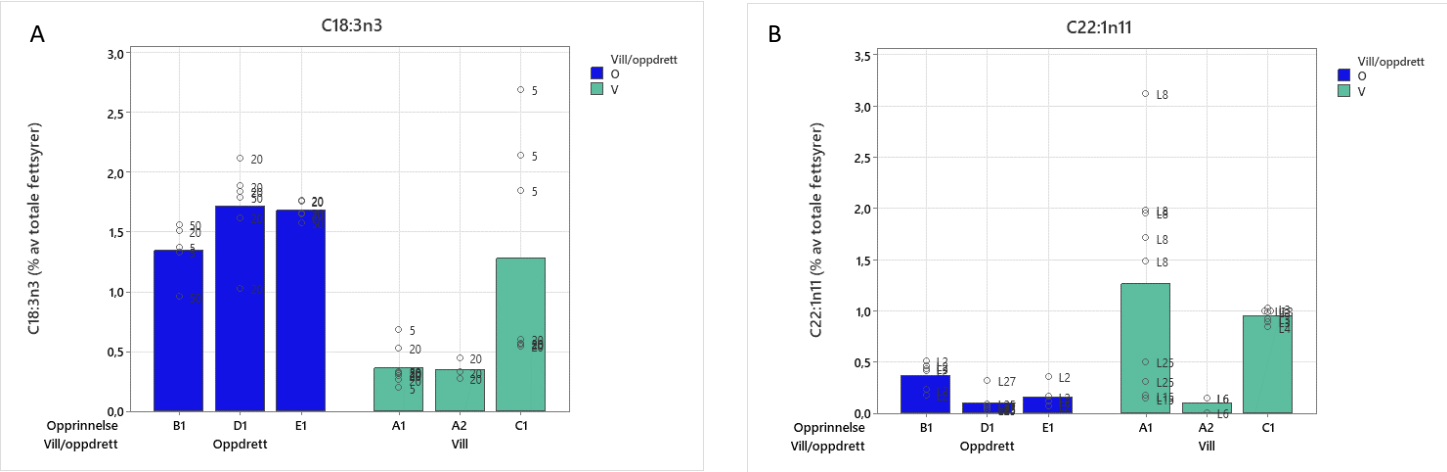
villfiskopprinnelse; luselarver fra oppdrettsopprinnelse hadde et gjennomsnittlig C18:2n-6 innhold på 3.7 – 4 %, mens luselarver fra villfiskopprinnelse hadde et innhold på ca 0.5 %. Resultatene viser dermed samme trend som resultatene fra 2013 (Standal & Teien, 2013), selv om innholdet av C18:2n-6 er noe høyere i luselarver fra oppdrettsopprinnelse nå (målt til < 3 % i 2013). I en studie av lakselus plukket fra oppdrettslaks og villaks fangstet i Skottland i 1995 og 2009 (Tocher et al., 2010) ble det funnet at økt innhold av fettsyrene C18:2n-6 og C18:3n-3 var mest karakteristisk for høyere inklusjon av vegetabilske fôringredienser i denne perioden. I samme studie ble innholdet av C18:2n-6 målt til 2.2 % i lus på oppdrettslaks, og 0.3-0.4 % i lus fra villaks i 2009, mens det var mindre forskjeller i C18:3n-3 mellom vill- og oppdrett (hhv 0.2 og 0.5%) (Tocher et al., 2010). Når det gjelder fettsyren C18:3n-3 (**Figur 6**), så er det en trend at oppdrettsopprinnelse har høyere innhold enn larver fra villfiskopprinnelse, men det er større variasjon og ikke signifikant forskjell mellom vill og oppdrettsopprinnelse for alle gruppene. Spesielt sampleprøver på fem copepoditter fra C1 viser avvikende resultater for C18:3n-3, og enkelte av disse var også copepoditter fra samme morlus. På samme måte hadde de fleste prøvene fra villfisk høyere innhold av C22:1n-11 enn fra oppdrettsfisk, men det er også en del variasjon mellom prøver fra A1 "gruppen" av villfisk (**Figur 6**), men her kan variasjonen også delvis skyldes at luselarvene var fra ulik morlus som satt på ulike fisk. Som nevnt innledningsvis er det som forventet mer variasjon mellom lus samlet inn fra ulike villfisk fra samme fangststed/fangsttidspunkt, enn fra oppdrettsfisk fra samme merd.




**Figur 4**. Scores (**A**)- og loadings (**B**)-plot fra PCA analyse av data på fettsyresammensetning i samleprøver av n=5, 20 og 50 copepoditter fra vill og oppdrettsopprinnelse. Prøvene er også merket med opprinnelse som gitt i Tabell 1.




**Figur 5**. Innhold av fettsyrene C18:1 (A) og C18:2n-6 (B) i copepoditter med ulikt opphav og hvor ulike samleprøver er analysert (hhv n=5, 20, og n= 50). Gjennomsnitt og individuelle datapunkt er gitt. Data er oppgitt som vekt % av totale fettsyrer.



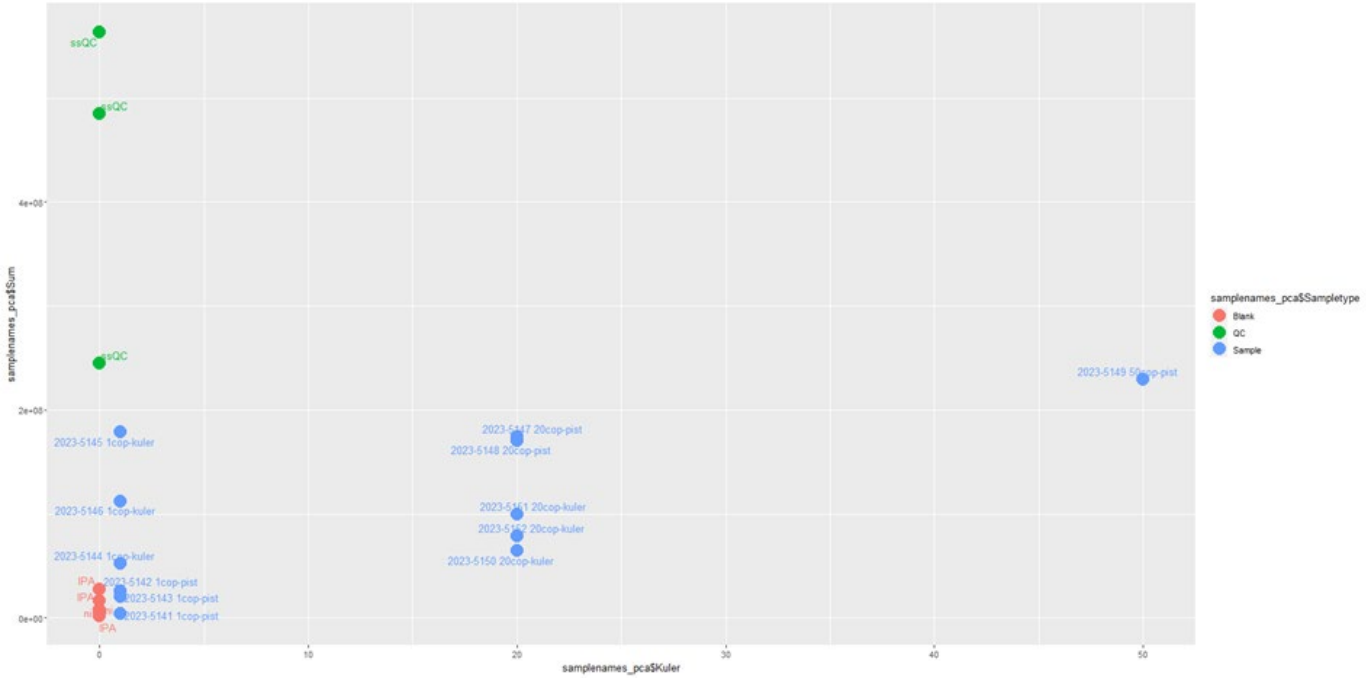

**Figur 6**. Innhold av fettsyrene C18:3n-3 (A) og C22:1n-11 (B) for samleprøver av copepoditter med ulikt opphav. Datapunktene er merket med antall individer i samleprøvene for C18:3n-2, og morlus for C22:1n-11. Data er oppgitt som vekt % av totale fettsyrer.

Som i 2013 ble det observert at enkelte kromatogrammer var av god kvalitet for sampleprøver av fem copepoditter. Men resultatene varierte, og enkelte kromatogrammer (for både sampleprøver med 5 og 20 copepoditter) hadde for lavt signal/støyforhold for å gi nøyaktig kvantifikasjon. Det var også stor variasjon i fettsyresammensetning mellom enkelte replikater (luselarver fra samme morlus) selv om kromatogrammene så ut til å ha god kvalitet, og det er usikkert hva årsaken er (se eksempler på kromatogrammer for n= 20 samleprøver fra samme morlus gitt i Vedlegg 1). Det er mulig at årsaken kan være at metyleringsgraden har variert, siden denne påvirkes av en rekke faktorer som type prøve, og lipidklasser (Perez-Palacios et al., 2022). Siden analysene ikke er vurdert relevant for enkeltindivider med det instrumentet som er tilgjengelig, har man ikke fokusert på videreutvikling og optimalisering av metodikken for fettsyresammensetning i dette prosjektet, men fokusert på analyser ved LC-MS/MS som er vurdert som en mer sensitiv metodikk (se kapittel 5.2).

**Konklusjon om egnetheten for fettsyresammensetning analysert ved GC-FID for å spore opphav av luselarver**: det er klare forskjeller i fettsyresammensetning mellom copepoditter fra vill- og oppdrettsopprinnelse når man analyserer samleprøver. Selv om flere kromatogrammer på samleprøver av fem copepoditter var av god kvalitet, kreves det ytterligere metodeutvikling for å få mer stabile resultater for denne prøvemengden. Man lyktes ikke i prosjektet å få pålitelige analyser av enkeltindivider, prøvemengden er vurdert å være for lav.

## 5.3 Resultater fra lipidomicsanalysene

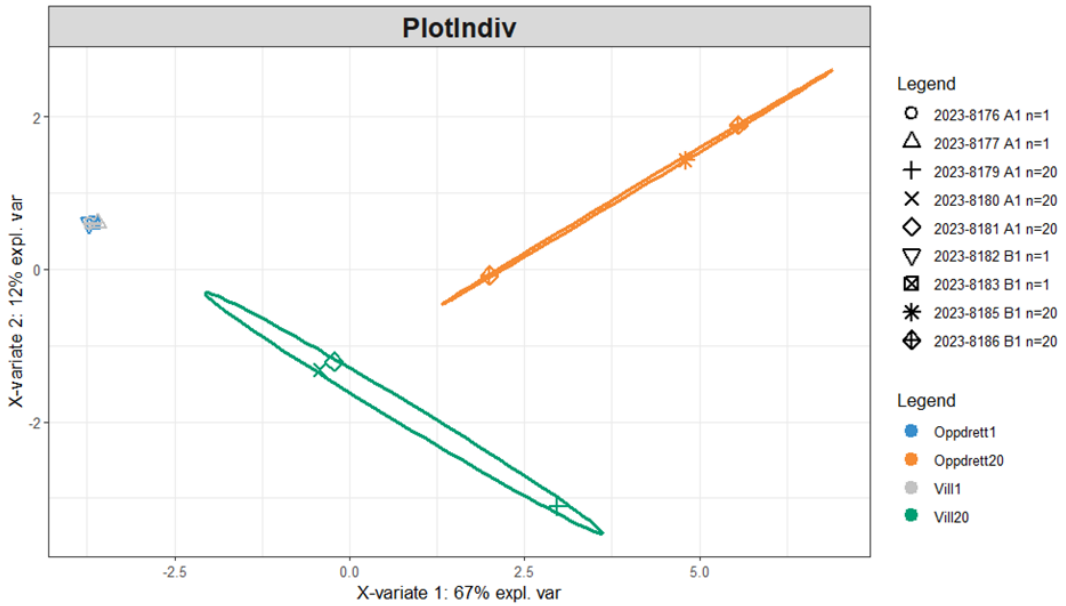
I de innledende testene som var planlagt for å optimalisere betingelsene og teste metoder for ekstraksjon ble det først sett på om signalintensiteten i kromatogrammene fulgte en forventet økende respons som funksjon av antall copepoditter. Massespektrometri er ikke iboende kvantitativt, så en direkte lineær sammenheng var ikke nødvendigvis forventet, men som **Figur 7** viser øker den totalt detekterte mengden lipider med antall copepoditter i prøvene. Videre viser **Figur 7** at det for prøver med 1 copepoditt ser ut som at intensiteten for "kuler" er høyere enn for "pistill" er forskjellig ("kuler" viser til at Precellysmetoden er benyttet for homogenisering). Og videre at det for pistill ikke var stor forskjell mellom blank (IPA) og prøver. For Precellysmetoden ("kuler") var det større variasjon mellom totalintensiteten i prøvene, og for samleprøver av 20 copepoditter var det som forventet en større gjennomsnittlig intensitet enn for prøver med 1 copepoditt. Resultatene viser imidlertid at pistill hadde høyere intensitet enn Precellys for samleprøver av 20 copepoditter, dette er motsatt av resultatene for 1 copepoditt.




**Figur 7.** Totalsum av intensiteten i prøvene som ble analysert innledningsvis som funksjon av antall copepoditter i prøven. PrøveID viser informasjon om antall copepoditter, og homogeniseringsmetode (hhv kuler eller pistill). IPA = blank, ssQC = prøve for kvalitetskontroll (her ekstrakter fra lakseegg).

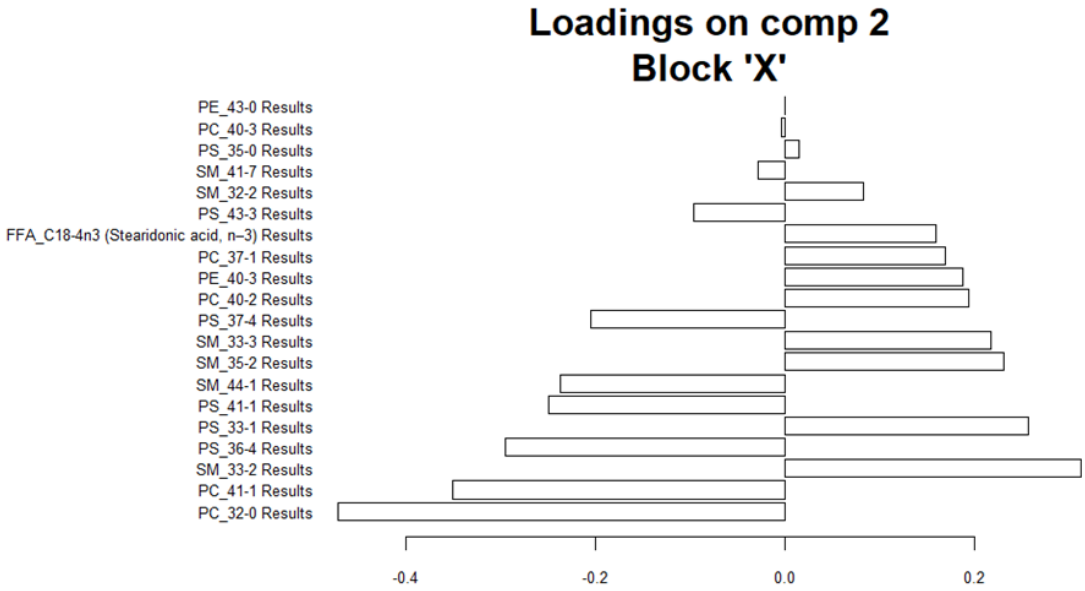
Det ble gjort en prinsipalkomponentanalyse (PCA) av disse dataene som viste at det var forskjell mellom prøver med 1 og 20 copepoditter, men ingen forskjeller mellom vill- og oppdrettsopprinnelse (resultater ikke vist). Med 500 variabler og få prøver med lite signal oppstod det en bekymring for at inndata til analysen i hovedsak bestod av støy. En partial least squares disciminant analyse (PLS-DA) ble så gjort for lipidene som hadde de 20 høyeste intensitetene for å se på data som er minst sårbare for støy. Resultatene viser at

separasjonen ble bedre mellom gruppene for 20 copepoditter, mens det for prøver av 1 copepoditt ikke ble observert separasjon mellom vill og oppdrett (**Figur 8**).



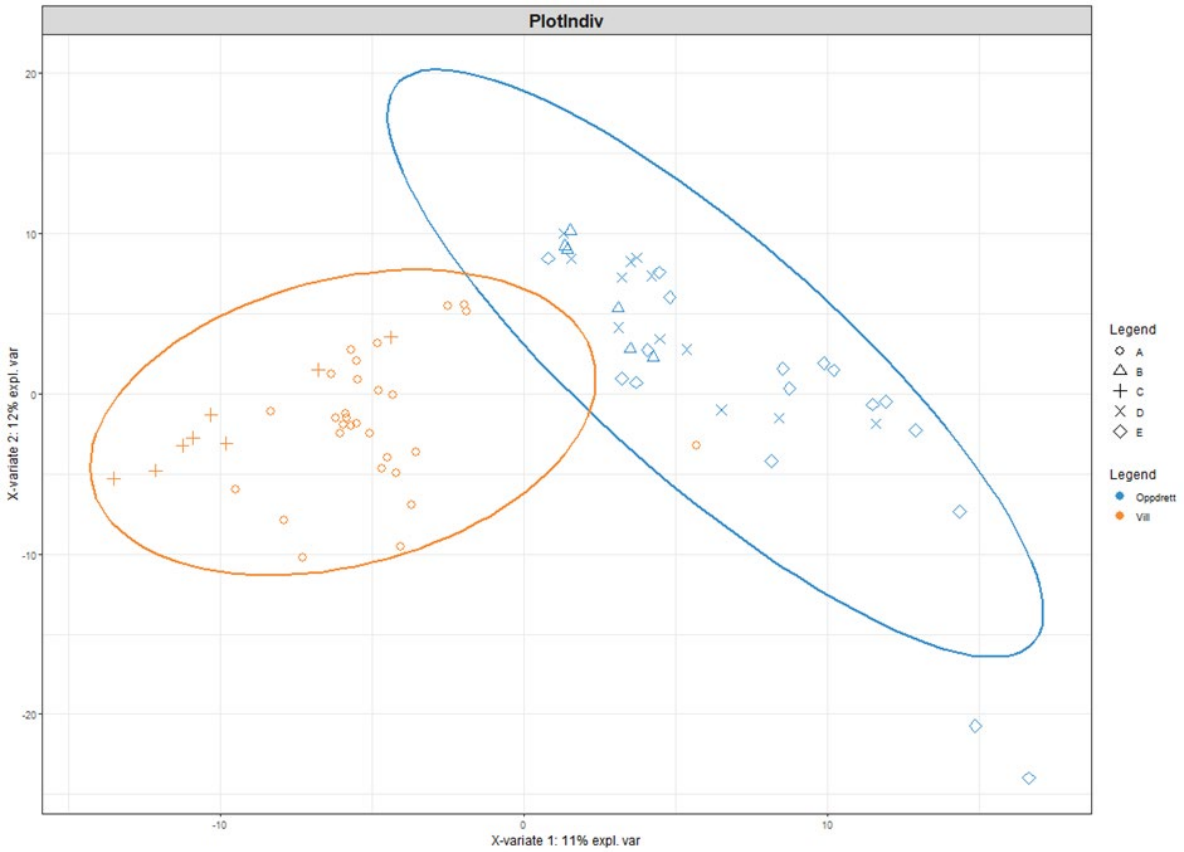

**Figur 8.** PLS-DA scores for analyse av 20 lipider med høyest intensitet i prøver av copepoditter fra lakselus fra morlus som satt på vill eller oppdrettsfisk, fra hhv opprinnelse A1 og B1 (se Tabell 1). Prøver av enkeltlus og samleprøver på 20 copepoditter er analysert.

For PLS-DA analysen er de latente, forklarende variablene for loading 2 vist i **Figur 9**. Disse viser hvordan de 20 lipidene med høyest forekomst i prøvematerialet separerer prøver basert på opphav, dvs "Oppdrett" eller "Vill". Her er det bidrag til forskjellene fra lipidklassene phosphatidyl ethanolamine (PE), phosphatidyl choline (PC), phosphatidyl serine (PS), sphingomyelin (SP) og C18:4n-3 som fri fettsyre (positive bidrag til loading 2 er knyttet til prøver av oppdrettsopprinnelse). Det oppstod behov for å inkludere flere prøver for å kunne teste robustheten til denne analysen, siden metoder som PCA og LCA generelt krever flere prøver enn variabler for å få gode data.

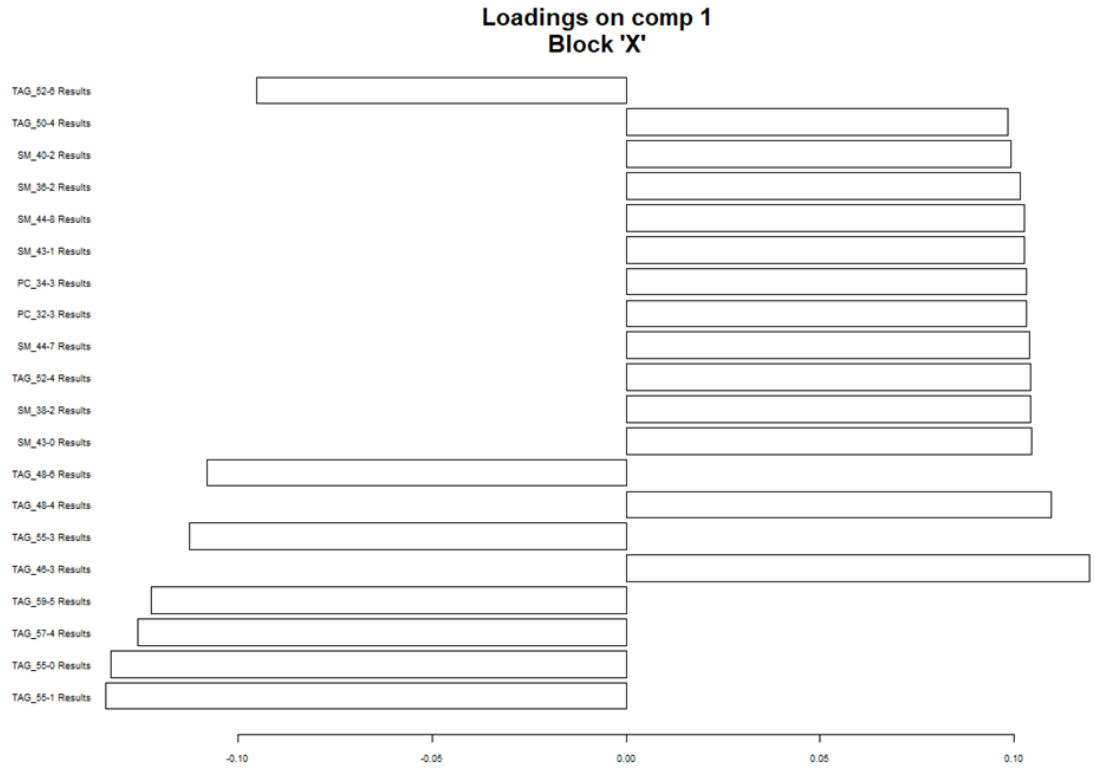



**Figur 9.** Forklarende variabler for loading 2 fra PLS-DA analysene i **Figur 8.** Ut fra denne analysen er det komponenter som PE, PC, PS, SM og fri fettsyre C18:4n-3 som bidra til gruppering av oppdretts- og villfiskopprinnelse.

For å teste robusthet for lipidomicsmetoden med copepoditter (og utelukke at det var andre faktorer en prøvemengde som var årsak til at man ikke fikk gode resultater på enkeltindivider) ble det analysert et bredere antall samleprøver med 20 copepoditter. Homogenisering/ekstrahering ble gjort ved bruk av kuler (Precellys) slik standard prosedyre er (Malzahn et al., 2022). PLS-DA av dataene viste en god og robust separasjon mellom vill og oppdrett uavhengig av anlegg/stasjon/tidspunkt (**Figur 10**). Ved analysene av samleprøver av 20 copepoditter og med et stort antall prøver viste de forklarende variablene et annet mønster enn for de foregående prøvene (**Figur 11**). I analysene gjort av 1 og 20 copepoditter sammen i runden før var det av variasjon mellom PC, SM, PE og PS som stod for forskjellene, mens for den nye analysen med et større datasett med samleprøver av 20 copepoditter var det en dominans av TAG samt SM og PC. Det er kjent at lagringslipider som TAG påvirkes av dietten, og det er derfor som forventet at flere av variablene som er karakteristisk for vill- eller oppdrettsopprinnelse er ulike TAG-forbindelser.




**Figur 10**. PLS-DA scores for lipidomicsanalyser av samleprøver med 20 copepoditter.




**Figur 11.** Forklarende variabler for loading 1 for PLS-DA analysen fra **Figur 10**. I denne analysen er det ulike TAG-, - SM- og PC forbindelser som bidrar til gruppering basert på oppdretts- eller villfiskopprinnelse. (variabler med positive bidrag til loading 1 er knyttet til oppdrettsopprinnelse).

I prosjektet ble det også gjort forsøk på å analysere metylestere av fettsyrer etter metode fra Eroshchenko et al (2023). Årsaken til at man ønsket å teste ut denne metoden var at metylerte fettsyrer er vurdert som tilstrekkelig karakteristisk for å skille vill/og oppdrettsopprinnelse. Men etter å ha analysert metylerte standarder og prøver med 1 og 20 copepoditter oppnådde man ingen brukbare resultater. Her syntes sensitiviteten og stabiliteten på metoden å være bedre på GC-FID. Videre arbeid med denne metodikken ble derfor avsluttet.

**Diskusjon**

Dataene fra lipidomics representerer en grundig gjennomgang av metodens muligheter og begrensinger for opprinnelsestesting for lakselus. Fordelene med metoden er at den gir tilgang til en variert og detaljert lipidsammensetning som i disse studiene er basert på putative tilordninger. Ved etablering av en operativ metode vil disse kunne brukes til å etablere en kvantitativ profil av lusene. Det som teller negativt for metoden (noe som er vist tydelig gjennom forsøkene som er gjort) er relatert til sensitivitet. Det var ikke mulig å skille signal i prøver fra enkeltcopepoditter fra støy i blankprøver og i så måte svarer ikke metoden ut bruk på enkeltcopepoditter. Videre ser vi at forklarende variabler varierer mellom seriene og disse forskjellene må kvitteres ut ved eventuell bruk av metoden. Forsøkene som er gjort gir et godt grunnlag for publisering – spesielt etter siste kjøring med et stort antall copepoditter.

**Konklusjon: lipidomicsanalysene** viser også at sammensetning av fett er en god markør for vill eller oppdrettsopprinnelse av samleprøver av copepoditter. Selv om lipidomics ved LC-MS generelt er en mer sensitiv analysemetode enn GC-FID var metoden som ble testet ut ikke sensitiv nok til å gi pålitelige resultater fra fettekstrakt fra enkeltlarver.

## 5.4 Resultater fra analyser av grunnstoffsammensetning

**Analyser av grunnstoff i copepoditter**

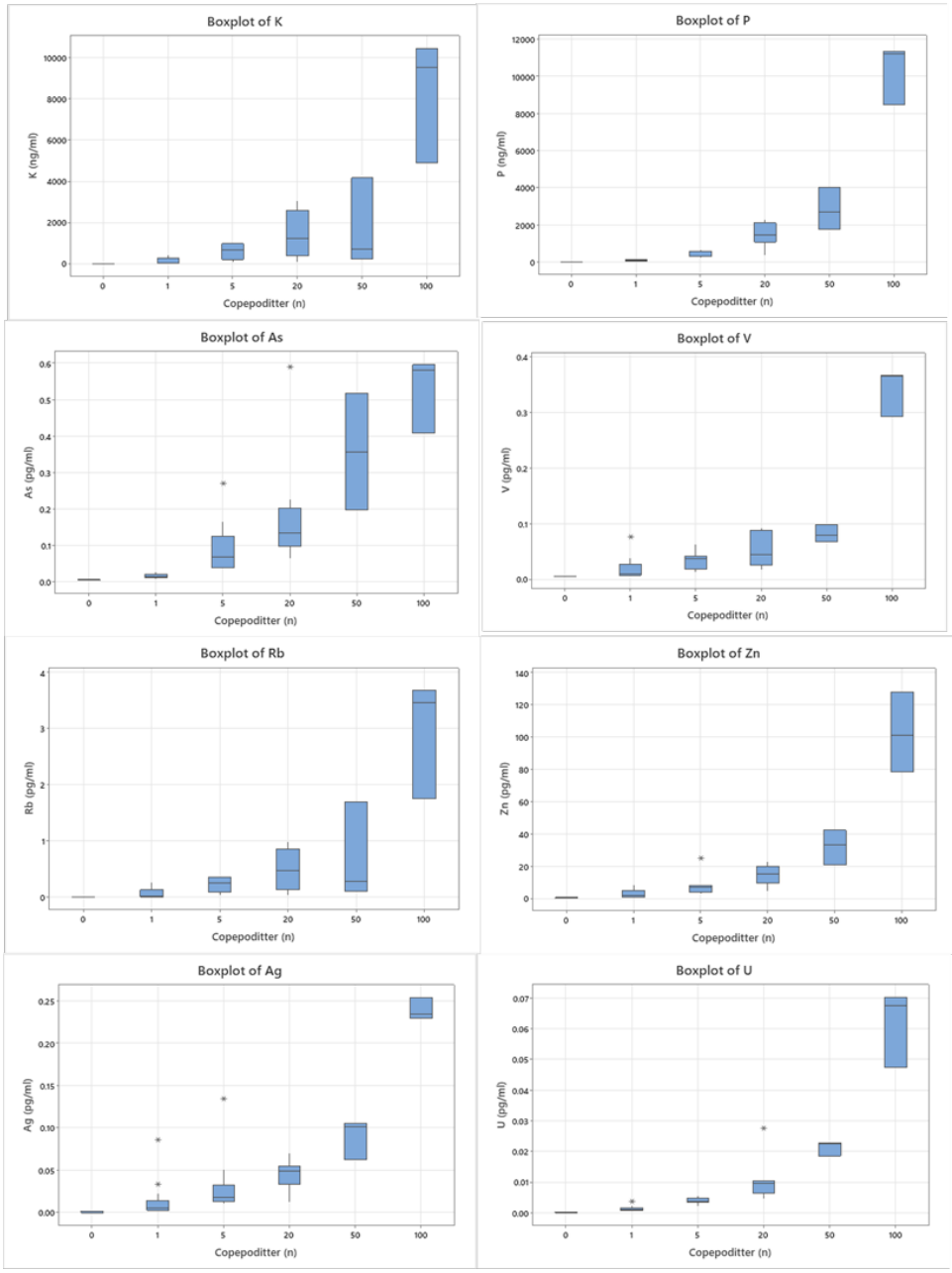
En lang rekke grunnstoff ble screenet i samleprøver av 100 copepoditter med ApexQ-ICP-MS med ulike gassmodus. Konsentrasjonen som ble målt var høyere enn bestemmelsesgrensen for 24 forskjellige grunnstoff når 100 copepoditter var dekomponert i 1.5 ml 5% syre. Basert på disse resultatene ble det beregnet at 8 grunnstoff ville ha målbare konsentrasjoner hvis 1 copepoditt ble dekomponert i 300 µl syre og at de fleste av disse grunnstoffene kunne måles med ApexQ-ICP-MS i oksygen gassmodus.

Analyser av 1 copepoditt dekomponert i 300 µl 10% $HNO_3$ viste at 10 grunnstoff var høyere enn deteksjonsgrensen (LOD) og bestemmelsesgrensen (LOQ), og slik kunne måles i 1 copepoditt (**Tabell 2**).

**Tabell 2.** Målt konsentrasjon i én copepoditt (N = 125) dekomponert i 300 µl 10% $HNO_3$

| Grunnstoff | 1 copepoditt (median) | 1 copepoditt (minst- størst) | LOD | LOQ |
|---|---|---|---|---|
| Mg (ng/ml) | 190 | 152 - 262 | 59 | 198 |
| P (ng/ml) | 95 | 71 - 124 | 6 | 1.9 |
| K (ng/ml) | 148 | 50 - 252 | 16 | 55 |
| Ca (ng/ml) | 60 | 27 - 124 | 20 | 66 |
| V (pg/ml) | 12 | 7 - 27 | 2.8 | 9.6 |
| Co (pg/ml) | 27 | 22 - 47 | 5 | 17 |
| Zn (ng/ml) | 2.4 | 1.2 – 3.6 | 1.5 | 4.8 |
| As (pg/ml) | 21 | 14 - 38 | 3.7 | 12 |
| Rb (pg/ml) | 56 | 22 - 111 | 10 | 34 |
| Sr (pg/ml) | 322 | 191 - 682 | 35 | 119 |
| Zr (pg/ml) | 61 | 53 - 113 | 4 | 14 |
| Cd (pg/ml) | 2.4 | 0.9 – 5.4 | 10 | 33 |
| Tl (pg/ml) | 1.7 | 1.1 – 4.4 | 0.12 | 0.4 |
| U (pg/ml) | 1.4 | 0.8 - 1.9 | 0.02 | 0.7 |

Konsentrasjonen av grunnstoff økte med økende antall copepoditter i prøvene (**Figur 12**), noe som viser at resultatene er gyldige også for de minste prøvemengdene.

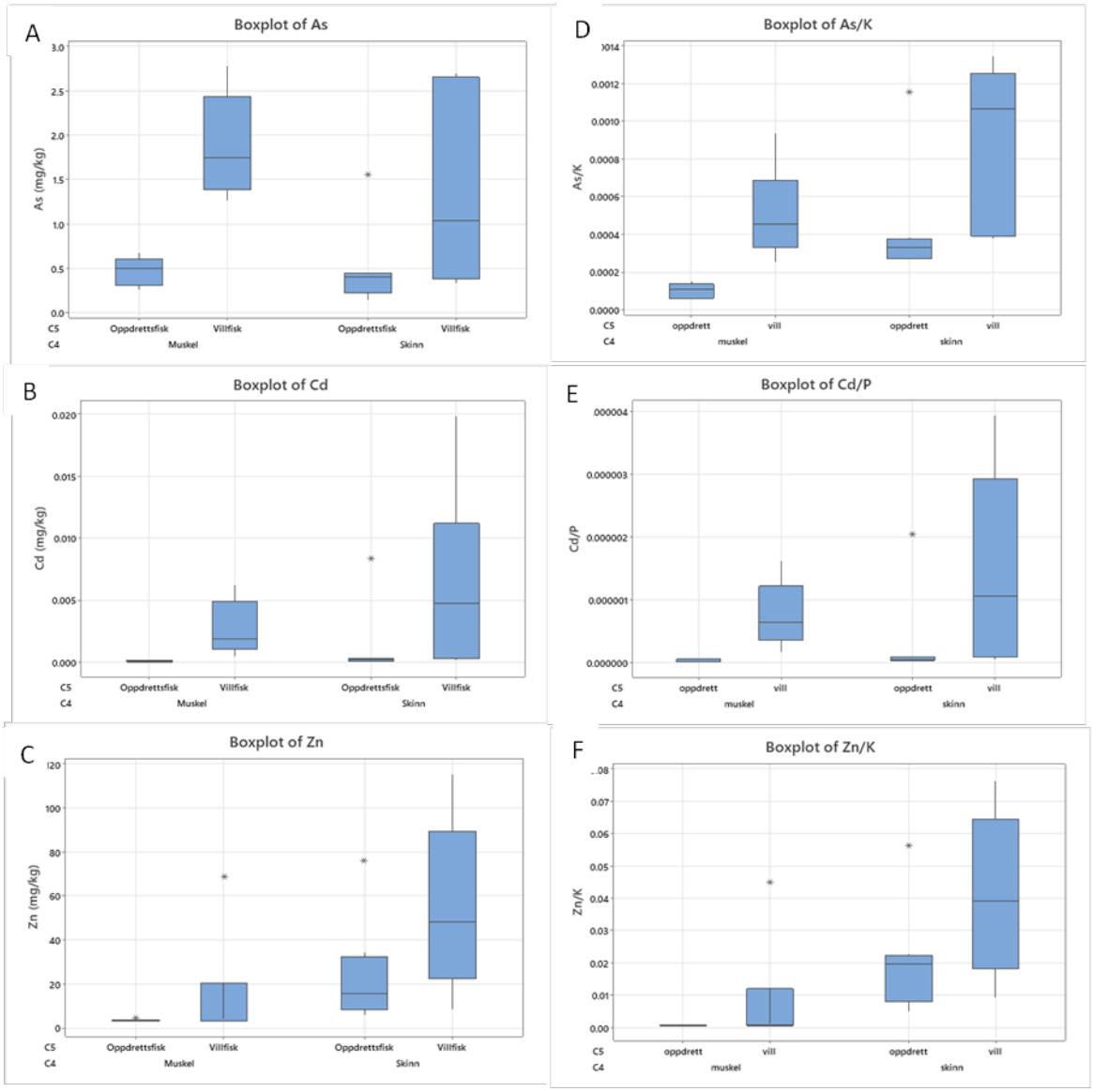



**Figur 12.** Målt konsentrasjon av grunnstoff i 300 µl prøve dekomponert med forskjellig antall copepoditter. Prøver er både fra villfisk og oppdrettsfisk. Medianverdi er synliggjort med svart strek og konfidensintervallet er indikert med blått felt.

**Forskjell i konsentrasjonen av grunnstoff mellom vevsprøver av villfisk og oppdrettsfisk**

Resultater fra analyser av fisk viser at det er forskjell i konsentrasjonen av flere grunnstoff i prøver fra oppdrettsfisk og villfisk (resultatene er oppsummert i tabellform i Vedlegg 2). Konsentrasjonen av enkelte grunnstoff som målt i copepoditter som eksempel As, Cd og Zn er høyere i både muskel og skinnprøver av villfisk i forhold til i oppdrettsfisk (**Figur 13 A-C),** mens konsentrasjonen av andre grunnstoff ikke er forskjellig i prøver av villfisk og oppdrettsfisk (som P, K, Mg, V). Konsentrasjonen av disse grunnstoffene er typisk korrelert med størrelsen på vevsprøver, eksempel P og K. Resultater viser at forholdstall mellom grunnstoff

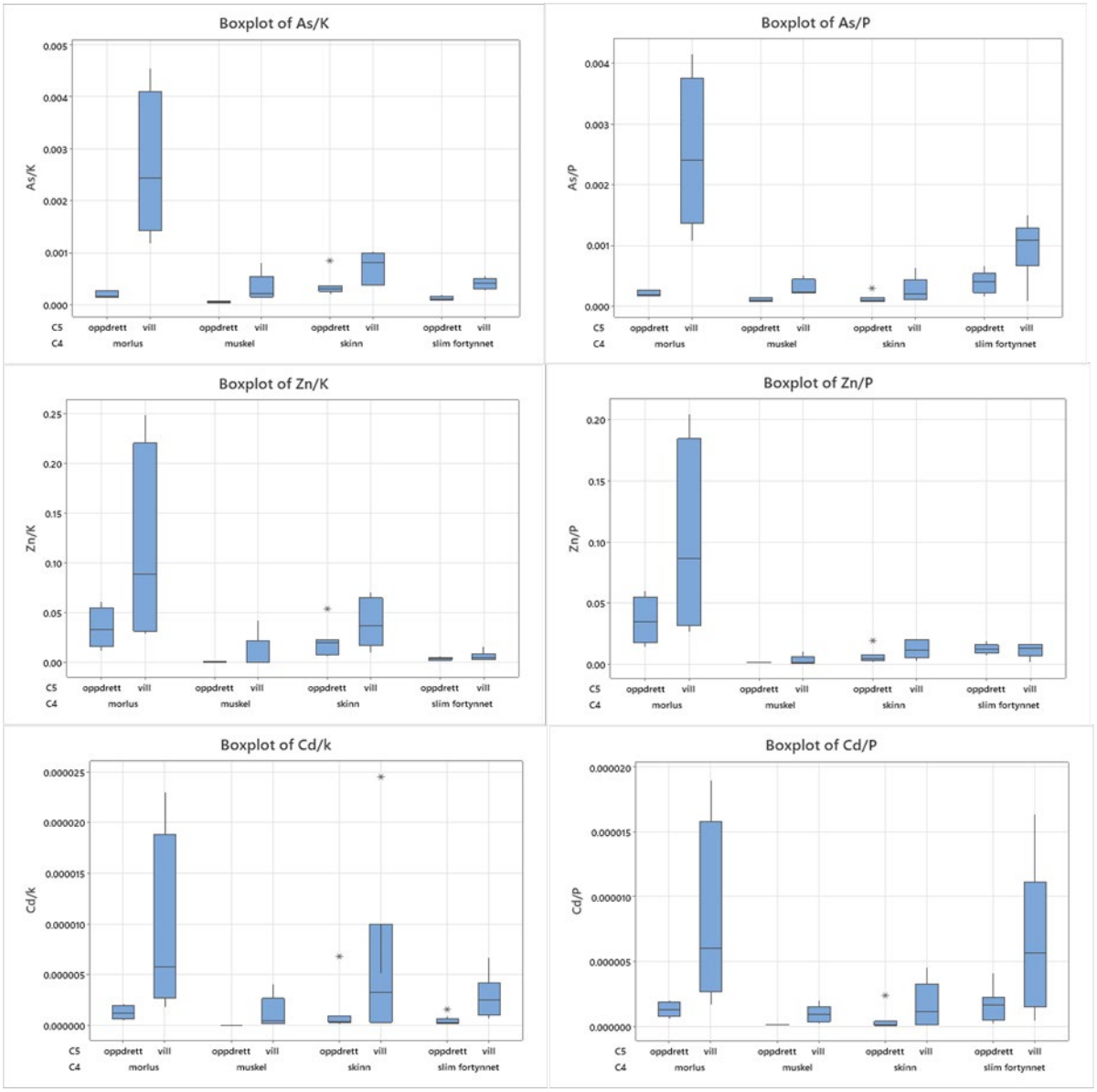
som As/K, og Cd/P, Zn/K også viser forskjell mellom prøver av villfisk og oppdrettsfisk (**Figur 13 D-F**) og kan benyttes som et alternativ til å vise forskjellen i konsentrasjonen av As, Cd og Zn.




**Figur 13. A-C**: Konsentrasjonen av As, Cd og Zn i muskelprøver og skinnprøver av oppdrettsfisk og villfisk (N=8 oppdrett, N=6 vill) og **D-F**: forholdet mellom grunnstoff, As/K, Cd/P og Zn/K i muskelprøver og skinnprøver av oppdrettsfisk og villfisk. Medianverdi er synliggjort med svart strek og konfidensintervallet er indikert med blått felt.

### Sammenhengen mellom fisk og morlus

Prøver av vev og morlus fra fisk målt med ApexQ-ICP-MS viser også forskjell for noen forholdstall av grunnstoff i ulike vevsprøver fra villfisk og oppdrettsfisk inkludert morlus. As/K og Cd/K er eksempler på forholdstall som er høyere i morlus og i flere vevsprøver av villfisk sammenlignet med oppdrettsfisk (**Figur 14)**. Det er antatt at et økt antall prøver vil redusere konfidensintervallet og gjøre forskjellen signifikant for flere forholdstall.

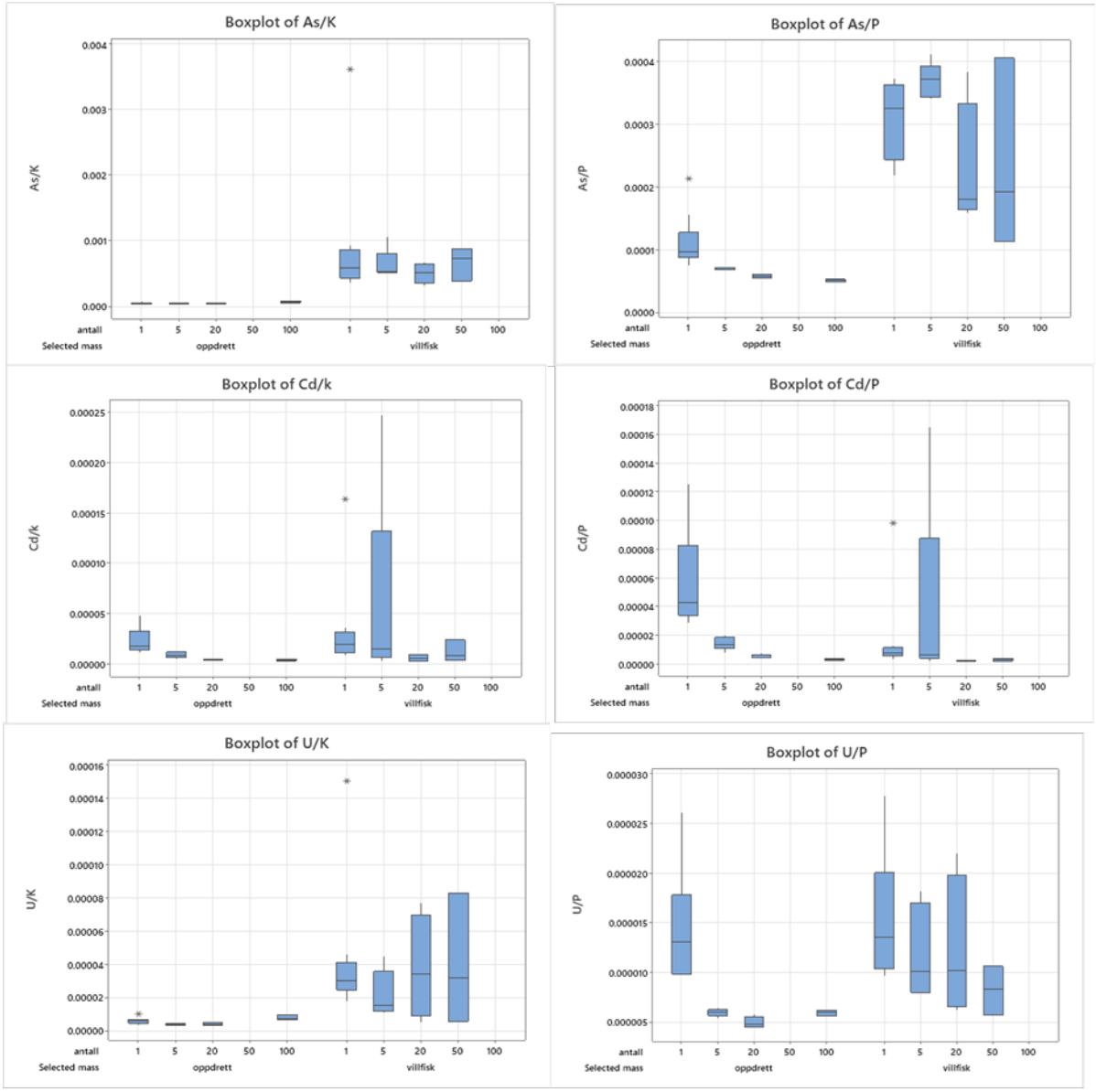



**Figur 14.** Forholdstall av As/K, Zn/K, Cd/K, s/P, Zn/P og Cd/P i morlus og vevsprøver av fisk fra villfisk og oppdrettsfisk. N = 4 for morlus, N = 6-10 for vevsprøver. Medianverdi er synligjort med svart strek og konfidensintervallet er indikert med blått felt.

**Forskjell mellom copepoditter fra morlus som satt på hhv villfisk og oppdrettsfisk**

Resultater viser at forholdstall av enkelte grunnstoff er forskjellig mellom copepoditter ut ifra om morlus satt på villfisk eller oppdrettsfisk **(Figur 15).** Spesielt forholdet mellom As og andre målte grunnstoff som K og P er forskjellig, men også As/Zn, As/Sr og U/K antyder forskjeller basert på analyser av 1, 5, 20, 50 og 100 copepoditter fra samme morlus. Det forventes ikke at forholdstallet mellom grunnstoff skal endres med prøvemengde og derfor heller ikke i prøver med forskjellig antall copepoditter. For enkelte forholdstall er det ingen endring i forholdstallet mellom prøver fra 1 til 100 copepoditter som antyder gode målinger. As/K og U/K er eksempler på forholdstall som ikke er påvirket av antall copepoditter analysert, men som er forskjellig mellom prøver av villfisk og oppdrettsfisk. Forholdstall som Cd/K avtar med økende antall copepoditter for oppdrettsfisk, men er uendret i prøver av 20 til 100 copepoditter, noe som trolig er et resultat av høy usikkerhet knytte til måling av Cd ved i 1 copepoditt (nær deteksjonsgrensen) og da spesielt

i oppdrettsfisk som har lavere innhold av Cd enn villfisk. Analysen kan med fordel gjentas med et større antall prøver for å identifisere trender med lavere konfidensintervaller.

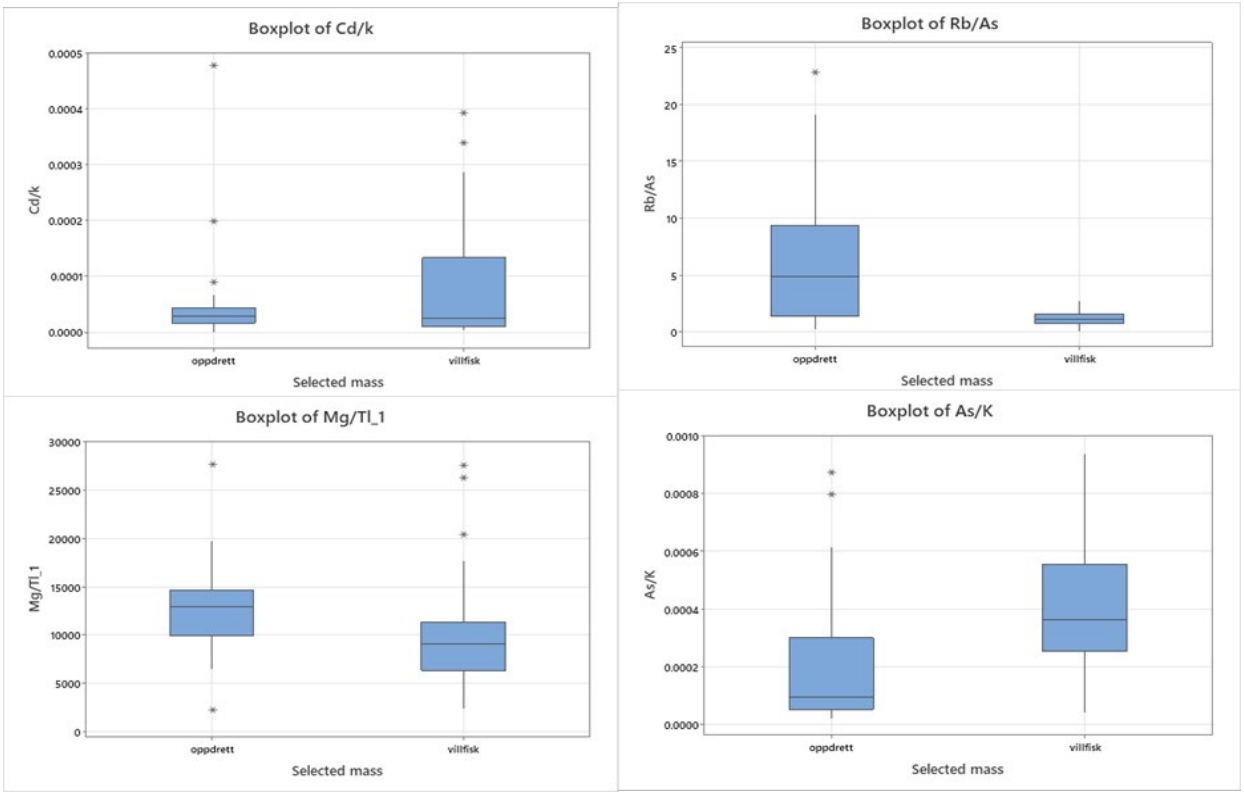



**Figur 15**. Forholdstall mellom grunnstoff målt i copepoditter enkeltvis og i samleprøver fra både en morlus fra villaks og en morlus fra oppdrettslaks. Medianverdi er synliggjort med svart strek og konfidensintervallet er indikert med blått felt (N=3 – 8).

Resultater fra måling av grunnstoff i én copepoditt viser at basert på alle målinger så er forholdet mellom noen grunnstoff signifikant forskjellig mellom prøver fra oppdrettsfisk (N=59 prøver) og villfisk (N=56 prøver), se **Tabell 2** og **Figur 16**.

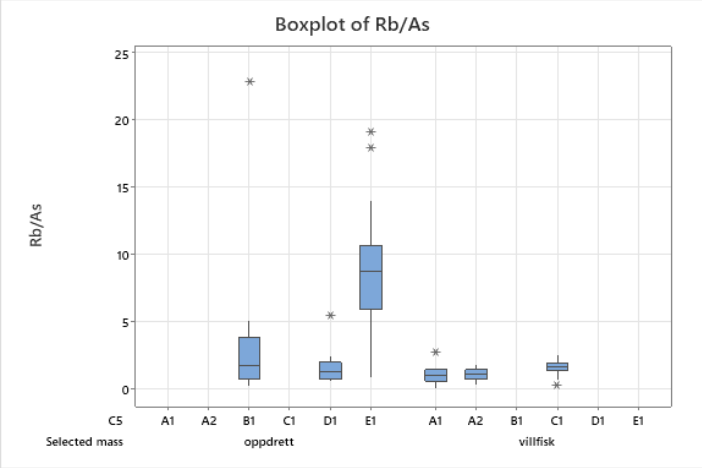
**Tabell 2**. Resultater fra 2-sample -T-test av målte forholdstall av grunnstoff i prøver av én copepoditt fra villaks og oppdrettslaks

| | Forskjell villfisk-oppdrettsfisk | | Forskjell villfisk-oppdrettsfisk |
|---|---|---|---|
| As/K | P = 0.06 | As/P | P = 0.048 |
| Zn/K | P = 0.001 | Zn/P | P = 0.065 |
| Cd/K | P = 0.203 | Cd/P | P = 0.203 |
| Mg/Tl | P = 0.014 | | |
| U/K | P = 0.089 | | |
| Rb/As | P < 0.001 | | |

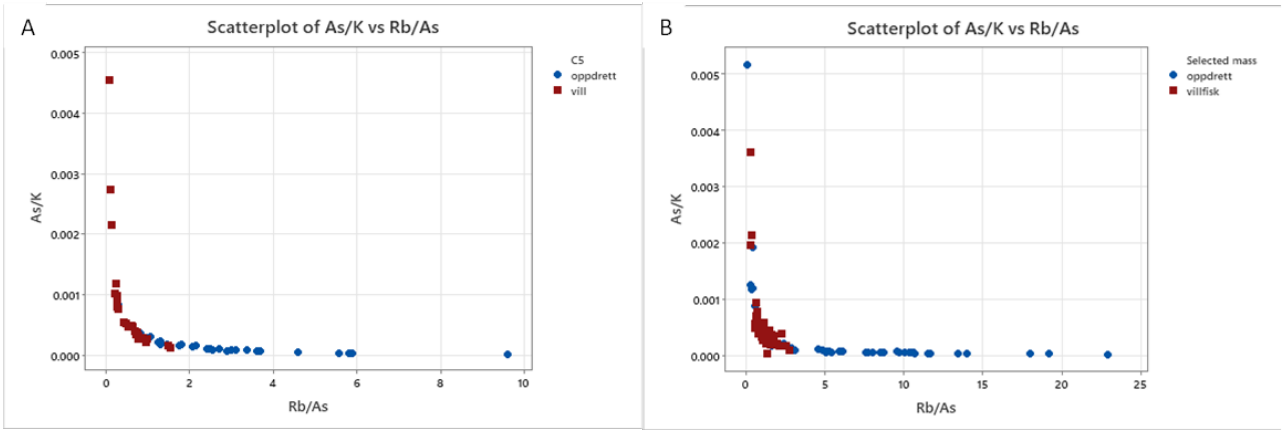



**Figur 16**. Boxplot av forholdstall for grunnstoff målt i én copepoditt fra villfisk (N=59) og i oppdrettsfisk (N=56).

Basert på mange prøver av enkeltcopepoditter fra villaks og fra oppdrettslaks så er det signifikant forskjell for flere forholdstall. Når vi sammenligner enkeltcopepoditter målt fra en enkelt morlus fra oppdrettsfisk (for n=5 replikater for hver morlus) så er ikke tilsvarende forholdstall signifikant forskjellig fra alle grupper av enkeltcopepoditter fra villfisk. I **Figur 17** er det presentert resultater av enkeltcopepoditter fra ulike lokaliteter av oppdrett og villfisk, enkelte lokaliteter er signifikant forskjellige andre ikke. Dette viser at det må brukes flere forholdstall for å identifisere forskjell mellom gruppene. Brukes informasjon fra flere forholdstall i 2 dimensjonale plott eller flerdimensjonale plott så er det mer tydelig grupperinger mellom villfisk og oppdrettsfisk (**Figur 18).**




**Figur 17**. Boxplot av forholdstall for grunnstoff målt i én copepoditt fra ulike grupper av villfisk og oppdrettsfisk. For oppdrett er 5 prøver av enkeltcopepoditter (replikater) målt for morlus fra minst tre morlus, som satt på ulike fisk. Tilsvarende for vill, bortsett fra at her var enkelte morlus hentet fra samme fisk.




**Figur 18.** Sammenhengen mellom to forholdstall A) i prøver av fisk (muskel, skinn, slim) B) én copepoditt fra oppdrett- og villfisk.

**Bidrag av grunnstoff fra eppendorfrøret og prøvehåndtering**

Dekomponering av copepoditter direkte i eppendorfrøret har den fordel at det reduserer kontaminering ved overførsel av prøver mellom prøvebeholdere. Samtidig kan eppendorfrør i seg selv bidra til forurensing av prøven, spesielt når prøven har liten masse sammenlignet med overflaten i prøvebeholderen så kan prøvebeholderen bidra til stor usikkerhet.

Konsentrasjonen av grunnstoff i kontrollprøver fra syrevasket eppendorfrør var lavere for en rekke grunnstoff sammenlignet med konsentrasjonen av grunnstoff i prøverør fra nye og ubehandlet eppendorfrør. Ved syrevasking av eppendorfrør før bruk ble flere grunnstoff som arsen (As) og vanadium (V) målbare i prøven oppsluttet med én copepoditt, i tillegg ble bakgrunnsnivået lavere for flere av de andre målbare grunnstoff (spesielt P). Det ble ikke utført syrevasking av eppendorfrør før innsamling av de fleste prøvene i dette prosjektet. Dette medførte at prøver av copepoditter ble overført fra et eppendorfrør til et syrevasket eppendorfrør og frysetørket på nytt. Dette har bidratt til at de fleste prøver innsamlet i dette

prosjektet ble overført mellom to eppendorfrør og frysetørket 2 ganger med den mulighet for kontaminering som dette medfører.

**Konklusjon grunnstoffanalyser:**
Resultatene viser at det er flere grunnstoff som er målbare i én copepoditt med ApexQ - ICP-MS. Siden det er utfordrende å veie inn enkeltcopepoditter med god nok nøyaktighet, rapporteres dataene som forhold mellom grunnstoff. Resultatene viser at det er flere grunnstoff-forhold som varierer mellom vill- og oppdrettsopprinnelse, blant As/K, As/P og U/K. Forskjeller man finner i vevsprøver fra oppdrettsfisk og villfisk, er også forskjellig i morlus og i copepoditter fra vill- og oppdrettsopprinnelsene undersøkt i prosjektet. Forskjellene skyldes i hovedsak at villfisken har høyere innhold av grunnstoffer som oppkonsentreres i marine organismer. Erfaring med optimalisering av metoden tilsier at en kan forvente noe lavere støy enn resultatene viser i dette prosjektet.

## 5.5 Vurdering av mulighetene for anvendelse av resultater fra prosjektet i næringen

Prosjektet hadde som målsetning å fremskaffe metodikk for sporing av opphav for enkeltlarver av lakselus. Trafikklyssystemet er basert på at lus spres fra oppdrettsanleggene, og ut fra antall oppdrettslaks i norske farvann, er det i stor grad etablert at oppdrettsfisken er hovedårsaken til lusespredningen. Det var i 2021 over 400 millioner oppdrettsfisk i norske fjorder, mot 1,5 million villlaks/ørret som bidrar til smitte. Det er beregnet at 98 % av eggbærende voksne hunnlus stammer fra oppdrettfisk (Dempster et al., 2021). Ut fra dette er det oppdrettsfisken som er dominerende når det gjelder å spre lakseluslarvene. Men det pågår mye forskning for å forstå bedre mekanismene for spredning av luselarver, og smoltvandring, og modellene blir oppdatert jevnlig. I fjorder der det er mye sjøørret, og få oppdrettsanlegg, kan det også være slik at villfisken bidrar betydelig med smitte. Ved å ha metoder som kan skille lakseluslarver fra vill og oppdrett, kan man få økt kunnskap om spredningen av lus. Dette er viktig for å sette inn tiltak for å redusere spredningen. 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.

Prosjektet har undersøkt hvilke metoder som kan benyttes for å analysere enkeltlus i copepodittstadiet, og om disse kan fungere som metoder for å skille vill og oppdrettsopprinnelse.

Resultatene viser at analyser av grunnstoff har størst potensiale for å kunne måle på enkeltcopepoditter. Utvalgte grunnstoff-forhold varierer også mellom vill- og oppdrett i prøvene av villfisk og oppdrettsfisk innsamlet fra de seks lokalitetene analysert i prosjektet. Et naturlig steg videre vil være å bruke utarbeidet metode til å innsamle nye prøver direkte i syrevasket beholdere og undersøke hvor robust metoden er. Prosjektet har analysert prøver samlet inn fra laks i Trøndelag, og det vil være naturlig å kartlegge variasjon ved å ta ut prøver fra ørret og andre steder i Norge. Ved å opparbeide en database på variasjon i grunnstofforhold i copepoditter fra flere anlegg i Norge, vil man kunne legge basisen for å spore lakselus tilbake til opphav av vertsfisk.

Det vil også være viktig å teste ut metoden slik den er tenkt brukt i praksis. Man kan se for seg at man ved å analysere luselarver fra vannprøver (naupli), eller som akkurat har satt seg på en vertsfisk og sammenligne med databasen for hhv vill og oppdrettsopprinnelse. Man bør også kartlegge stabiliteten av det kjemiske fingeravtrykket når lus har satt seg på fisk. Dette vil være viktig for å utvikle en robust metode hvor forholdstall mellom grunnstoff kan brukes til å finne ut om luselarvene kom fra en morlus som satt på en villfisk, eller oppdrettsfisk.

Man kom ikke helt i mål når det gjelder egnetheten til fettsyresammensetning ved GC for analyser av enkeltindivider. Resultatene på samleprøver viser imidlertid tydelig forskjeller mellom copepoditter av ulikt opphav, og denne forskjellen i fettsyresammensetning i luselarver vil fortsette å være der så lenge fôret til oppdrettlaks består av en vesentlig andel vegetabilske fôringredienser.

### 5.6 Vurdering av i hvilken grad og på hvilken måte resultatene vil bidra til styrket bærekraft

Lakselus er utfordrende både med tanke på smittepress på villaks og økt dødelighet og redusert fiskevelferd for oppdrettsfisk på grunn av lusebehandling. SPORLUS prosjektet har jobbet for å utvikle metodikk for å spore opphav av enkeltlarver av lakselus for å kunne validere spredningsmodeller, og for å bedre forstå mekanismene for spredning. Prosjektet har lykkes i å utvikle metodikk for måling av enkeltindivider ved grunnstoffanalyser, og metoden er vurdert å ha potensiale til å kunne benyttes for å spore luselarvene tilbake til om vertsfisk satt på en villaks eller oppdrettslaks. En videreutvikling og implementering av metodikken utviklet i prosjektet kan dermed bidra til økt kunnskap om spredning og bedre spredningsmodeller, og slik redusere den negative effekten som lakselus har på miljø, fiskehelse og velferd, og dermed bidra til en mer bærekraftig produksjon på disse områdene.

## 6 Hovedfunn

- Flere grunnstoff er målbare i enkeltindivider av luselarver med metoden som er utviklet (ApexQ - ICP-MS).
- Grunnstoff-forhold, som As/K, As/P og U/K, målt i enkeltindivider av luselarver varierte ut fra om morlus satt på en vill eller og oppdrettslaks, og har dermed potensiale for å inngå i metodikk for sporing av opphav av luselarver.
- Analyser av vevsprøver av fisk (muskel og skinn) viser høyere konsentrasjoner av flere metaller i villfisk enn i oppdrettsfisk.
- Lipidanalysene viser også forskjell mellom vill og oppdrettsopprinnelse når man analyserer samleprøver av luselarver, men ytterligere metodeutvikling må til for å kunne analyser enkeltindivider. Dette gjelder både analyser av fettsyresammensetning ved GC-FID, og lipidomicsanalyser ved LC-MS.

# 7 Acknowledgements

Takk til Miljødirektoratet og OURO (Oppdrettsnæringens sammenslutning for utfisking av rømt oppdrettsfisk) for finansiering av drift av fangststasjonene for villfisk, og til NINA v/ Tor Næsje for at vi fikk benytte stasjonene for prøveuttak. Takk til Arne Jørrestol og Leif Skorstad for god hjelp med feltarbeid for prøvetaking av villfisk. Takk til Måsøval AS og MOWI Seawater Norway AS for prøvetaking på deres oppdrettsanlegg.

# 8 Referanser

Aas, T.S. et al. (2022a) Utilization of feed resources in the production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway: An update for 2020. Aquaculture reports 26.

Aas, T.S. et al. (2022b) Chemical composition of whole body and fillet of slaughter sized Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farmed in Norway in 2020. Aquaculture report, 25.

Abdulkadir, S. og Tsuchiya, M. (2008) One-step method for quantitative and qualitative analysis of fatty acids in marine animal samples. *J Exp Mar Biol Ecol* 354, 1–8.

Aldrin, M. et al. (2013) Space-Time Modelling of the Spread of Salmon Lice between and within Norwegian Marine Salmon Farms. *PLoS ONE* 8(5).

Asplin, L. et al. (2020) The hydrodynamic foundation of salmon lice dispersion modeling along the Norwegian coast, Ocean Dynamics, 70, 1151-1167.

Axelson, D.E. et al (2009) Classification of wild and farmed salmon using Bayesian Belief Networks and gas chromatography-derived fatty acid distributions. *J. Aric Food Chem*, 57, 7634-7639.

Aursand, M. et al. (2009) Characterization of farmed and wild salmon (*Salmo salar*) by a combined use of compositional and isotopic analyses. *JOACS*, 77, 659-666.

Bergvik, M. et al. (2012) Properties of Calanus finmarchicus biomass during frozen storage after heat inactivation of autolytic enzymes. *Food Chem.* 132, 209-215.

Butterworth, K.G. et al. (2004) Carbon and nitrogen stable isotopes: a tool to differentiate between *Lepeophtheirus salmonis* and different salmonid host species? *Aquaculture* 241, 529-538.

Boxaspen, K. (2007) A review of the biology and genetics of sea lice. *ICES J. Mar. Sci.* 63, 1304-1316.

Båtnes, A.S. et al. (2021) Taskforce lakselus – mekanismer for spredning av lakselus. Sluttrapport FHF prosjekt #901241

Båtnes, A.S. et al. (2024) Ikke-medikamentell kontroll av lus: sammenlikning av avlusingsmetoder på bakgrunn av avlusingseffekt, fiskevelferd, toleranse mot og smittepotensial etter avlusing. Sluttrapport FHF 901588 (SAMLUS-prosjektet).

Chatterjee NA. et al. (2019) 'Simultaneous authentication of species identity and geographical origin of shrimps: untargeted metabolomics to recurrent biomarker ions' *J. Chromatograph. A* (IF 3.74) 1599:75-84.

Crosbie T. et al. (2019) Effects of step salinity gradients on salmon lice larvae behaviour and dispersal. Aquac. Environ. Interact. 11, 181-190.

Crosbie, T. et al. (2020) Impact of thermoclines on the vertical distribution of salmon lice larvae. Aquac. Environ. Interact. 12, 1-10.

Dean, S. et al. (2011) Assessment of stable isotopic signatures as a means to track the exchange of sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*) between host fish populations. *Can. J. Fish. Aquatic Sci.* 68, 1243-1251.

Dempster, T. et al. (2021) Farmed salmonids drive the abundance, ecology and evolution of parasitic salmon lice in Norway. *Aquacult. Environ. Interact*. 13, 237-238.

Eroshchenko, N.N. et al. (2023) Development and validation of a HPLC-MS/MS method for the analysis of fatty acids - in the form of FAME ammonium adducts - in human whole blood and erythrocytes to determine omega-3 index. *J. Chromatography B, 1227, 123799.*

Flamarique, I.N. et al. (2000). Ontogenetic changes in visual sensitivity of the parasitic salmon louse *Lepeophtheirus salmonis*. J. Exp. Biol. 203(11):1649–1657.

Finstad, B. & Bjørn, P.A. (2011) Present status and implications of salmon lice on wild salmonids in Norwegian coastal zones. In: Salmon Lice: An Integrated Approach to Understanding Parasite Abundance and Distribution. (Jones, S., Beamish, R. eds). Wiley-Blackwell, Oxford, UK, pp. 281-305.

Grahl-Nielsen, O. & Glover, K.A. (2010) Fatty acids in fish scales. *Mar. Biol.* 157, 1567-1576.

Hamre et al., 2019. Development of the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* parasitic stages in temperatures ranging from 3 to 24C. Aquacult. Environ. Interact. 11, 429-443.

Henderson R.J, & Tocher, D.R. (1987) The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Prog. Lipid. Res.* 26, 281-347.

Heuch PA, Parsons A, Boxaspen K. (1995). Diel vertical migration: a possible host-finding mechanism in salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis) copepodids*? Can J Fish Aquat Sci. 52(4):681–689. doi:10.1139/f95-069.

Jevne, LS. et al. (2021) Planktonic and parasitic sea lice abundance on three commercial salmon farms in Norway throughout a production cycle, *Front. Mar. Sci* (8)
Lien, H. et al. (2022) Modellert påvirkning av lakselus på vill laksefisk. Rapport fra havforskningen, nr 36.
Malzahn, A.M. et al. (2022) Can lipidomics help identifying egg quality in ballan wrasse? *Aquaculture*, 522.
Martinez, I. et al. (2009) Identification of the farm origin of salmon by fatty acid and HR 13C NMR profiling. *Food Chem* 116, 766
Nilsen, F. et al. (2017) Spreiing av lakselus, Sluttrapport FHF- prosjekt #901108
NINA, 2023. Lakseinnsig til Trondheimsfjorden 2023. Hentet fra https://www.nina.no/milj%C3%B8overv%C3%A5king/lakseinnsig-til-fjordene/lakseinnsig-til-trondheimsfjorden
Olsen, R.E. et al. (2013) Improved method for triacylglycerol-derived fatty acid profiling by various non-lethal and lethal sampling techniques in Atlantic salmon. *Aquacult. Environ. Interact*. ,251-261. 773.
Ormaasen, I. (2021) Measurement of 90Sr in Chernobyl arthropods. Masteroppgave ved NMBU.
Perez-Palacios, T. (2022) Improvements in the methodology for fatty acids analysis in meat products: One-stage transmethylation and fast-GC method. *Food Chem*. 371.
Pike, AW. & Wadsworth, S. L. (1999) Sea lice on salmonids: their biology and control. Advances in Parasitology 44, 234-337.
Skilbrei, O. et. al. (2015) Use of fatty acid profiles to monitor the escape history of farmed Atlantic salmon. *Aquacult. Environ. Interact*.7-13.
Standal, I.B. & Teien, H-C. (2013) Sporing av lakselusens opphav. Villaks eller oppdrettslaks som vertsfisk. Sluttrapport FHF # 900790 SINTEF rapport nr A23789.
Thomas, F. et al. (2008) Determination of origin of Atlantic salmon (*Salmo salar*): The use of multiprobe and multielement isotopic analyses in combination with fatty acid composition to assess wild or farmed origin. *J. Agric. Food Chem.* 56, 989-997.
Tocher, J.A. et al. (2010) Lipid and fatty acid composition of parasitic caligid copepods belonging to the genus *Lepeophtheirus*. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* 156, 107-114.

# 9 Ferdigstilte leveranser

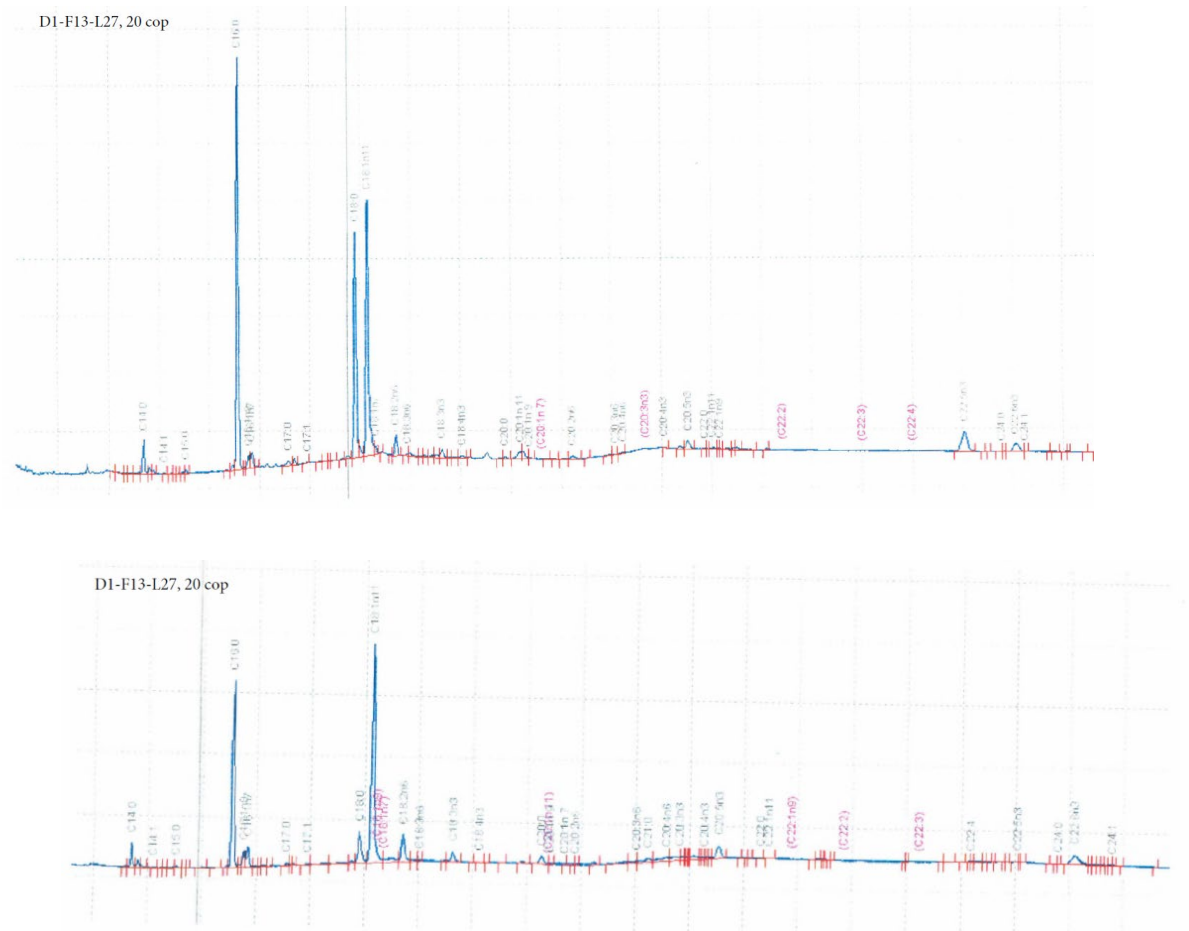
Populærvitenskapelig publisering

| | |
|---|---|
| "*Skal lære å kjenne lakselusa på gangen*" av Håvard Egge, Publisert i Gemini | 24.07.2023 |

Muntlige presentasjoner

| | |
|---|---|
| *"Kommer lusa fra en oppdrettsfisk eller villfisk* ?" Lusekonferansen, Trondheim | 24.01.2024 |

## Vedlegg 1. Eksempler på kromatogram fra GC-FID analyser.




**Figur V1**. Kromatogram for analyse av to samleprøver med 20 copepoditter fra morlus L27 for anlegg D1. Kromatogrammene viser relativt stor forskjell på disse to prøvene som er vurdert som replikater i prosjektet.

## Vedlegg 2. Resultater fra grunnstoffanalyser av vevsprøver fra fisk

**Tabell V1.** Konsentrasjonen av grunnstoff i vevsprøver fra villfisk (enkeltfisk) og fra oppdrettsfisk (grupper av fisk). Oppdrettsfisk er oppgitt som gjennomsnitt ± standardavvik. DOLT : Dogfish lever CRM (certified reference material). Referanseverdi og målt verdi på denne er oppgitt.

| | | | Vill A1 | Vill A2-F1 | Vill A2:_F2 | Vill C1_F2 | Vill C1_F3 | Oppdrett B | Oppdrett C | Oppdrett E | DOLT4 Målt | DOLT4 CRM |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Mg | mg/kg | muskel | 335 | 332 | 344 | 335 | 361 | 256 ± 7 | 285 ± 145 | 362 ± 26 | 1510 | 1500 |
| | | skinn | 207 | 574 | 286 | 229 | 299 | 295 ± 51 | 322 ± 53 | 511 ± 86 | | |
| P | mg/kg | muskel | 2880 | 2830 | 2840 | 2900 | 2990 | 2323 ± 55 | 2610 ± 78 | 3133 ± 256 | 13200 | |
| | | skinn | 2610 | 4480 | 3830 | 3970 | 4700 | 4753 ± 1272 | 5170 ± 863 | 3640 ± 1273 | | |
| K | mg/kg | muskel | 4630 | 4750 | 4790 | 4360 | 5000 | 4087 ± 257 | 4497 ± 115 | 5233 ± 49 | 9900 | 9800 |
| | | skinn | 1600 | 1250 | 1580 | 1060 | 846 | 1370 ± 111 | 1323 ± 141 | 1390 ± 71 | | |
| Ca | mg/kg | muskel | <80 | <70 | <70 | 249[a] | <70 | <70 | <70 | <70 | 660 | 680 |
| | | skinn | 3030 | 7100 | 5330 | 6200 | 8180 | 7510 ± 2769 | 7740 ± 1444 | 5270 ± 2235 | | |
| V | mg/kg | muskel | <0.0037 | <0.0037 | <0.0037 | <0.0037 | <0.0037 | <0.0037 | <0.0037 | <0.0037 | 0.593 | 0.6 |
| | | skinn | 0.0112 | 0.0235 | 0.0344 | 0.0307 | 0.0266 | 0.024±0.01 | 0.027±0.007 | 0.021±0.0003 | | |
| Mn | mg/kg | muskel | <0.13 | <0.13 | <0.12 | <0.14 | <0.13 | <0.13 | <0.13 | <0.13 | 10.3 | 1.4 |
| | | skinn | 0.167 | 0.881 | 0.289 | 0.328 | 0.311 | 2.1 ± 1.6 | 2.7 ± 2.5 | 2.6±1.5 | | |
| Fe | mg/kg | muskel | 2.24 | 2.21 | 2.3 | 7.85 | 3.3 | 3.6 ± 0.5 | 3.1 ± 0.7 | 2.9±0.4 | 1890 | 1833 ± 75 |
| | | skinn | 4.18 | 7.48 | 5.92 | 3.68 | 9.21 | 4.5 ± 0.9 | 6.1 ± 0.4 | 11.1±4.7 | | |
| Cu | mg/kg | muskel | 0.302 | 0.225 | 0.241 | 0.735 | 0.427 | 0.3 ± 0.1 | 0.3 ± 0.04 | 0.3±0.1 | 34.1 | 31.2 ± 1.1 |
| | | skinn | 0.642 | 0.718 | 0.911 | 0.463 | 0.904 | 0.3 ± 0.1 | 0.4 ± 0.1 | 0.9±0.2 | | |
| Zn | mg/kg | muskel | 3.44 | 3.12 | 2.94 | 4.41 | 3.29 | 3.5 ± 0.4 | 3.7 ± 0.3 | 3.3±0.01 | 123 | 116 ± 6 |
| | | skinn | 33.6 | 11.9 | 80.7 | 80.6 | 51.2 | 45 ± 27 | 23 ± 3 | 7.7±1.5 | | |
| As | mg/kg | muskel | 2.79 | 2.32 | 2.02 | 1.56 | 1.27 | 0.4 ± 0.2 | 0.6 ± 0.1 | 0.4±0.2 | 9.73 | 9.7 ± 0.6 |
| | | skinn | 2.15 | 0.475 | 1.89 | 0.984 | 1.03 | 0.8 ± 0.7 | 0.42 ± 0.04 | 0.4±0.1 | | |
| Rb | mg/kg | muskel | 0.872 | 0.958 | 0.891 | 0.948 | 0.991 | 0.9 ± 0.5 | 1.2 ± 0.1 | 1.2±0.1 | 3.06 | |
| | | skinn | 0.352 | 0.365 | 0.371 | 0.259 | 0.236 | 0.35 ± 0.04 | 0.41 ±0.07 | 0.41±0.03 | | |
| Sr | mg/kg | muskel | <0.3 | <0.3 | <0.3 | 1.32[a] | <0.3 | <0.3 | <0.3 | <0.3 | 5.17 | 5.5 |
| | | skinn | 12.1 | 37.1 | 20.7 | 25.6 | 42.6 | 35.8±12.3 | 30.3±5 | 26.9±8.1 | | |
| Cs | mg/kg | muskel | 0.056 | 0.0477 | 0.0546 | 0.033 | 0.0549 | 0.02±0.001 | 0.022±0.001 | 0.029±0.003 | 0.106 | |
| | | skinn | 0.0241 | 0.0078 | 0.0214 | 0.0140 | 0.0080 | 0.009±0.003 | 0.008±0.002 | 0.009±0.0001 | | |
| Cd | mg/kg | muskel | 0.00187 | 0.00048 | 0.00184 | 0.00470 | 0.00125 | 0.0001±0.0001 | 0.0001±0.0001 | 0.0001±0.0001 | 25.2 | 24.8±0.8 |
| | | skinn | 0.00675 | 0.00046 | 0.00270 | 0.00556 | 0.01850 | 0.0029±0.0047 | 0.00018±0.00004 | 0.00027±0.00003 | | |
| Tl | mg/kg | muskel | 0.000191 | 0.000213 | <0.00011 | 0.00022 | 0.00016 | 0.00031±0.00004 | 0.00018±0.00002 | 0.00017±0.00002 | 0.0172 | |
| | | skinn | 0.00024 | 0.000226 | 0.000255 | 0.000116 | 0.000204 | 0.0003±0.0001 | <0.0003 | <0.0003 | | |
| U | mg/kg | muskel | <0.0002 | 0.0337 | <0.0002 | 0.0005 | <0.0002 | <0.0002 | <0.0002 | <0.0002 | 0.062 | |
| | | skinn | 0.00153 | 0.0197 | 0.00276 | 0.00232 | 0.00676 | 0.004±0.001 | 0.0017±0.0004 | 0.008±0.005 | | |

[a]Økt verdi signaliserer beinrester i muskelprøven