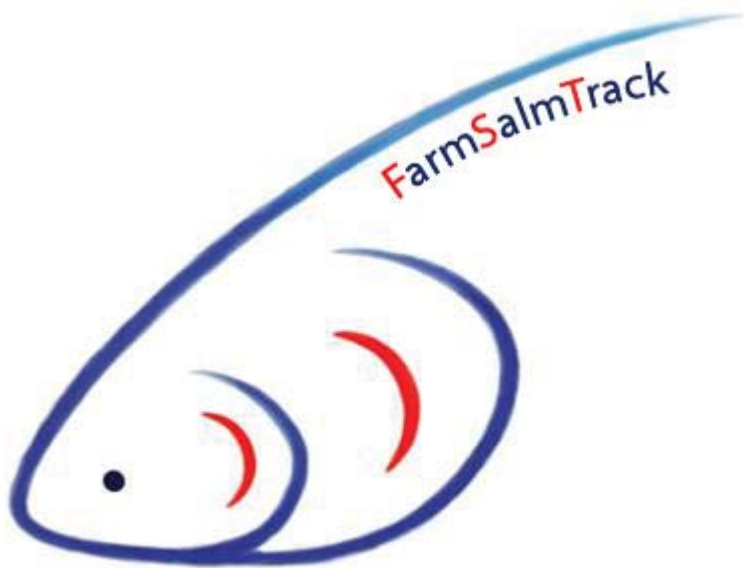


FarmSalmTrack

Sporing basert på grunnstoff i fiskens skjell



Veterinærinstituttet
Norwegian Veterinary Institute



**NORGES
GEOLOGISKE
UNDERSØKELSE**

- NGU -

FarmSalmTrack - Sporing basert på grunnstoff i fiskens skjell

Innhold

Sammendrag	3
Summary	6
1. Innledning	9
2. Bakgrunn	10
3. Oppsummering av delrapporter	14
3.1 Logistikk (Delrapport A)	14
3.2 Innledende analyser (Delrapport B, C og D)	14
3.2.1 Analysemetode (Delrapport B)	14
3.2.2 Sammenligning av frontskudd og sideskudd (Delrapport C)	14
3.2.3 Variasjon i kjemisk profil for ett individ kontra flere individ (Delrapport D)	14
3.3 Etablering av profiler (Delrapport E og F)	15
3.3.1 Kartlegging og klassifisering av kjemisk profil i skjell fra 24 grupper settefisk (Delrapport E)	15
3.3.2 Kartlegging og klassifisering av sjøvannprofil i skjell fra 17 grupper matfisk (Delrapport F)	15
3.4 Stabilitetsstudier (Delrapport G, H og J)	15
3.4.1 Ferskvannprofilens stabilitet etter 2 måneder i sjø (Delrapport G)	15
3.4.2 Langtidsstudie av ferskvannprofilens stabilitet for fisk satt i sjø (Delrapport H)	15
3.4.3 Ferskvannprofilens stabilitet etter tilbakeføring til ferskvann (Delrapport J)	16
3.5 Simulert rømming: Sporing av fisk tilbake til lokalitet (Delrapport I)	16
4. Analysetid og kostnader	17
4.1 Tidsperspektiv analyser	17
4.2 Kostnadsvurderinger	19
5. Konklusjon med vurdering av anvendelse	20
5.1 Sporing basert på grunnstoffanalyser alene	20
5.2 Sporing basert på kombinasjonen av grunnstoffanalyser og DNA	21
5.3 Innsamling av referansemateriale	23
5.4 Konklusjon	24
6. Videre arbeid	24
7. Referanser	25
8. Ordliste	28

Delrapport A: Logistikk

Delrapport B: Analysemetode

Delrapport C: Sammenlikning av frontskudd og sideskudd

Delrapport D: Variasjon i kjemisk profil for ett individ kontra flere individ

Delrapport E: Kartlegging og klassifisering av kjemisk profil i skjell fra 24 grupper settefisk

Delrapport F: Kartlegging og klassifisering av sjøvannprofil i skjell fra 17 grupper matfisk

Delrapport G: Ferskvannprofilens stabilitet etter 2 måneder i sjø

Delrapport H: Langtidsstudie av ferskvannprofilens stabilitet for fisk satt i sjø

Delrapport I: Simulert rømming: Sporing av fisk tilbake til lokalitet

Delrapport J: Ferskvannprofilens stabilitet etter tilbakeføring til ferskvann

Vedlegg 1: Prosedyre ved uttak av skjellprøver

Vedlegg 2: Settefiskanlegg. Skjema for innsendelse av skjellprøver fra en gruppe fisk

Vedlegg 3: Matfiskanlegg. Skjema for innsendelse av skjellprøver

Forfattere:

Vidar Moen, ansvarlig FoU
 Belinda Flem
 Thor M. Nordahl
 Tonje F. Benden
 Ketil Skår, prosjektleder

Andre medvirkende:

Tor Erik Finne, Monica Garberg, Maria Haugnæss,
 Anja B. Kristoffersen, Silje V. M. Larsen, Lars
 Møller, Rune Pedersen, Claire K. Peterson, Iselin
 E. Pettersen, Lasse M. Skår, Mari M. Slenes,
 Hanne M. Straume, Hildegunn Viljugrein

ISSN 1890-3290

© Veterinærinstituttet 2017

Design omslag: Reine Linjer

Logo forside: Emilie Mjaaland Skår

Bedriftene som har deltatt i prosjektet:



Medvirkende:



Sammendrag

SalMar, Marine Harvest og Lerøy Seafood tok i 2014 initiativ til et prosjekt med mål å teste ut og utvikle en sporingsmetode basert på naturlig integrerte grunnstoff i fiskens skjell. Prosjektet ble gjennomført i samarbeid med VESO, Norges geologisk undersøkelse (NGU) og Veterinærinstituttet (VI). Prosjektet ble finansiert av bedriftene som har deltatt i prosjektet, FHL Miljøfondet, Sjømat Norge og FHF. Nye anlegg har kommet til i løpet av prosjektperioden, og ved prosjektets avslutning representerte ordningen 65% av årlig smoltutsett i Norge. Det er registrert prøver fra 56 680 fisk fordelt på 1 028 innsendelser fra 71 settefiskanlegg og 157 matfiskanlegg.

Resultater

Hovedresultatet fra undersøkelsene så langt er at en kan skille mellom settefiskanlegg og mellom lokaliteter i sjø. Det er vist at inkorporeringen av grunnstoff i skjellet gjenspeiler miljøet som fisken levde i det aktuelle tidsrommet, slik at skjellet fungerer som en tidslinje. Denne tidslinjen kan benyttes i flere sammenhenger:

- Analyse av forholdet mellom strontium og barium langs et transekt fra sentrum og ut mot kanten av skjellet kan benyttes for å fastslå skleritten som ble dannet da fisken ble flyttet fra ferskvann over i sjøvann. Denne analysen kan også benyttes til å skille mellom grupper av fisk.
- Ferskvannsprofilen dannes mens fisken står i settefiskanlegg. Ferskvannsprofiler av 24 ulike grupper fra 18 settefiskanlegg lokalisert opp langs kysten ble skilt fra hverandre med en presisjon på 95.9%. Den er en viktig indikator på gruppetilhørighet, også etter lengre tid i sjøvann.
- Sjøvannsprofiler av 17 grupper etter 2 måneder i sjø gav en gjennomsnittlig klassifiseringspresisjon på 74.2% (32.0-95.5%).
- Sjøvannsprofilen i ytterkant av skjellet ble i en test av et rømmings-scenario benyttet til å skille mellom to lokaliteter. 86 av 92 skjell (93.5%) ble klassifisert til riktig anlegg, 79 av skjellene med mer enn 98% sannsynlighet.

Simulert rømming

Det ble gjennomført en simulert rømming med innsamling av skjell fra seks matfiskanlegg (11 grupper). Kryssvalideringen gav en medianpresisjon på 94.2% (88.2-97.2%) for grupper som hadde stått på ferskvann i settefiskanlegget, og tilsvarende 72.4% (48.9-82.5%) for grupper med sjøvannsinnblanding. Det ble vist at det var mulig å luke ut fisk som ikke hørte til den konkrete rømmingen ved at grupper og enkeltfisk som ikke var representert i referansematerialet ble avdekket. Den rømte gruppa kunne komme fra to lokaliteter som begge hadde fisk fra samme settefiskanlegg. Gjennom å benytte Sr/Ba, ferskvannsprofilen og sjøvannsprofilen i ytterkanten av skjellet ble lokaliteten som den rømte gruppen kom fra identifisert med en presisjon på 93.5%. Samtidig hadde 79 av 92 skjell mer enn 98% sikkerhet for å tilhøre den riktige lokaliteten.

En sentral forutsetning for en sporingsmetode er at en unngår å peke på feil anlegg som kilde til rømmingen. I og med at en kjenner referansematerialet gruppen skal sammenliknes med kan en ved hjelp av statistiske metoder velge nivået for presisjon. Ved å definere cut-off verdier kan en synliggjøre at de ulike kravene til presisjon påvirker hvor ofte en kan konkludere på rett anlegg, hvor ofte en tar feil, og hvor ofte en ikke kan konkludere. Slike vurderinger må gjøres i hvert enkelt tilfelle, og påvirkes av antall anlegg som skal sammenliknes samt hvor unik profilen er i hvert tilfelle. Dette gir et mål på hvor sikker man er i konklusjonen. I vår simulerte rømming var sannsynligheten for at en konkluderer med feil anlegg mindre enn $1/10^{16}$ ved en cut-off verdi på 85%.

Resultatene fra den simulerte rømmingen viser at metoden kan brukes ved oppklaring av en rømmingssituasjon. Fisk i en gruppe beholder en felles ferskvannsprofil etter ett år i sjø, og det er mulig å luke ut fisk som ikke hører til den konkrete rømmingen som undersøkes. Sjøvannsprofilen kan gi ytterligere informasjon om den rømte gruppen, og i tillegg kan en benytte ytterkant av skjellet til å skille mellom lokaliteter. Statistiske metoder avdekker når vi mangler referansemateriale av den rømte fisken. En unngår dermed å identifisere feil anlegg som kilde til rømmingen.

Profilens stabilitet

Etter at fisken er satt i sjø skjer det en gradvis endring av den kjemiske sammensetningen i skjellet. Endringene er størst rett etter flytting til sjø, og vil deretter avta. Endringene i profilen er lik for fisk innen en gruppe, og gruppene opptre samlet gjennom hele produksjonen. Ferskvannsprofilen kan derfor fortsatt benyttes til sporing helt fram til slakt. Sammenligning av ferskvannsprofilen etter to måneder i sjø mot den opprinnelige ferskvannsprofilen gav en klassifiseringspresisjon på 86.6% i snitt. En sammenligning av ferskvannsprofilen etter 12 måneder i sjø med den samme profilen etter 9 måneder i sjø gav en klassifiseringspresisjon på 92.5% i snitt.

Ved innsamling av referansemateriale en gang pr måned de to første månedene, deretter hver 3.-4. måned fram til slakt forventes det å kunne holde klassifiseringspresisjon på >90% gjennom hele produksjonen. Dette er på høyde med den opprinnelige presisjonen mellom grupper i settefiskanlegg.

Tilbakeføring til ferskvann

Innledende resultater fra forsøk med tilbakeføring av fisk til ferskvann indikerer at metoden også kan benyttes for nylig rømt fisk som har returnert til elv. Resultatene etter en måned i ferskvann viser at profilen er gjenkjennelig når en sammenlikner mot den siste tiden i sjø. Dette, sammenholdt med den gode stabiliteten fra 9 til 12 måneder i sjø (>90%), indikerer at metoden gir god presisjon for nylig rømt fisk (innen siste 3 måneder), også når den har returnert til elv. Våre resultater antyder at endringene når fisken går fra sjø tilbake til elv er mindre enn endringene når fisk går fra settefiskanlegg til sjø. Med videre arbeid forventer vi å kunne spore fisk i lengre tid etter rømming enn vi har dokumentert til nå.

Innsamling av referansemateriale

Innsamling av referanseskjell som grunnlag for sporing kan gjøres på ulike måter. I denne rapporten er det foreslått å kombinere to metoder, en innsamling kun i forbindelse med oppdaget rømming, og en jevnlig innsamling gjennom produksjonen. Ved en hurtig innsamling kun i forbindelse med rømminger vil en minimere arbeid og kostnader med å ta prøver, men mister muligheten til å spore enkeltfisk eller rømminger som ikke er oppdaget i tide. I tillegg øker risikoen for at en ikke har tilgjengelig materiale fra den aktuelle rømmingen, enten fordi fisken kan være slaktet eller fordi en av ulike årsaker ikke har fått med materiale fra den lokaliteten fisken faktisk rømte fra. Ved jevnlig innsamling gjennom produksjonen vil en sikre at en alltid har relevant referansemateriale når en finner rømt fisk. Ulempen er at en må samle inn prøver flere ganger, og ta kostnaden med å holde et arkiv over referansematerialet. En kombinasjon av disse to metodene sikrer tilgang på best mulig materiale, og tar høyde for at det kan skje svikt i innsamlingen av skjell. Dette sikrer tilgang på materiale ved oppklaring av både større rømminger og for enkeltfisk. Sporingsalternativene (unntatt beredskapssituasjonen kun basert på grunnstoffanalyser) forutsetter at næringen har god kontroll og dokumentasjon på faktisk flytting av fisk over tid, men legger ikke begrensninger på logistikken.

Videre utvikling av metodikk

Videreutvikling av metoden ved å undersøke andre måter å analysere skjell på forventes å gi tilleggsinformasjon, og en kombinasjon av ulike analysemetoder kan gi ytterligere forbedringer i presisjonen. En konsekvens av den benyttede analysemetoden er at konsentrasjonen av sjeldne jordartsmetaller (REE) faller under deteksjonsgrensen. Andre måter å analysere på kan gjøre det mulig å se nærmere på forholdstall og stabilitet for REE i lakseskjell. Det er også interessant å se på forholdet mellom isotoper av enkelte grunnstoff.

Det må jobbes videre for å oppnå bedre presisjon for enkelte grupper med sjøvannsinnblanding. Mulige forbedringer kan være metoder som er uavhengige av tidspunkt for utsett, for eksempel analyser fra senter og ut mot kanten, eller forholdstall mellom ulike isotoper av samme grunnstoff.

Anvendelse

Resultatene viser at grunnstoffanalyser kan løse mange av utfordringene ved sporing. Grunnstoffanalyser som sporingsmetode benyttet i kombinasjon med DNA-familiesporing (DNA) vil være en bedre løsning. Begge metodene kan baseres på skjell, noe som letter innsamlingen og lagring av prøvemateriale.

Metodene har hver sine styrker, og kompenserer for hverandres svakheter. DNA er et presist verktøy som muliggjør store analysevolum og raske resultat til en relativt billig penge. DNA alene forutsetter imidlertid restriksjoner på logistikken i næringen for å gi svar på hvilket settefiskanlegg eller lokalitet fisken har rømt fra.

Grunnstoffanalyser gir informasjon om settefiskanlegg og lokalitet, men har kapasitetsutfordringer sammenliknet med DNA. Metoden fjerner imidlertid behovet for restriksjoner på logistikken som DNA forutsetter. En kombinasjon av de to metodene kan derfor utgjøre en komplett sporingsmetode. Løsningen muliggjør en fortsatt fleksibel produksjonsstrategi som legger til rette for god utnyttelse av produksjonskapasitet i settefisk- og matfiskanlegg, samtidig som en kan spore fisk til lokalitet med høy presisjon.

For å sikre best mulig presisjon og unngå unødvendige ekstra analyser forutsettes det at næringen har full oversikt over hvor fisk med ulike DNA-kombinasjoner befinner seg.

Analysekapasitet

Hvor lang tid det vil ta fra skjell er mottatt til et sikkert resultat foreligger er avhengig av flere variabler. Forundersøkelser som Sr/Ba og DNA kan redusere antallet kandidatgrupper relativt raskt. Tidsbruken vil øke med antall kandidatgrupper og antall individer i gruppen mistenkt for rømming. Med dagens utstyr og metode vil det ta fra to til fem uker å analysere prøvematerialet, avhengig av antall grupper i referansematerialet og om det er store eller små skjell.

Når en har besluttet rammen for sporingen, og bestemt hvor raskt man vil ha svar, vil metoden kunne tilpasses slik at resultatene foreligger innenfor ønsket tid.

Økonomi

Det bør legges opp til en årlig ramme på ca. 15 millioner kroner pr år for grunnstoffanalyser. Dette inkluderer full utnyttelse av dagens analysekapasitet, nødvendig støtte og utvikling av IT løsninger, og kontroll på innsamlet materiale. Anleggenes kostnad med prøvetaking er ikke inkludert.

Konklusjon

Vår anbefaling for sporing av rømt oppdrettslaks er å kombinere DNA- og grunnstoffanalyser i fiskens skjell. Det bør samles inn referansematerialer jevnlig gjennom produksjonsfasen. I tillegg bør det samles inn et eget referansemateriale i forbindelse med større rømminger. Løsningen gir god presisjon, er kostnadseffektiv og vil kunne oppklare de fleste rømmingssituasjonene.

Summary

In 2014, SalMar, Marine Harvest, and Lerøy Seafood embarked on a project to develop and test a method to track farmed salmon based on the elements naturally found in fish scales. The project was carried out in collaboration with VESO, the Geological Survey of Norway (NGU), and the Norwegian Veterinary Institute (VI) and was financed by the participating fish farms, the FHL Environmental Fund, Norwegian Seafood Federation, and FHF. Through the course of the project, new fish farms joined, in the end representing 65% of the annual smolt stock in Norway. Samples have been registered from 56 680 fish divided into 1 028 submissions from 71 hatcheries and 157 offshore fish farms.

Results

So far, the main result from the study is the ability to distinguish between onshore hatcheries and between offshore fish farms. It has been shown that the incorporation of elements in the scale reflects the environment the fish has been exposed to throughout its life, thus acting as a time line. This time line can be used in many contexts:

- Analysis of the ratio of strontium (Sr) and barium (Ba) along a transect from the center of the scale out to the edge can be used to identify the sclerite created when the fish moved from fresh water to salt water. This Sr/Ba trend can also differentiate between groups of fish.
- While a fish is in a hatchery, a freshwater element profile is created. Freshwater profiles of 24 groups from 18 hatcheries located along the coast were separated from each other with a precision of 95.9%, indicating this as an important factor defining groups, also after the fish have spent time in seawater.
- The seawater profile in 17 groups after two months in the ocean gave an average classification precision of 74.2% (32.0 - 95.5%).
- The seawater profile along the outer edge of the scale was used to differentiate between two salmon farms in an escape scenario. 86 of 92 scales (93.5%) were correctly classified, where 79 of these 86 had higher than 98% probability of coming from the correct sea location.

Simulated Escape

A simulated salmon farm escape was conducted using data collected from six farms (11 groups). Cross validation gave a median precision of 94.2% (88.2-97.2%) for groups raised in hatcheries with only fresh water and 72.4% (48.9-82.5%) for groups raised in hatcheries that added salt to the fresh water. It was possible to exclude fish not belonging to the escape situation by uncovering the groups and individual fish not represented in the reference material. The origin of the escaped group was narrowed down to two locations, which both had fish from the same hatchery. Through the use of Sr/Ba, the freshwater profile, and the seawater profile in the outer edge of the scale, the fish farm where the escapees originated was identified with a precision of 93.5%, with 79 of 92 scales giving more than a 98% probability of belonging to the correct group.

The results from the simulated escape show the method can be used in the investigation of an escape situation. Fish in the same group retain a common element profile after one year in seawater, and it is possible to identify fish not belonging to the escape being studied. The seawater profile can give additional information about the escaped group, and the outer edge of the scale can be used to differentiate between farms.

Statistical methods increase the accuracy of the tracking method, avoiding the identification of the wrong farm as the source of an escape. When the reference material is known, it is possible to choose a level of precision, based on different cut-off values. Defining cut-off values affects how often one concludes with the correct farm, how often one concludes with an incorrect farm, and how often no conclusion can be made. Such decisions on precision must be made on a case by case basis and are affected by the number of farms being compared and how unique the scale's element profile is. In the simulated escape, the probability of concluding with the wrong farm was less than $1/10^{16}$.

Stability of the Element Profile

After the fish are moved to seawater, a gradual change in the chemical composition of the scales occurs. The greatest changes happen in a short period after introduction to seawater, subsiding thereafter. Fish within a group still identify as a group, showing similar changes in element profile. Therefore, the freshwater profile can still be used as a tracking device up until the fish are slaughtered. Comparing freshwater profiles for a group after two months in the ocean to the original profiles gave an average classification precision of 86.6%. Comparing freshwater profiles after 12 months in seawater and the same after 9 months in seawater gave an average classification precision of 92.5%. If reference material is obtained once a month the first two months and then every 3-4 months until slaughter, a classification precision of >90% is expected throughout the lifecycle of the farmed salmon. This is on par with the original precision between hatcheries.

Returning to Fresh Water

Preliminary results from an experiment moving fish to fresh water after they had been in the ocean indicate the method can also be used for recently escaped fish that have found their way into rivers. After the fish spent a month in fresh water, the results show that the element profile is recognizable when compared to the time at sea. This, along with the stability shown from 9 to 12 months at sea (>90%), indicates the method gives good precision for recently escaped fish (within 3 months) also when the fish have returned to fresh water. The results suggest that the element profile changes less during the transition from sea to freshwater than during the initial transition from hatchery to sea. With further work, it is expected that escaped fish can be identified a longer time after an escape than what has been documented so far.

Collection of Reference Material

There are many ways to collect reference scales to be used as a basis for tracking. In this report, a combination of two methods is recommended: a collection only in connection with a discovered escape and a consistent collection of scales throughout the fish production process. A quick assembling of reference scales only for discovered escapes requires less work and costs less to get samples; however, if the escape is not recognized in time, the chance to trace back escaped individual fish is lost. In addition, the risk of not having enough available material from the actual escape increases. The fish from the culpable farm could already have been slaughtered, or for a variety of reasons, material from this farm could have not been collected. If reference material is acquired throughout the production process, it is much more likely relevant material will exist when an escaped fish is found. The disadvantage is the cost of taking samples many times and keeping an archive of all the reference material. A combination of the two methods assures access to the best possible material and takes into account a possible lack of scale samples that each method individually could result in. It also assures access to material when investigating both large escapes and individual escaped fish. The tracking alternatives, except for the collection of material only when an escaped fish is discovered, assume that the salmon industry has clear documentation of where and when fish are transported throughout the production cycle but give no limits on logistics.

Further Development of the Methodology

Studying additional techniques in scale analysis is expected to give more information, and a combination of different analysis methods can improve the precision. A consequence of the current method is that the concentrations of rare earth elements (REE) fall below the limit of detection and are therefore left out of the analysis. Changing the way material is extracted from the scale could increase the amount of REE, allowing research into the ratios and stability of REE within the salmon scales. Isotopes of individual elements could also be looked into.

Further work is needed to achieve better precision for some groups coming from hatcheries that blend salt water with fresh water. Possible improvements include methods not using the fresh water to salt water transition point, such as measuring along a line scan from the center out to the edge of the scale or using relative abundances of isotopes from the same element.

Application

The results show that element analysis can solve many of the challenges associated with fish tracking. Element analysis in combination with DNA-family tracking (DNA) would be an even better solution. Both methods can be based on scales, easing the collection and storage of sample material. The methods each have their strengths while compensating for each other's weaknesses. DNA is a precise tool allowing large analysis volumes and fast results at a relatively low cost. Used alone, however, it presumes restrictions on logistics in the salmon industry, especially the transfer of fish between farms, when identifying the farm that the fish escaped from.

Element analysis gives information on hatcheries and farms but has capacity limitations compared to DNA. However, it removes the need for the restrictions on logistics that the DNA method sets. Therefore, a combination of the methods is ideal, giving a complete tracking method. This can give a high precision when identifying escaped fish while allowing farms to continue to have flexibility in their fish production strategies.

To ensure best possible precision and to avoid unnecessary extra analyses, the salmon industry should have a complete overview of where fish with different DNA combinations are found.

Analysis Capacity

The time between receiving scales and obtaining results depends on many variables. Analyzing Sr/Ba and DNA can reduce the number of candidate groups relatively quickly. The analysis time increases with the number of candidate groups and the number of individuals within a group suspected of escaping. With current capacity and methods, two to five weeks is needed to analyze sample material, depending on the number of reference material groups and whether the scales are large or small.

When the framework for the tracking method has been established, the analysis time can be adjusted depending on how quickly results are needed.

Economy

Element analysis requires an annual budget of approximately 15 million Norwegian kroner. This includes full use of current analysis capacity, necessary support and development of IT solutions, and control over the collection of reference material. The sampling costs for the fish farms are not included.

Conclusion

It is our recommendation that a combination of DNA and element analysis in fish scales is used to track escaped farmed salmon. Reference material should be collected from fish farms throughout the production process and additionally from specific locations in relation to a large escape situation. This solution gives good precision, is cost effective, and can identify the source of an escaped fish in most situations.

1. Innledning

Basert på kunnskap omkring fiskens evne til å avsette grunnstoffer i skjell tok SalMar, Marine Harvest og Lerøy Seafood i 2014 initiativ til Prosjektet FarmSalmTrack. Målet for prosjektet var å undersøke om det lot seg gjøre å etablere en sporingsmetode for rømt oppdrettsfisk basert på grunnstoff i fiskens skjell. Internasjonale studier indikerte at innholdet av grunnstoffer i vannet som fisken oppholdt seg i ble avleiret i skjellet til en gjenkjennelig profil for enkelte fiskearter. Et tidligere utført pilotprosjekt (Flem et al., 2005) indikerte at en kunne finne gjenkjennelige profiler for grupper av laks. Prosjektet ble finansiert av anleggene som deltok i prosjektet, FHL Miljøfondet, Sjømat Norge og FHF og gjennomført i samarbeid med VESO, Norges geologisk undersøkelse (NGU) og Veterinærinstituttet (VI). Nye anlegg har kommet til; ved prosjektets avslutning representerer ordningen 65 % av næringas årlige smoltutsett. Det er registrert prøver fra 56 680 fisk fordelt på 1 028 innsendelser, 71 settefiskanlegg og 157 matfiskanlegg.

Ved prosjektets oppstart var idéen at det skulle opparbeides en database med referanseprofiler som rømt fisk kunne sammenliknes opp mot. Stabilitetsstudier har vist at denne framgangsmåten alene ikke kan gi god nok presisjon for hele produksjonsfasen og det er derfor foreslått en løsning med gjentatt innsamling av prøvemateriale gjennom produksjonsfasen. Dette skaper en utfordring med hensyn til analysekapasitet som kan løses på en god måte ved å kombinere grunnstoffanalyser med DNA-familiesporing. Forslaget til løsning for sporing av rømt oppdrettslaks vurderes derfor å ligge innenfor opprinnelig målsetting.

Sluttrapporten består av en hoveddel og vedlagte delrapporter for problemstillingene som er belyst i prosjektet. Hoveddelen inneholder faglig bakgrunn for metoden, oppsummering av delrapportene, angivelse av analysetid og kostnader ved implementering av metoden, samt konklusjon med vurdering av anvendelse.

Prosjektets styringsgruppe har bestått av:

Alf Jostein Skjærvik, SalMar, leder
Øyvind Oaland, Marine Harvest
Roar Paulsen, Lerøy Midt
Arne Ruud, Veterinærmedisinsk Oppdragssenter AS (VESO)
Aina Valland, Sjømat Norge
Ketil Skår, Veterinærinstituttet (VI), sekretær

Kjell Maroni, Fiskeri og havbruksnæringens forskningsfond (FHF). FHF-ansvarlig for prosjektet

Prosjektets referansegruppe har bestått av:

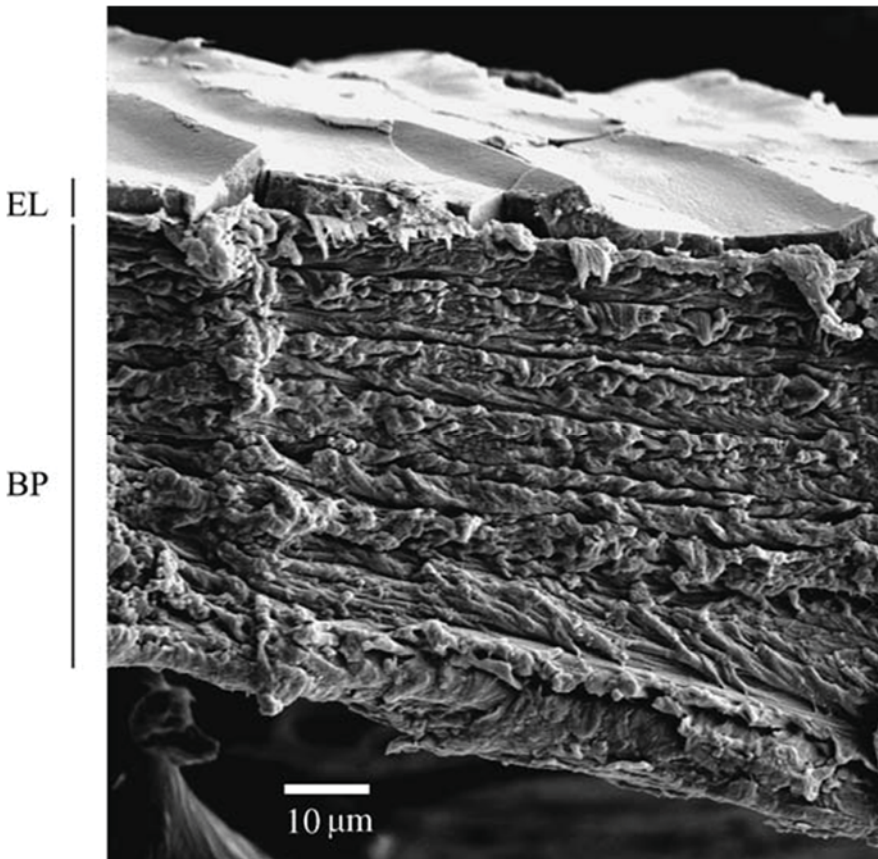
Sigmund Sevatdal, Veterinærmedisinsk Oppdragssenter AS (VESO), leder
Edgar Bruun, Veterinærinstituttet (VI)
Tom Heldal, Norges geologiske undersøkelse, (NGU)
Håvard Rue, Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU)

Prosjektet er finansiert av bedriftene som har deltatt i prosjektet (gjennom en avgift pr utsatt fisk), FHF, Miljøfondet og Sjømat Norge.

2. Bakgrunn

Fisk tar opp grunnstoff løst i vann via gjellene. Fra gjellene transporteres grunnstoff med blodet rundt i kroppen. Her bygges de inn i blant annet kalsiumrike beinstrukturer som bein, finnestråler, tenner, otolitter og skjell. I skjell bygges grunnstoff inn i det kalsiumrike øvre sjiktet.

Skjellene inngår som en del av fiskens hud. Huden består i grove trekk av to lag; et ytre (epidermis) og et indre; underhuden (dermis). Skjellene vokser fra lommer i dermis og beskytter dypere hudlag mot ytre påvirkning og skader. De har gjerne en elliptisk form, er relativt flate, uten tenner og ganske gjennomsiktige. De ligger lagvis og skråstilt i huden, dekkes delvis av dermis og er helt dekt av epidermis. Kun et mindre felt av bakre del av hvert skjell er synlig.

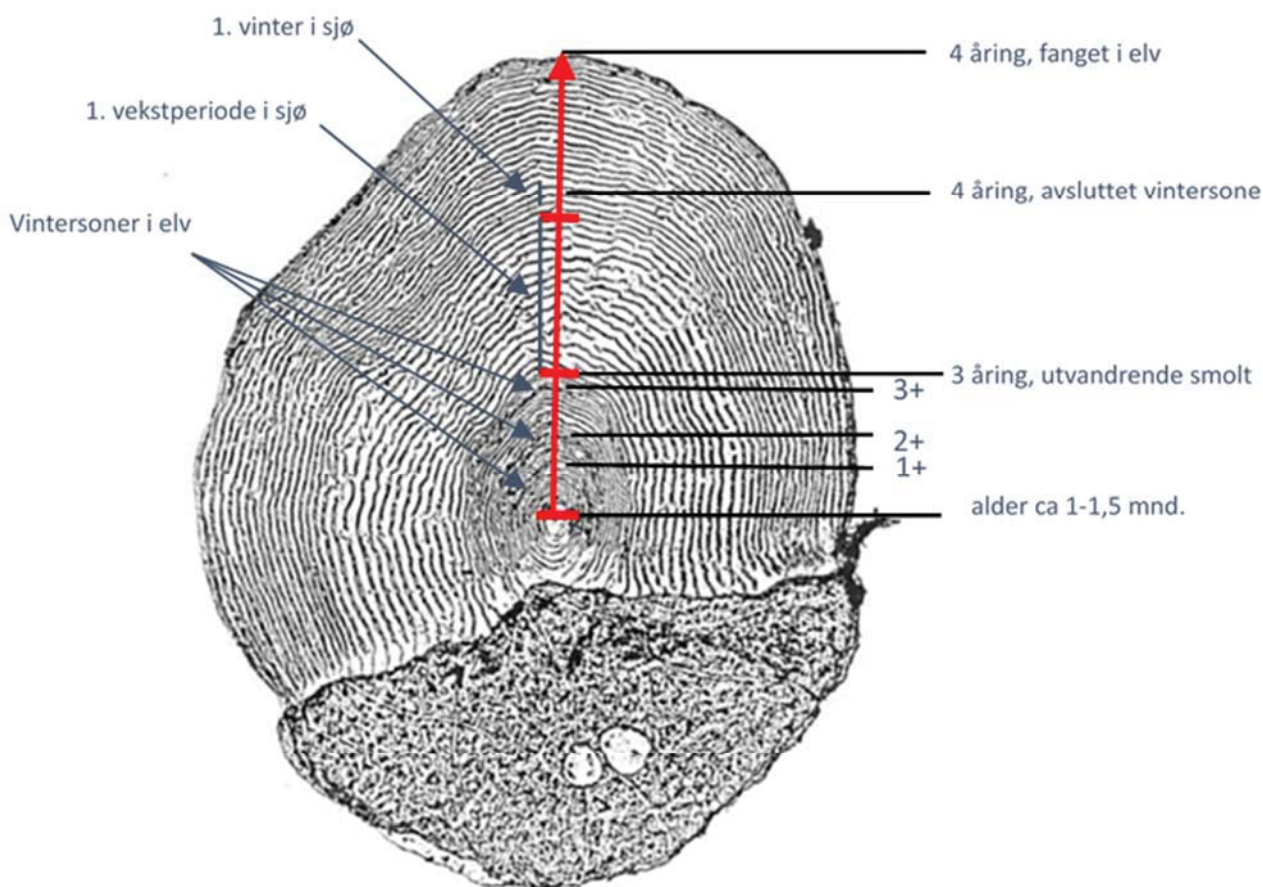


Figur 1. Bildet viser et vertikalt snitt gjennom et lakseskjell (bildet tatt med scanning elektronmikroskop). EL angir det harde og mineralrike ytre laget av hydroksyapatitt. På overflaten sees skjelllets skleritter som små forhøyninger i det jevntykke sjiktet. BP angir basalplaten som består av tett sammenvevde lagvise kollagene fibermatter. Basalplaten øker i tykkelse mot sentrum av skjellet (høyre side i bildet) (Bildet hentet fra Hutchinson & Trueman (2006)).

Lakseskjell er sammensatt av to lag, et øvre og et nedre lag. Det øvre laget er relativt hardt og består av mineralrik hydroksyapatitt, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, HAP-laget. Laget øker i areal men beholder samme tykkelse etter hvert som det vokser (HOLA et al., 2009; Guambe et al., 2012). Skjellets nedre lag består av kollagene fibermatter (basalplaten). Basalplaten øker i tykkelse etter hvert som skjelllets areal øker. Nye fibermatter bygges fortløpende inn på undersiden av skjellet og hvor hvert nytt lag dekker hele skjelllets areal. Vekstformen gjør at basalplaten har sin største tykkelse ved sentrum av skjellet og avtar utover mot kanten (Figur 1) (Hamada et al., 1995; Bigi et al., 2001; Torres et al., 2008; Garrano et al., 2012; Zhu et al., 2012).

Langs ytterkanten og overflaten av HAP-laget dannes det regelmessige foldinger (Figur 1). De kan sees som konsentriske ringer i overflaten og kalles skleritter (Figur 2). Perioden frem til det dannes en ny skleritt kan variere men synes å ligge ganske fast i lengre perioder av året. Fisk som deler et felles habitat synes å ha omtrent samme antall dager mellom dannelse av en ny skleritt (Fisher & Pearcy, 1990; Friedland et al., 1993; Wells et al., 2003a; Hubley et al., 2008; Jensen et al., 2012). I vårt arbeide er det lagt til grunn at det i snitt tar 7.6 dager (± 0.26), mellom hver ny skleritt (Flem et al., 2017). Resultatene harmonerer med tidligere undersøkelser (Fisher & Pearcy, 1990; Friedland et al., 1993; Wells et al., 2003a).

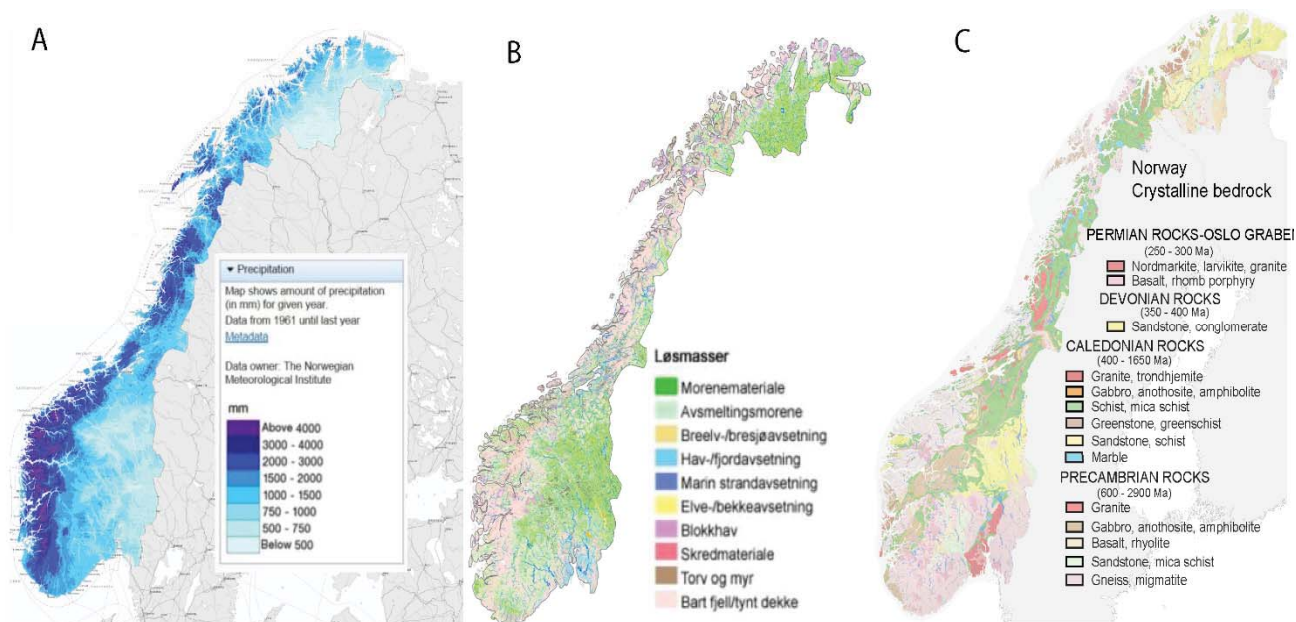
Skjellets fysiske struktur og sklerittmønster forblir i stor grad uendret gjennom fiskens liv. Egenskapen gjør at det er mye benyttet ved aldersbestemmelse og tilbakeberegning av vekst (Dahl, 1909; Fraser, 1916; Lee, 1920). Skjellet kan sees på som en tidslinje, og gir et godt bilde på fiskens alder, hvor mange vintre den har levd, og hvordan den har vokst gjennom ulike perioder i livet (Figur 2). Forskjeller i sklerittmønster grunnet forskjeller i vekstmønster benyttes for å skille oppdrettslaks fra vill laks (Lund, et al., 1989; Gausen & Moen, 1991; Lund & Hansen, 1991; Fiske et al., 2005).



Figur 2. Bildet viser skjell av en fire år gammel vill laks. Skjellet er orientert med fronten opp. Den delen av skjellet som er synlig på fisken er den bakre og pigmenterte delen. Sklerittene sees som konsentriske ringer. De er bølgeomønstre i overflaten av skjellens HAP-lag. Variasjon i avstand mellom sklerittene gir et bilde på variasjonen i fiskens tilvekst. Fisken på bildet vokste opp i ferskvann og brukte her tre år på å bli smolt. Vintersonene med vekststagnasjon sees som tre markerte mørkere ringer. Fisken vandret ut i sjøen som treåring og hadde god tilvekst den første sommeren i havet. Skjellet kan sees på som en tidslinje fra den dannes tidlig på yngelstadiet og frem til fisken dør.

Det er store regionale og lokale variasjoner i sammensetning av bergarter og løsmasser i Norge, både når det gjelder kjemisk sammensetning og i hvor stor grad vannkjemien i vassdrag og kystvann preges av dette gjennom erosjon, suspensjon og ved utlekking til vannfasen (Figur 3). Elvetilførsler og direkte utslipp til norske havområder fra ti av de største elvene i Norge viser en generell nedgang i mengde næringssalter og metaller siden målinger startet i 1990 (Høgåsen et al., 2011). Det er stor variasjon i konsentrasjon og mengde mellom vassdragene, men også gjennom året og fra år til år i det enkelte vassdraget.

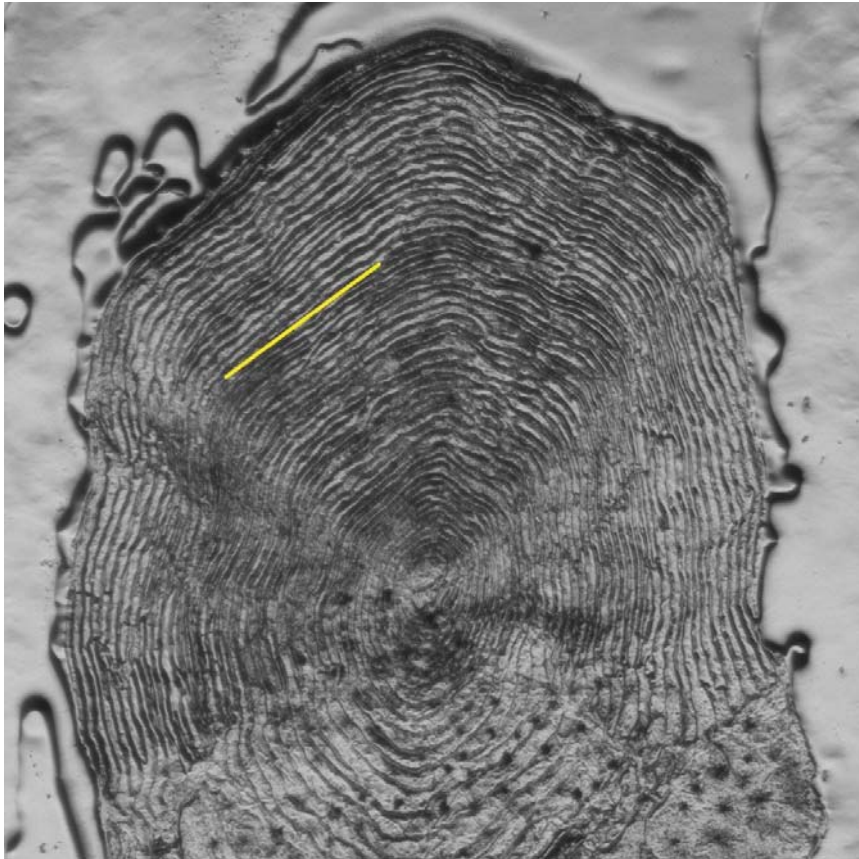
"Kyststrømmen" er en hyppig fluktuerende og kileformet ferskvannsstrøm som hovedsakelig gjør seg gjeldende i overflatenære vannmasser langs norskekysten. Det anslås at nær halvparten av reduksjonen i salinitet i kyststrømmen skyldes tilførsler fra norske vassdrag (Havforskningsinstituttet, 2014). Til tider måles det verdier av salinitet helt ned mot halvparten av det som er vanlig for sjøvann. Variasjonen i kjemisk sammensetning av ferskvann mellom geografiske områder over tid forventes å bidra til variasjonen mellom både settefiskanlegg og matfiskanlegg.



Figur 3. A) Årsnedbør (mars 1977- mars 1978) (www.senorge.no); B) Løsmassegeologi i landsdekkende detaljeringsgrad (<http://geo.ngu.no/kart/losmasse>); C) Berggrunnsgeologi i landsdekkende detaljeringsgrad (Sigmond, 1985).

De fleste undersøkelsene av grunnstoff i kalsiumrike strukturer hos fisk er gjennomført med bruk av otolitter. Konsentrasjoner av grunnstoff i skjell og otolitter er vist å være korrelert (Campana, 1999; Campana et al., 2000; Wells et al., 2003b; Muhlfeld et al., 2005; Ramsay et al., 2011; Muhlfeld et al., 2012). Konsentrasjonen er i regelen høyere i skjell enn i otolitter (Campana, 1999). Det er også vist å være en positiv sammenheng mellom konsentrasjon av grunnstoff i skjell og otolitter, og konsentrasjon i vannet hvor fisken lever (Campana et al., 1995; Wells et al., 2000a; Wells et al., 2000b; Wells et al., 2003b; Wells et al., 2003c; Ramsay et al., 2011). Prøvetak og analyser av otolitter er imidlertid langt mer upraktisk og arbeidskrevende enn bruk av skjell hvor fisken ikke må avlives.

Grupper av fisk som deler en felles vannkilde (felles vannmiljø) forventes å etablere en felles profil av grunnstoff i skjell. Stasjonær laksefisk fra ulike geografiske områder viser forskjell i sammensetning av grunnstoff i skjell (Muhlfeld et al., 2005; Courtemanche et al., 2006; Clarke et al., 2007; Ramsay et al., 2011; Ryan et al., 2016). Likeledes er det funnet forskjeller mellom grupper av anadrom fisk fra ulike geografiske områder (Wells et al., 2000b; Flem et al., 2005; Adey et al., 2009). Fisk som eksponeres for vann fra det samme vanninntaket i et settefiskanlegg til samme tidsperiode forventes å etablere en felles "ferskvannprofil". Tilsvarende vil fisk som deler en merd etablere en felles "sjøvannprofil" (Figur 4).



Figur 4. Bilde av matfiskskjell med angivelse av overgang fra ferskvann til sjøvann (gul strek). Ferskvannsprofilen ligger innenfor den gule streken og sjøvannsprofilen ligger utenfor. Foto: Vegard Sollien, VI.

Skjellenes fysiske plassering, deres bygning, struktur og vekstform samt at de kan prøvetas uten å måtte avlive fisk gjør at de kan ha et stort potensiale som bærere av informasjon om fiskens liv. Mulighetene til gjentatt prøvetak bidrar også til å øke bruksområdet for skjell. Det er derfor grunnlag for å utrede om sammensetning av grunnstoff i skjell kan benyttes til sporing av fisk.

I dette prosjektet er følgende forutsetninger lagt til grunn:

- 1: Fisken som deler en felles vannkilde/deler et felles vannmiljø vil etablere en felles profil av grunnstoff i sine skjell.
- 2: Ferskvannsprofil: En gruppe i settefiskanlegg defineres som all fisk som deler en felles vannkilden de siste 6 ukene før utsett til sjø og som prøvetas og settes i sjø mest mulig samtidig. Gruppen kan være fordelt på flere kar i anlegget. I denne perioden etableres gruppens ferskvannsprofil. Perioden er valgt til dels av hensyn til logistikken og fordi det er den lengste perioden så seint i settefiskfasen at fisken står i ro i sine kar før utsett til sjø.
- 3: Sjøvannsprofil: Fisk som deler en felles sjømerd de første 8 ukene etter utsett til sjø defineres som en gruppe i sjø. Denne perioden er valgt fordi en profil bør etableres så tidlig som mulig etter overgang til sjø.

3. Oppsummering av delrapporter

Kapitlet oppsummerer delrapportene i prosjektet. Nærmere beskrivelse av de ulike arbeidene er gitt i delrapport A-H.

3.1 Logistikk (Delrapport A)

Innsendte skjellprøver registreres i en database og lagres til senere bruk. Databasen inneholder en fullstendig oversikt over alle mottatte skjellprøver, hvilke anlegg som har sendt inn prøver, dato for prøvetak og flytting av fiskegrupper mellom anlegg. Informasjon om anleggene knyttes opp mot akvakulturregisteret. Det er totalt registrert 1 028 innsendelser i databasen, fordelt på 71 settefiskanlegg og 157 matfiskanlegg. Lageret av skjell kombinert med databasen representerer et skjellkartotek med tilhørende logistikkbeskrivelser som kan benyttes som referansematerialer i oppklaring av rømminger.

3.2 Innledende analyser (Delrapport B, C og D)

Resultatene for klassifiseringspresisjon av grupper basert på ferskvannsprøve og sjøvannsprøve tyder på at det analyseres et tilstrekkelig antall skjell og fisk i forsøkene.

3.2.1 Analysemetode (Delrapport B)

Tre analyseområder på skjellet ble benyttet for å danne profiler for fiskegruppene; ferskvannssonen som er dannet mens fisken står i settefiskanlegget danner ferskvannsprøven, mens sjøvannssonen etter fem uker i sjø og sonen i ytterkant av matfiskskjell danner sjøvannsprøven. En profil består av konsentrasjoner av opptil 21 grunnstoff som er valgt på bakgrunn av et pilotstudie hvor det ble analysert for nærmest alle grunnstoff i det periodiske system. For å standardisere posisjonene for analyse av ferskvann- og sjøvannsprøvene har det vært behov for å orientere seg langs sklerittene utover på skjellet. Fordi konsentrasjonen av Ba normalt er høyere i ferskvann enn i sjø og konsentrasjonen av Sr følger motsatt mønster representerer overgangen til sjø en endring i konsentrasjonsforhold som kan benyttes som et ankerpunkt for orientering langs sklerittene. Posisjonen for overgang til sjø ble bestemt ved punktanalyser fra sentrum og mot kanten av skjellet. Fra dette punktet ble det telt 3.5 skleritter inn mot senterplaten for analyse langs en til to skleritter i ferskvannfasen. Fra samme punkt ble det telt 5 skleritter utover på skjellet for analyse i sjøfasen. Posisjonering for analyse i ytterkant av matfiskskjell ble gjort ved å telle fire skleritter inn fra kanten. Alle analyser i denne rapporten ble utført på venstre side av skjellet dersom annet ikke er angitt. Alle analyser ble utført på dobbelfokuserende sektor felt induktivt koblet plasma massespektrometer (HR-SF-ICP-MS) koblet til en eximer laser. Ved bruk av laser vil prøvemengden som ablateres variere med tid både innen en prøve og mellom prøver på grunn av mineralagets varierende hardhet. For å kompensere for dette er Ca benyttet som intern standard.

3.2.2 Sammenlikning av frontskudd og sideskudd (Delrapport C)

Det ble vurdert to ulike måter å analysere skjellene på: frontskudd, der LA-ICP-MS-analysen ble utført med abladering langs to skleritter i fronten av skjellet, og sideskudd, der analysen ble utført på tilsvarende måte på venstre side av skjellet. En test for å undersøke hvilken av disse to metodene som ga best resultater ga en marginal fordel til sideskudd, men forskjellene kan ikke sies å være signifikante. Sklerittenes vekstmønster er tydeligere på siden enn i front, noe som gjør det enklere å oppnå presis posisjonering. Det ble derfor valgt å gjennomføre analysene langs siden på skjellet.

3.2.3 Variasjon i kjemisk profil for ett individ kontra flere individ (Delrapport D)

For å undersøke nødvendig prøvestørrelse (antall skjell som må analyseres) for å kunne definere en gruppeprofil ble det bestemt å sammenlikne variasjonen i profilen på enkeltindivider og mellom individer. Resultatene viste at data fra skjell av ett individ har lavere variasjon enn data fra skjell fra flere individer. Dette betyr at det bør analyseres skjell fra flere individer for å gi et representativt bilde av en gruppe.

3.3 Etablering av profiler (Delrapport E og F)

3.3.1 Kartlegging og klassifisering av kjemisk profil i skjell fra 24 grupper settefisk (Delrapport E)

For å kunne spore fisk tilbake til riktig lokalitet, må det være mulig å skille mellom profilene av grupper settefisk fra ulike anlegg. For å undersøke dette ble det analysert profiler for skjell fra 24 ulike grupper av settefisk fordelt på 18 anlegg. Kryssvalidering av en klassifiseringsmodell plasserte 95.9% (1 292 av 1 347) av skjellene til riktig gruppe, det vil si at det er mulig å skille mellom grupper fra ulike settefiskanlegg. Resultatene viser også at det er mulig å skille mellom ulike grupper fra samme anlegg med presisjon på 93.0%. Sr og Ba viste seg å være de to viktigste indikatorene for gruppetilhørighet. Klassifiseringspresisjonen uten Sr falt til 92.2%, mens uten Ba falt den til 93.4%

3.3.2 Kartlegging og klassifisering av sjøvannprofil i skjell fra 17 grupper matfisk (Delrapport F)

For å undersøke om sjøvannprofilen kan benyttes i forbindelse med sporing ble det samlet inn skjell fra 17 anlegg fra et bredt geografisk område. Det ble deretter kryssvalidert en klassifiseringsmodell på dette datasettet. Klassifiseringspresisjonen på sjøvannprofilene varierte fra 32.0% til 95.5% med gjennomsnittlig klassifiseringspresisjon på 74.2%. Det ble også vist at profiler fra nærliggende lokaliteter kan være forskjellige.

3.4 Stabilitetsstudier (Delrapport G, H og J)

3.4.1 Ferskvannprofilens stabilitet etter 2 måneder i sjø (Delrapport G)

Ferskvannprofilene av seks grupper settefisk ble sammenliknet med ferskvannprofilene av samme grupper fisk etter to måneder i sjø. Disse gruppene ble deretter forsøkt klassifisert av et utvalg av fire modeller trent på 31 grupper settefisk. Klassifiseringspresisjon varierte fra 65.9% til 100%, med 87.0% av skjellene riktig klassifisert.

Videre analyser viste at konsentrasjonen av flere grunnstoff i settefiskprofilen endrer seg i løpet av de to månedene. Endringen i hvert enkelt grunnstoff varierende fra gruppe til gruppe. Endringene var i varierende grad utslagsgivende for klassifiseringspresisjon: grupper med lav stabilitet klassifiserte mindre nøyaktig enn grupper med høy stabilitet. Klassifiseringsalgoritmen presterte bra i dette tilfellet med relativt få grupper, men det er forventet at desto flere grupper modellene må skille mellom i ferskvannfasen, desto mer kritisk vil stabiliteten i profilen bli. Resultatene viste at profilene endret seg etter eksponering for sjøvann, men at gruppene fortsatt lot seg skille ved hjelp av kryssvalidering. Dette indikerer at gjentatte prøvetak er en mulig løsning på problemet.

3.4.2 Langtidsstudie av ferskvannprofilens stabilitet for fisk satt i sjø (Delrapport H)

Basert på funnene fra studiet av ferskvannprofilen etter 2 måneder i sjø ble det gjennomført en langtidsstudie av ferskvannprofilen til matfiskgruppene. Fem av anleggene ble fulgt videre med prøvetak etter 4, 6, 9 og 12 måneder. I tillegg ble det lagt til en ny gruppe som ble prøvetatt i settefiskanlegg og etter 2, 4 og 6 måneder. Hensikten var å undersøke hvor mye en profil endres over tid, om den er forutsigbar, og hvorvidt profilen stabiliseres etter en viss tidsperiode.

Resultatene viste at det var et tydelig fall i klassifiseringspresisjon over tid. Etter 12 måneder i sjø varierte klassifiseringspresisjonen fra 0 til 50%, med et gjennomsnitt på 24.6%. Dette tyder på at profilen for gruppene endres over tid, slik at de drifter vekk fra den gjenkjennbare ferskvannprofilen. Selv om konsentrasjonen av de enkelte grunnstoffene i profilene endres fremstår fiskegruppene fortsatt som forskjellige, definerte grupper.

Dynamikken mellom grunnstoffene er komplisert, og ser ut til å variere fra gruppe til gruppe. For enkelte grunnstoff ser endringene ut til å være til dels avhengig av de opprinnelige verdiene i ferskvann, mens for andre grunnstoff er det ikke funnet en slik sammenheng.

Endringene i profil viser at den opprinnelige planen om å sammenlikne profiler av rømt fisk opp mot en referansedatabase vanskelig lar seg gjennomføre. Fire mulige løsninger på endringene i profiler ble derfor undersøkt: fjerne grunnstoffene som drifter mest, ulike modeller for å tilbakeberegne profilene, lage en erfaringsbasert modell basert på den observerte dynamikken, og gjentatt prøvetak av samme gruppe over tid. Det siste alternativet ga klart best resultater ved sammenlikning av grupper som hadde stått 9 måneder i sjø med grupper etter 12 måneder i sjø (gjennomsnittspresisjon på 92.5%).

Endringene i profilen over tid kan kompenseres for ved at en samler inn gjentatte prøver gjennom hele produksjonstiden i sjø. Ut fra foreløpige resultater bør et nytt prøveuttak hver 4-12 uke være tilstrekkelig. Siden endringene ser ut til å være størst i perioden rett etter flytting fra ferskvann til sjøvann, vil det være mulig å samle inn prøver ofte i starten, og deretter redusere frekvensen etter hvert.

3.4.3 Ferskvannsprofilens stabilitet etter tilbakeføring til ferskvann (Delrapport J)

Tre grupper fisk ble tilbakeført til ferskvann og prøvetatt jevnlig for å se om ferskvannsprofilen holder seg stabil i overgangen fra sjøvann til ferskvann. Det ble gjort en klassifisering på de ulike tidspunktene som ga lovende resultater for gruppene uten sjøvannsinnblanding. Med et referansemateriale på 29 grupper var det fortsatt mulig å peke ut riktig lokalitet for disse to gruppene med presisjon på 90-95%. Skjellene som ble feilklassifisert stammet fra lokaliteter med fisk fra samme settefiskanlegg. Presisjonen på gruppen med sjøvannsinnblanding var lavere.

3.5 Simulert rømming: Spring av fisk tilbake til lokalitet (Delrapport I)

I denne undersøkelsen ble det testet om sporingsmetoden kan benyttes i en beredskapssituasjon etter rømming fra sjøanlegg. For å simulere en rømmingssituasjon ble det gjennomført en innsamling av referansemateriale fra matfiskanlegg innen en region som omfattet øyene og områdene rundt Frøya og Hitra samt områdene innover til fastlandet.

Referansematerialet (de aktuelle anleggene innen regionen) som ble samlet inn ble brukt på to ulike måter. I scenario 1 ble det i tillegg til referansematerialet lagt til en gruppe «rømt laks» som kom fra et annet geografisk område og denne gruppen ble forsøkt identifisert for å sikre seg mot «feilaktig skyld» i en slik situasjon. Det ble også brukt kryssvalidering på alle gruppene for å teste om rømt fisk kunne plasseres tilbake til riktig lokalitet.

I scenario 2 ble det brukt samme referansemateriale. I tillegg ble det tatt inn en gruppe fra ett anlegg med ukjent tilhørighet samt andre enkeltfisk. Dette ukjente materialet, kalt «ukjentgruppa», representerer et rømmingsscenario der et gitt antall rømt oppdrettslaks blir fisket opp, og hvor enkelte av de oppfiskede individene tilhører andre rømminger enn den som undersøkes. Undersøkelsene av ukjentgruppa ble utført som en blindtest, og ble plassert tilbake til riktig lokalitet ved bruk av sammensatte analytiske og statistiske metoder.

I scenario 1 ble all rømt fisk som ikke tilhørte referansematerialet identifisert ved hjelp av hierarkisk clustering. Kryssvalideringene ga god presisjon for gruppene som hadde stått på ferskvann i settefiskanlegget; mellom 88.2-97.2% (medianpresisjon: 94.2%). For gruppene som var gitt sjøvannsinnblanding i settefiskanlegget var presisjonen mellom 48.9-82.5% (medianpresisjon: 72.4%).

I scenario 2 ble det vist at det er mulig å identifisere og fjerne materiale som ikke hører hjemme i hovedgruppa rømt fisk basert på ferskvannsprofilen. Det ble deretter gjort en klassifisering av den resterende gruppa for å bestemme hvilken merd den hadde «rømt» fra. Klassifiseringen av ferskvannsfasen identifiserte kun to mulige kandidater; disse kom fra samme settefiskanlegg men fra ulike matfiskanlegg. En analyse i ytterkant av skjellene med påfølgende klassifisering plasserte 86 av 92 skjell (93.5%) til riktig lokalitet. 79 av de 92 skjellene hadde mer enn 98% sannsynlighet for å stamme fra denne lokaliteten.

Resultatene viser at metoden kan brukes ved oppklaring av en rømmingssituasjon. Fisk i en gruppe beholder en felles profil etter ett år i sjø, og det er mulig å luke ut fisk som ikke hører til den konkrete rømmingen som undersøkes.

4. Analysetid og kostnader

4.1 Tidsperspektiv analyser

Tidsbruken for analysene vil variere med prøvevolum, størrelsen på skjellene og ønsket presisjon for resultatet (økt antall skjell per gruppe gir som regel økt presisjon).

Per i dag utføres analysene på to LA-ICP-MS-maskiner med en kapasitet på ca. 100 skjell per maskin per dag. I tillegg til antall skjell er størrelsen på skjellene avgjørende med tanke på plass. Fordi skjellene vokser i takt med fisken er det mulig å analysere flere skjell fra settefisk enn fra større fisk. Det kan regnes omtrent 100 skjell fra settefisk mot 30-35 skjell fra matfisk som har stått omtrent et år i sjø.

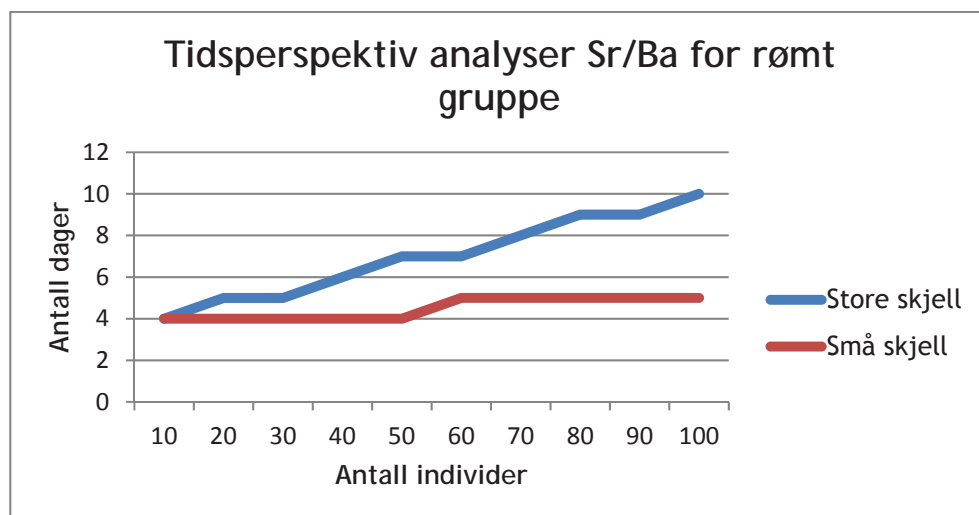
Arbeidsprosess

Analyse av skjell fra rømt gruppe og referansemateriale kan utføres på følgende måte:

- Analyse av Sr og Ba konsentrasjoner utover på skjellet og en ratio av disse vil gi første indikasjon på gruppetilhørighet for den rømte gruppen. Tidsperspektivet vil variere med antall individer som undersøkes. Det er ønskelig å analysere minimum fire skjell per individ i denne gruppen på grunn av erfaring med at rundt 25% av skjellene forventes å bli forkastet i løpet av analysene. Selve Sr/Ba-analysen av 20 individer vil sannsynligvis ta en til to dager, mens 40 individer vil analyseres på to til tre dager dersom det er store skjell (fisk som har stått rundt et år i sjø), se Figur 5.

Resultatene fra denne analysen kan begrense referansematerialet betraktelig basert på vannmiljø i settefiskanlegget. Denne informasjonen er lett tilgjengelig. Eventuell DNA-analyse kan bidra til å kutte referansematerialet ytterligere.

Arbeidet med å luke ut fisk som ikke hører til i hovedgruppen av rømt fisk vil begynne samtidig. Dette vil baseres både på Sr/Ba-ratio og analyse av ferskvanns- og sjøvannsprøfil.

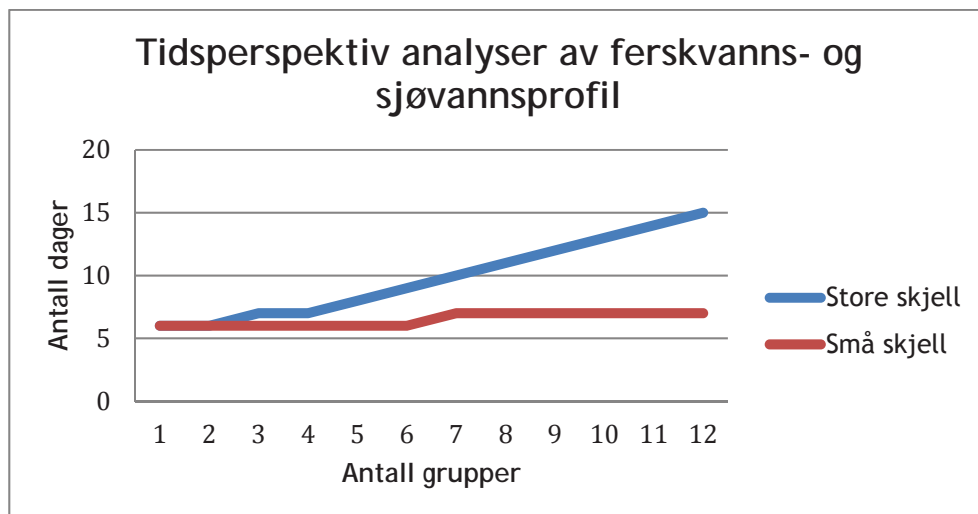


Figur 5. Overslag av tidsbruk basert på analyse av fire skjell per individ og to maskiner. Store skjell (blå linje) er basert på analyse av 30 skjell per maskin per dag, små skjell (rød linje) er basert på analyse av 100 skjell per maskin per dag. Fire dager for en gruppe er minimum på grunn av forbehandling av skjellene (montering, press, tegning i laser).

- Analyser av ferskvanns- og sjøvannsprøfil av individer i den rømte gruppen og referansematerialet brukes i en statistisk vurdering for å finne riktig lokalitet for rømmingen.

Med utgangspunkt i analysetid av store skjell på 30 skjell per maskin per dag, og små skjell på 100 skjell per maskin per dag, vil seks dager være minimum antall dager for analyse (figur 6). Dette skyldes

forbehandlingen av skjellene (montering, press og tegning av ablasjon). For sikker karakterisering av en gruppe bør det beregnes 30 skjell til analyse. I praksis vil det analyseres flere skjell per individ fra gruppen av rømt fisk enn fra en gruppe i referansematerialet.



Figur 6. Overslag av tidsbruk basert på analyse av 30 skjell per gruppe og to maskiner. Store skjell (blå linje) er basert på analyse av 30 skjell per maskin per dag (tilsvarende omtrent en gruppe), små skjell (rød linje) er basert på analyse av 100 skjell per maskin per dag.

To ulike scenarier er skissert i Tabell 1, et med relativt stort referansemateriale og mange individer rømt fisk, og et scenario med mindre referansemateriale og færre individer. Total analysetid forutsetter at ingen av gruppene i referansematerialet kan utelukkes etter Sr/Ba-analysene eller ved hjelp av DNA. Analysene av Sr/Ba og ferskvannsprøfil innebærer både forarbeid og selve analysene.

Tabell 1. To eksempel som viser et overslag på antall dager fra mottak av skjell til et resultat foreligger (total analysetid i dager)

	Stor rømming, stor fisk		Liten rømming, små fisk	
	Referansemateriale	Rømt fisk	Referansemateriale	Rømt fisk
Grupper	10	1	5	1
Individer	16	50	16	25
# skjell per individ	2	4	2	4
# skjell	320	200	260	100
Totalt antall skjell	520	200	360	100
Analyse Sr/Ba (dager)		6		4
Analyse ferskvannsprøfil (dager)	15	3	6	1
Total analysetid (dager)	24		11	

Analysetiden i disse eksemplene er basert på at materialet analyseres først og bearbeides når all data fra den aktuelle analysen er tilgjengelig. Det vil være mulig å redusere analysetiden ved å starte med et mindre antall skjell fra hver gruppe (rundt ti skjell), for deretter å supplere fortløpende. På denne måten vil en tidlig få en indikasjon på hvilken lokalitet den rømte fisken hører til og denne indikasjonen vil bli mer sikker etter hvert som mer data analyseres.

Tidsperspektivet for hvor lang tid det vil ta fra skjell er mottatt til et sikkert resultat foreligger er avhengig av flere variabler. Forundersøkelser som Sr/Ba og DNA kan redusere antallet kandidatgrupper relativt raskt. Analysenetiden kan reduseres ytterligere med raskere tørke- og monteringsprosess, automatiske analyser på natt, økt bemanning og mer utstyr.

Når rammene for sporingen er besluttet, og det er bestemt hvor raskt det er nødvendig å ha resultatene, vil analysetiden kunne tilpasses de gitte rammene.

4.2 Kostnadsvurderinger

Metoden som er benyttet i prosjektet har ikke et etablert marked, og metoden er avhengig av at forskning og utvikling skjer parallelt med anvendelsen. En må derfor etablere et miljø som har et langsiktig ansvar for denne oppgaven. Det har dermed ingen hensikt å vurdere kostnad pr analyse - en må vurdere hvor mye det koster å sikre en hensiktsmessig maskinpark, tilstrekkelig analysekapasitet og nødvendig forskning. En forutsetning for at grunnstoffanalyser kan benyttes vil være at det holdes en stab med kompetent personell til håndtering av utstyr og metodikk. Antall folk og mengde utstyr må tilpasses reelt analysebehov. Dette vil være avhengig av de valg næring og myndigheter tar, og bør vurderes over tid. Grunnstoffanalyser er i stor utvikling - de metodene vi benytter var ikke mulige for bare 5 år siden. De muligheter som er belyst i rapporten er basert på våre første utprøvinger av en ny metode.

Prosjektet har i dag to LA-ICP-MS-maskiner med to tilhørende offline laser-enheter. Det anbefales innledningsvis å utnytte denne kapasiteten, og finansiere en bemanning som sikrer dette.

Etablering av et sporingssystem basert på DNA og grunnstoffanalyser forutsetter god oversikt over logistikken i næringen. I tillegg må en ha fortløpende kontroll og kvalitetssikring på innsamling av referansemateriale. Innsamlingen må skje innenfor de gruppedefinisjoner som metoden setter. En vesentlig forutsetning for effektive løsninger er at IT-løsningene i prosjektet videreutvikles. Dette er derfor tatt med i kostnadsvurderingene. For å sikre god utnyttelse av midlene anbefales det at en velger samme økonomiske løsning som prosjektet har blitt gjennomført etter: det defineres en ramme og faktureres etter medgåtte utgifter innenfor rammen.

Det bør totalt legges opp til en ramme på ca. 15 millioner kroner pr år. Dette inkluderer full utnyttelse av dagens analysekapasitet, nødvendig støtte og utvikling av IT løsninger, og kontroll på innsamlet materiale.

Hvis en forutsetter at det settes ut ca. 350 millioner fisk pr år gir det en kostnad for grunnstoffanalyser på under 5 øre pr utsatt fisk. Anleggenes kostnad med prøvetaking er ikke inkludert.

5. Konklusjon med vurdering av anvendelse

Ut fra de resultatene vi har så langt tegner det seg muligheter og begrensninger for hvordan grunnstoffanalyser av skjell kan benyttes som sporingsmetode. Resultatene viser at FarmSalmTrack (FST) kan spille en sentral rolle ved sporing av oppdrettslaks.

5.1 Sporing basert på grunnstoffanalyser alene

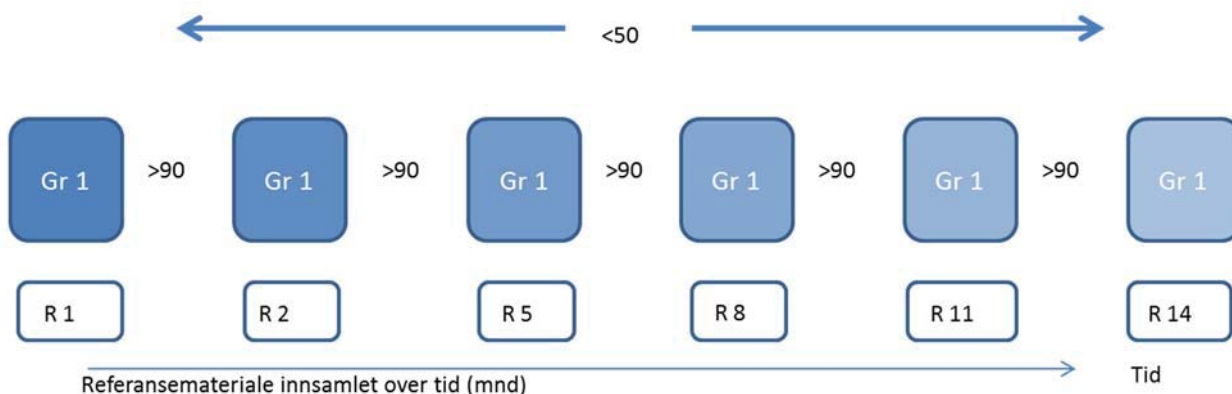
Hovedresultatet er at variasjonen i vannkjemi mellom settefiskanlegg gir gjenkjennelige profiler, og gjør det mulig å skille mellom settefiskanlegg og til dels også mellom grupper av fisk fra samme settefiskanlegg. Sjøvannprofilen kan brukes til å skille mellom lokaliteter, med litt lavere presisjon enn for settefiskanlegg. I tillegg kan en benytte ytterkanten av skjellet for å skille mellom sjølokaliteter. Forholdet mellom Sr og Ba brukes til å finne utsettingstidspunkt, om fisken har gått på sjøvannstilblending eller ikke og til en viss grad gruppetilhørighet. For gruppene med sjøvannstilblending er enkelte grupper vanskeligere å klassifisere, men de fleste innen denne kategorien plasseres også bra.

Resultatene fra den simulerte rømmingen viser at grunnstoff i skjell kan anvendes for å oppklare en pågående rømmingsepisode i en region. For den ukjente gruppa var det mulig å identifisere fisk og grupper av fisk som stammet fra andre rømminger enn situasjonen som utløste innsamlingen. Dette er et vesentlig resultat for å sikre en presis karakterisering av den gruppen rømt fisk en ønsker å undersøke. Den ukjente gruppa ble klassifisert til riktig anlegg med høy presisjon. De statistiske metodene avdekker i tillegg når vi mangler referansemateriale fra den rømte fisken. En unngår dermed å identifisere feil anlegg som kilde til rømmingen.

Hvor lenge fisken har vært på rømmen kan være avgjørende for hvilken informasjon som fortsatt er tilgjengelig i skjellet. Ut fra våre resultater er det høy sannsynlighet for å spore fisk som har vært på rømmen i 3-4 måneder.

Rømt oppdrettsfisk returnerer til kysten og vandrer opp i elver. Innledende forsøk med tilbakeføring av fisk til ferskvann viser at profilen er godt gjenkjennelig etter en måned etter at voksen fisk ble overført til ferskvann, når en sammenlikner mot referansematerialet fra den siste tiden i sjø. Dette, sammen med stabiliteten etter 9 og 12 måneder i sjø, tyder på at metoden kan benyttes med god presisjon for nylig rømt fisk, også når den har vandret opp i elv. Videre arbeid våren 2017 vil dokumentere stabiliteten til profilen etter overføring til ferskvann i en periode på inntil 3 måneder.

Resultatene fra stabilitetsstudiene viser at ferskvannprofilen endres over tid i sjø. Imidlertid er forandringene gradvise, og felles for fisk i den enkelte gruppe over tid, som betyr at man kan oppdatere profilen med gjentatte prøvetak. Presisjonen ved sammenligning av 9 og 12 måneder er på høyde med den opprinnelige kryssvalideringen av settefiskprofiler. Ferskvannprofilen kan derfor brukes til å skille mellom grupper av fisk fram til slakt forutsatt at man tar nye prøver av gruppen gjennom hele produksjonsperioden (Figur 7).



Figur 7. Skjematisk illustrasjon av klassifiseringspresisjonen for en gruppe der referansematerialet samles flere ganger utover i produksjonen, sammenliknet med om en kun har et referansemateriale tatt ved flytting fra settefiskanlegg til sjø. Profilen til eventuell rømt fisk (Gr 1) sammenliknes med det sist tilgjengelige referansematerialet (R). Hvis gruppe 1 (Gr 1) rømmer etter 6 måneder i sjø vil en sammenlikning med referansematerialet etter 5 måneder (R5) i sjø gi en klassifiseringspresisjon på $>90\%$. Hvis en gruppe rømmer etter 13 måneder vil sammenlikning mot referansematerialet etter 11 måneder (R11) fortsatt gi en klassifiseringspresisjon på $>90\%$. Hvis det ikke samles inn nytt referansemateriale etter overføring til sjø vil klassifiseringspresisjonen falle til under 50% over tid.

I det videre arbeidet bør en øke presisjonen for fiskegrupper som har gått på sjøvannstilblending. En måte kan være å utvikle en ny måte å sammenstille lagret informasjon i skjellet som ikke er avhengig av å finne utsetningstidspunkt. En kontinuerlig analyse fra senter og ut kan være en slik metode.

Våre resultater viser at en kan gjennomføre sporing basert på grunnstoffanalyser alene, men det er noen utfordringer. Hvis denne metoden brukes alene i beredskapssituasjoner er utfordringen at antallet grupper som skal sammenliknes kan bli uforholdsmessig stort, vi antar at 15 anlegg med flere merder pr anlegg ikke vil være uvanlig. Det vil enten ta lang tid å gjennomføre analysene, eller en må ha en større maskinpark enn man har i dag. Siden metoden egner seg best for færre grupper, vil et stort antall kandidatanlegg føre til en lavere sannsynlighet for at man kan oppklare rømmingen. Metoden er best egnet for sporing av fisk som nylig har rømt, kanskje med en begrensning på 3-4 måneder i sjø før den går opp i elv. For fiskegrupper med en karakteristisk profil vil vi kunne spore lenger. På grunn av disse utfordringene vil det være lite hensiktsmessig å bruke grunnstoffanalyser alene på enkeltfisk

5.2 Sporing basert på kombinasjonen av grunnstoffanalyser og DNA

Resultatene viser at grunnstoffanalyser kan løse mange av utfordringene ved sporing, men brukt alene vil den ha noen begrensninger. Ut fra vår kunnskap om DNA familiesporing (heretter kalt DNA) mener vi at sporingen blir best ved å kombinere disse metodene.

Ved å kombinere DNA og grunnstoffanalyser benytter en to metoder med helt forskjellig utgangspunkt. Fordelen med å kombinere disse metodene er at en kan utnytte begge metoders fortrinn, og kompensere for metodenes svakhet:

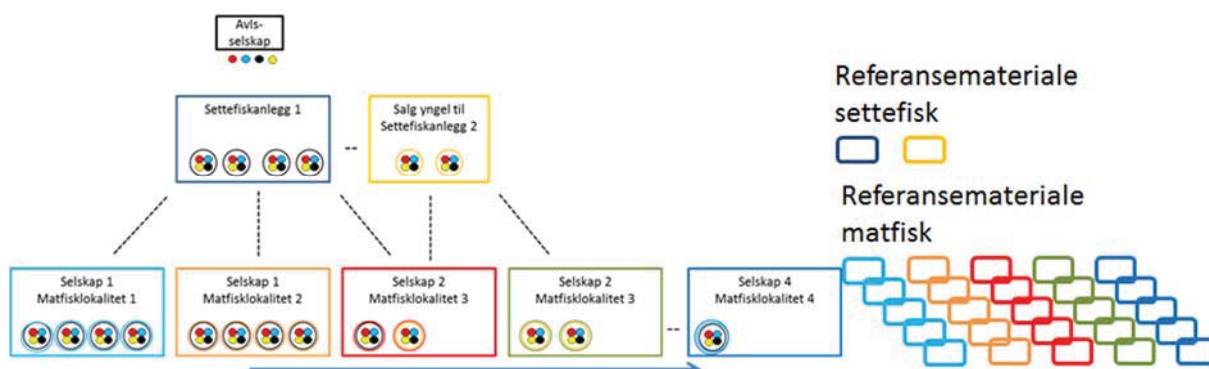
- DNA er et presist verktøy som muliggjør store analysevolum og raske resultat relativt billig. DNA gir informasjon om opprinnelse, og resultatene er stabile i hele fiskens levetid uavhengig av hvilket miljø fisken lever i. Ulempen med DNA alene er at metoden legger bånd på logistikken helt fra rognstadiet til slakt dersom en skal ha 100% sporbarhet. Dagens praksis, dokumentert gjennom innsendelsene av logistkinformasjon til FST databasen, viser at fisk fordeles, splittes, flyttes, kjøpes og selges i flere faser fra mange settefisk- og matfiskanlegg. Resultatet er at fisk med likt

genetisk opphav står plassert på flere ulike lokaliteter, gjerne med ulike eiere (figur 8). Strengt krav til logistikk kan føre til dårligere utnyttelse av settefisk- og matfiskanleggenes produksjonskapasitet.

Materiale for DNA-profilene eller resultatet av analysene må etableres på avlsstasjonene i forbindelse med stryking. Med et så tidlig uttak av materiale bør det være mulig å ha hele kartoteket klart før smolten settes ut i sjø. Dette legger til rette for en rask vurdering av hvor kilden til DNA-kombinasjonene for rømt fisk kan finnes igjen i næringen.

- Fordelen med grunnstoffanalyser er at metoden kan skille direkte mellom sjølokaliteter, uavhengig av hvilket settefiskanlegg individene kommer fra. Metoden gir dermed rom for at logistikken ved bruk av DNA ikke trenger å være så streng. Uten restriksjoner på logistikken legges det til rette for fortsatt god utnyttelse av produksjonskapasiteten i settefisk- og matfiskanlegg, og samtidig god sporing.

Grunnstoffanalyser er med dagens metodikk en mer arbeidskrevende metode og vil være kostnadskrevende for store volum. I kombinasjon med DNA kan antall grupper som må undersøkes med grunnstoffanalyser reduseres betraktelig, og svaret på analysene vil derfor komme vesentlig raskere. I tillegg vil kombinasjonen av de to metodene utgjøre en ekstra kontroll og sikkerhet med hensyn på riktig identifikasjon av lokalitet/bedrift i rømmingssituasjonene.



Figur 8. Eksempler på hvordan transport av fisk kan skje i næringen, og hvordan relevant referansemateriale kan bygges opp. Det starter med rogn fra avlsselskap til settefiskanlegg 1. Dette anlegget vil normalt sette ut fisk til matfisklokalitet 1 og 2. Ved overskudd av fisk kan det også selge smolt på spot til matfisklokalitet 3. En annen mulighet er å selge et overskudd av yngel til settefiskanlegg 2. Dette anlegget selger smolt til nye kunder. Til slutt kan ulike situasjoner føre til at fisk flyttes fra matfisklokalitet 1 til matfisklokalitet 4. Alle disse settefisk- og matfiskanleggene kan ende opp med fisk med det samme genetiske materiale. Alle gruppene kan imidlertid også ha unike grunnstoffprofiler basert på de ulike vannmiljøene de har vært utsatt for. Grunnstoffanalyser gir da mulighet til å spore tilbake til riktig lokalitet. Innsamling av referansemateriale er angitt som firkanter. Farge på boksene angir respektive settefiskanlegg eller matfiskanlegg.

Den mest effektive måten å kombinere metodene kan være at en lager en database for DNA-profiler tilknyttet ulike selskap, dokumenterer logistikken og lagrer skjell gjennom produksjonsfasen til grunnstoffanalyser for å verifisere eller øke presisjonen ved en gitt hendelse.

Grunnstoffanalyser fungerer best når en skal peke ut anlegget fisken har rømt fra basert på sammenlikning mot et begrenset antall kandidater. Antall mulige anlegg fisken kan ha rømt fra kan reduseres vesentlig basert på DNA-analyser. Ut fra eksisterende resultater kan det se ut som at metoden fungerer best for pågående rømmingssituasjoner. Basert på en kombinasjon av de to metodene kan de brukes til å spore større hendelser, men en vil i tillegg ha gode muligheter til å spore enkeltfisk som har vært på rømmen en periode på 3-4 måneder, kanskje også lenger. En forutsetning for dette vil være at næringa har kontroll på

hvor fisk med lik genetisk sammensetning står til enhver tid. Det betyr ikke at all fisk med samme opphav må stå samlet på en lokalitet. Hver gang fisk flyttes bør det tas prøver, og handlingen registreres. Det bør i de fleste tilfeller være oppnåelig å kunne avgrense behovet for grunnstoffanalyser ned til under 10 grupper når DNA profilen er kjent. I denne situasjonen fungerer grunnstoffanalysene bra.

Enkle løsninger for kontroll og oversikt vedrørende logistikken kan oppnås gjennom en videreutvikling av logistikksystemet som er benyttet i FST prosjektet. Det er mulig å flytte lagret informasjon over på en skyløsning. Det vil gi enkel tilgang på lagringsplass ved behov, og det muliggjør at den enkelte oppdretter kan logge seg på og selv overføre informasjon direkte. Med direkte tilgang vil også oversikt over eget anleggs/selskaps innsendelser være tilgjengelig.

Både DNA og grunnstoffanalyser kan baseres på innsamlede skjell. Skjell er et velkjent biologisk materiale for aktører som jobber med villaks og oppdrettslaks. Det er lett å ta mange prøver, det er stabilt og lett å lagre, og systemene for dette er på plass. For at ikke håndteringen i laboratoriene skal påvirke resultatet av analysene negativt bør en legge opp til et prøvetak som sikrer nok skjell til begge metodene. Det at prøvetakingen av den rømte fisken kan begrenses til ett vev/en struktur gjør innsamling, transport og lagring enklere, og langt billigere.

5.3 Innsamling av referansemateriale

Innsamling av referansemateriale kan gjennomføres på to måter:

- Innsamling i forbindelse med en beredskapssituasjon
- Innsamling med jevne mellomrom gjennom produksjonen

I en beredskapssituasjon der det observeres mye rømt fisk i løpet av få dager i en begrenset region kan det samles inn et tilstrekkelig referansemateriale ved å identifisere lokaliteter i området som fisken kan ha rømt fra, og ta prøver fra disse. (Vi antar at innsamlingen i en slik situasjon skjer på basis av nærhet til området rømt fisk fanges, og ikke ved hjelp av resultater fra DNA-familiesporing). Ordningen er imidlertid sårbar - en risikerer å ikke samle inn prøver fra det anlegget som rømmingen faktisk har rømt fra. Dersom rømmingen har pågått en tid før den oppdages kan fangstmønsteret skape et inntrykk av at kilden er plassert et annet sted enn den reelt sett var. Rømmingen kan ha skjedd i forbindelse med opplasting til slakt, slik at referansematerialet ikke eksisterer lenger. Det kan også være forhold som gjør det vanskelig å hente referansematerialet innen rimelig tid.

Referansematerialet bør samles inn så snart som mulig; det bør ikke ta for lang tid fra rømt fisk er observert til prøvemateriale (skjell fra rømt fisk) er samlet inn. Ut fra resultatene i stabilitetsstudiene bør det i en beredskapssituasjon tas prøver innen en måned for nyutsatt fisk, mens det for større fisk trolig bør skje innen 2 måneder. Dette regimet virker ikke egnet for innsamling av materiale for sporing av enkeltfisk. Prøvetakingen er arbeidskrevende, det må skje tett opp mot rømmingen, og det krever en del forberedelser for å avgrense hvor prøvetakingen skal skje. Enkeltfisk kan fanges langs hele kysten og i de fleste elver- til dels langt fra der rømmingen skjedde. Det er derfor vanskelig å avgrense hvor prøvetakingen skal skje. Sporing av enkeltfisk bør derfor baseres på annet materiale enn innsamlinger fra beredskapssituasjonen.

Strategien for innsamlingen av referansematerialet bør ta hensyn til resultatene i stabilitetsstudiene. Det bør derfor samles inn prøver fortløpende i produksjonsfasen fra og med fisken forlater settefiskanlegget (figur 7 og 8). Resultatene viser at endringene i profilen er størst den første tiden etter overgang fra ferskvann til sjøvann. Vår anbefaling er derfor å samle inn referansemateriale fra utsett til sjø, deretter etter 1 og 2 måneder i sjø, og så hver 3. måned fram til slakt, basert på minimum 6 skjell fra 17 fisk fra hver gruppe til referansemateriale.

Fortløpende prøvetaking av fiskegruppene etter overføring til sjø kan være avgjørende for å kunne spore enkeltfisk. Enkeltfisk fanges langs hele kysten og i alle elver fordelt over mesteparten av året. Det er derfor lite hensiktsmessig å starte større innsamlinger av referansematerialer hver gang en enkeltfisk fanges og skal spores. Et lager av referansemateriale gjør at profilen fra enkeltfisk kan sjekkes opp mot mulige kandidatanelegg uten slike innsamlingsaksjoner av referanseskjell. Det bør imidlertid testes om rømt fisk i sjøen gjennomgår samme endring i profil som gruppen i merden den rømte fra. Hvis den i stor grad gjør det vil et referanselager kunne gi muligheter til å spore fisk som har vært på rømmen også i lengre tid.

Vår anbefaling er å kombinere disse to innsamlingsmetodene. Det vil være den sikreste måten for å unngå mangel på referansemateriale, og vil kompensere for forglemmelser vedrørende innsendelser, eller om en har utelatt anlegg en burde hatt referansemateriale fra. Når en har et referansemateriale innsamlet på denne måten vil en også ha mulighet til å bruke DNA for å bekrefte at de registreringer en har på flytting av fisk stemmer. En slik kvalitetssikring kan være nødvendig - ikke minst i forbindelse med oppbyggingen av systemet. Det bør tas stikkprøver for å kontrollere at prosedyrer og planer er fulgt og at registreringene er i tråd med de faktiske forhold.

5.4 Konklusjon

Vår anbefaling for sporing av rømt oppdrettslaks er å kombinere DNA- og grunnstoffanalyser i fiskens skjell. Det bør samles inn referansematerialer jevnlig gjennom produksjonsfasen. I tillegg bør det samles inn et eget referansemateriale i forbindelse med større rømminger. Løsningen gir god presisjon, er kostnadseffektiv og vil kunne oppklare de fleste rømmingssituasjonene.

6. Videre arbeid

- Stabilitet/drift i profil
 - prøvetakingsfrekvens gjennom produksjonsfasen
 - endringer i profil opp mot gytetid - effekt av kjønnsmodning
 - stabilitetsundersøkelser ferskvann - tilbakeføring av grupper på ulike vannkvaliteter
 - endringer i profil for rømt fisk i sjø sammenliknet med fisk som står igjen i merdene
 - stabilitetsundersøkelser for sjøvannsprofil over tid
 - videre undersøkelser for å kartlegge variasjon i sjøvannsprofil
- Metodeutvikling
 - forbedre klassifiseringspresisjonen for grupper med sjøvannstilblanding
 - analysemetoder: analyse fra senter til ytterkant for å etablere en profikutvikling over tid for gruppene.
 - andre grunnstoff og isotoper til klassifisering
 - bestemme korrelasjon mellom vannkjemi og skjellkjemi
 - videreutvikle statistiske vurderinger/metoder basert på resultater fra faktiske rømmingssituasjoner
- Forskning
 - mekanismer og faktorer som styrer inkorporering og endring av sammensetningen av grunnstoff i skjell
 - sammenheng mellom vanntemperatur (og andre parametere) i forhold til endring og nivå av enkelte grunnstoff i skjelllets apatittlag
- Anvendelse
 - hvordan DNA og grunnstoffanalyser best kan kombineres
 - utvikle og etablere et logistikksystem for innsamlede skjell fra rømt fisk
 - praktiske løsninger for funksjonalitet/bruk av databasen, herunder skyløsning, digitalisert innsendelseskjema, innsyn til egne data for anlegg

7. Referanser

- Adey, E. A., Black, K. D., Sawyer, T., Shimmield, T. M., Trueman, C. N. (2009). Scale microchemistry as a tool to investigate the origin of wild and farmed *Salmo salar*. *Marine Ecology-Progress Series*. 390. 225-235.
- Bigi, A., Burghammer, M., Falconi, R., Koch, M. H. J., Panzavolta, S., Riekkel, C. (2001). Twisted Plywood Pattern of Collagen Fibrils in Teleost Scales: An X-ray Diffraction Investigation. *Journal of Structural Biology* 136, 137-143.
- Campana, S. E., Gagne, J. A., McLaren, J. W. (1995). Elemental Fingerprinting of Fish Otoliths Using Id-Icpms. *Marine Ecology-Progress Series* 122, 115-120.
- Campana, S. E. (1999). Chemistry and composition of fish otoliths: pathways, mechanisms and applications. *Marine Ecology-Progress Series* 188, 263-297.
- Campana, S. E., Chouinard, G. A., Hanson, J. M., Frechet, A., Bratney, J. (2000). Otolith elemental fingerprints as biological tracers of fish stocks. *Fisheries Research* 46, 343-357.
- Clarke, A. D., Telmer, K. H., Shrimpton, J. M. (2007). Elemental analysis of otoliths, fin rays and scales: a comparison of bony structures to provide population and life-history information for the Arctic grayling (*Thymallus arcticus*). *Ecology of Freshwater Fish* 16, 354-361.
- Courtemanche, D. A., Whoriskey, F. G., Bujold, V., Curry, R. A. (2006). Assessing anadromy of brook char (*Salvelinus fontinalis*) using scale microchemistry. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 63, 995-1006.
- Dahl, K. (1909). The assessment of age and growth in fish. *Int. Revue Ges. Hydrobiol. Hydrogr.* 2.
- Fisher, J.P & Pearcy, W.G. (1990). Spacing of Scale Circuli Versus Growth-Rate in Young Coho Salmon. *Fishery Bulletin* 88, 637-643.
- Fiske, P., Lund, R. A., Hansen, L. P. (2005). Identifying fish farm escapees. (I: Stock Identification Methods. pp. 659-680. Redigert av Cadrin, S. X., Friedland, K. D. og Waldman, J. R.) Elsevier Academic Press. Amsterdam.
- Flem, B., Moen, V., Grimstvedt, A. (2005). Trace element analysis of scales from four populations of Norwegian Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) for stock identification using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Appl. Spectrosc.* 59, 245-251.
- Flem, B., Moen, V., Finne, T.E., Viljugrein, H., Kristoffersen, A. B. (2017). Trace element composition of smolt scales from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), geographic variation between hatcheries. *Fisheries Research* 190, 183-196.
- Fraser, C. McL. (1916). Growth of the spring salmon. *Trans. 2. meet. (1915). Pac. Fish. Soc.* 29-35.
- Friedland, K. D., Reddin, D. G., Kocik, J. F. (1993). Marine Survival of North-American and European Atlantic Salmon - Effects of Growth and Environment. *Ices Journal of Marine Science* 50, 481-492.
- Garrano, A. M. C., La Rosa, G., Zhang, D., Niu, L. N., Tay, F. R., Majd, H., Arola, D. (2012). On the mechanical behavior of scales from *Cyprinus carpio*. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 7, 17-29.

- Gausen, D. & Moen, V. (1991). Large-Scale Escapes of Farmed Atlantic Salmon (*Salmo-Salar*) into Norwegian Rivers Threaten Natural-Populations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 48, 3. 426-428.
- Guambe, J. F., Mars, J. A., Day, J. (2012). Application of PIXE in pollution control of the Matola River in Mozambique-analysis of fish scales. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms* 273, 171-172.
- Hamada, M., Nagai, T., Kai, N., Tanoue, Y., Mae, H., Hashimoto, M., Miyoshi, K., Kumagai, H., Saeki, K. (1995). Inorganic Constituents of Bone of Fish. *Fisheries Science* 61, 517-520.
- Havforskningsinstituttet (2014). Temaside. Den norske kyststrømmen.
http://www.imr.no/temasider/kyst_og_fjord/den_norske_kyststrommen/nb-no.
- Hola, M., Kalvoda, J., Babek, O., Brzobohaty, R., Holoubek, I., Kanicky, V., Skoda, R. (2009). LA-ICP-MS heavy metal analyses of fish scales from sediments of the Oxbow Lake Certak of the Morava River (Czech Republic). *Environmental Geology* 58, 141-151.
- Hubley, P. B., Amiro, P. G., Gibson, A. J. F. (2008). Changes in scale circulus spacings of an endangered Atlantic salmon *Salmo salar* population: evidence of a shift in marine migration? *Journal of Fish Biology* 73, 2321-2340.
- Hutchinson, J. J. & Trueman, C. N. (2006). Stable isotope analyses of collagen in fish scales: limitations set by scale architecture. *Journal of Fish Biology* 69, 1874-1880.
- Høgåsen, T., Skarbøvik E., Stålnacke, P., Selvik, J.R., Aakerøy, P.A., Kaste, Ø. (2011). Elvetilførselsprogrammet (RID) - 20 års overvåking av tilførsler til norske kystområder (1990-2009). Datarapport 2 - Tilførsler til havområdene. Norwegian Environment Agency report TA2869/2011.
- Jensen, A. J., Ó Maoiléidigh, N., Thomas, K., Einarsson, S. M., Haugland, M., Erkinaro, J., Fiske, P., Friedland, K. D., Gudmundsdottir, A. K., Haantie, J., Holm, M., Holst, J.C., Jacobsen, J.A., Jensås, J.G., Kuusela, J., Melle, W., Mork, K.A., Wennevik, V., Østborg, G.M. (2012). Age and fine-scale marine growth of Atlantic salmon post-smolts in the Northeast Atlantic. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*. 69, 9, 1668-1677.
- Lee, R. M. (1920). A review of the methods of age and growth determination in fishes by means of scales. *Fishery Invest., Lond., Ser. 2, vol. 4 no. 2*.
- Lund, R. A. & Hansen, L. P. (1991). Identification of wild and reared Atlantic salmon, *Salmo salar* L., using scale characters. *Aquaculture and Fisheries Management*, 22:499-508.
- Lund, R.A., Hansen, L.P., Järvi, T. (1989). Identifisering av oppdrettslaks og vill-laks ved ytre morfologi, finnestørrelse og skjellkarakterer. - NINA Forskningsrapport 001: 1-54.
- Muhlfeld, C. C., Marotz, B., Thorrold, S. R., FitzGerald, J. L. (2005). Geochemical signatures in scales record stream of origin in westslope cutthroat trout. *Transactions of the American Fisheries Society* 134, 945-959.
- Muhlfeld, C. C., Thorrold, S. R., McMahon, T. E., Marotz, B. (2012). Estimating westslope cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkii lewisi*) movements in a river network using strontium isoscapes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 69, 906-915.

-
- Ramsay, A. L., Milner, N. J., Hughes, R. N., McCarthy, I. D. (2011). Comparison of the performance of scale and otolith microchemistry as fisheries research tools in a small upland catchment. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 68, 823-833.
- Ryan, D., Shephard, S., Kelly, F. L., (2016). Temporal stability and rates of post-depositional change in geochemical signatures of brown trout *Salmo trutta* scales. *Journal of Fish Biology*. 89, 3, 1704-1719.
- Sigmond, E. M. O., (1985). Geological map of Norway - scale 1:3 mill. Geological Survey of Norway.
- Torres, F. G., Troncoso, P. P., Nakamatsu, J., Grande, C. J., Gomez, C. M. (2008). Characterization of the nanocomposite laminate structure occurring in fish scales from *Arapaima Gigas*. *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems*. 28, 8, 1276-1283.
- Wells, B. K., Bath, G. E., Thorrold, S. R., Jones, C. M. (2000a). Incorporation of strontium, cadmium, and barium in juvenile spot (*Leiostomus xanthurus*) scales reflects water chemistry. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57, 2122-2129.
- Wells, B. K., Thorrold, S. R., Jones, C. M. (2000b). Geographic variation in trace element composition of juvenile weakfish scales. *Transactions of the American Fisheries Society* 129, 889-900.
- Wells, B. K., Friedland, K. D., Clarke, L. M. (2003a). Increment patterns in otoliths and scales from mature Atlantic salmon *Salmo salar*. *Marine Ecology-Progress Series* 262, 293-298.
- Wells, B. K., Rieman, B. E., Clayton, J. L., Horan, D. L., Jones, C. M. (2003b). Relationships between water, otolith, and scale chemistries of westslope cutthroat trout from the Coeur d'Alene River, Idaho: The potential application of hard-part chemistry to describe movements in freshwater. *Transactions of the American Fisheries Society* 132, 409-424.
- Wells, B. K., Thorrold, S. R., Jones, C. M. (2003c). Stability of elemental signatures in the scales of spawning weakfish, *Cynoscion regalis*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 60, 361-369.
- Zhu, D. J., Ortega, C. F., Motamedi, R., Szewciw, L., Vernerey, F., Barthelat, F. (2012). Structure and Mechanical Performance of a "Modern" Fish Scale. *Advanced Engineering Materials*. 14. 4. B185-B194.

8. Ordliste

Ablasjon (her): En prosess hvor prøvematerialer fjernes fra skjell med bruk av laser. Materialet som fjernes følger med bæregassen ut av prøvekammeret og videre inn i massespektrometeret for analyse.

Anadrom fisk: Ferskvannsfisk som regelmessig vandrer til havet på næringssøk, og tilbake til ferskvann for gyting.

B: Bor, grunnstoff.

Ba: Barium, grunnstoff.

Beredskapssituasjon: En rømming der et større antall rømt fisk fanges i et begrenset område innenfor et begrenset tidsrom.

Beta-dispersjon (her): Gjennomsnittlig avstand fra datapunkter til gruppesentrum. Brukes for å sammenlikne variasjon mellom grupper.

Bæregass: Heliumgass som fører prøvematerialet inn i plasma og videre gjennom analyseapparatet.

Ca: Kalsium, grunnstoff som benyttes som intern standard (IS) i analysene.

Ce: Cerium, grunnstoff.

Centered log-ratio transform (CLR): En transformasjon som benyttes på compositional data for å gjøre det analyserbart med statistiske metoder.

Cluster: En mengde med datapunkter som tilhører samme kategori (her: Fisk eller skjell fra samme gruppe).

Clusteranalyse: En prosess som brukes for å assosiere hvert datapunkt med en cluster.

Compositional data (her): Avhengige og relative data hvor massene i dette tilfellet relateres til en kilo, og oppgitt i mg/kg.

Cr: Krom, grunnstoff.

Cs: Cesium, grunnstoff.

Dendrogram: Et tre-diagram som brukes for å illustrere resultatene av en hierarkisk clustermetode.

Elasmoide skjell: Elasmoide skjell finnes på blant annet laksefisk. De er tynne og overlapper slik at kun en liten del av hvert skjell er eksponert. De består av to lag, en kollagen fibermatte og det øvre hydroksyapatittlaget.

Erstatningsskjell: Dette er skjell som har erstattet et tapt skjell. Skjellet identifiseres gjerne ved at det mangler en intakt sentralplate og gjerne har et unormalt vekstmønster på grunn av at skjellet har vokst raskere enn normalt.

Fe: Jern, grunnstoff.

Ferskvannprofil: Profil av grunnstoff som er hentet fra den delen av skjellet som ble dannet mens fisken sto i ferskvann.

FST: FarmSalmTrack.

Gd: Gadolinium, grunnstoff.

Gruppe: I settefiskanlegg: Fisk som deler en felles vannressurs de siste 6 uker før flytting til sjø og som prøvetas innen et tidsrom på fire dager. Matfiskanlegg: Fisk som står i samme merd de første åtte ukene etter utsett til sjø.

HR-SF-ICP-MS: Dobbelfokuserende sektor felt induktivt koblet plasma massespektrometer, analyseinstrument som sammen med laser benyttes for analysene i dette prosjektet.

Hydroksyapatitt: Hovedkomponenten i skjellets HAP-lag, naturlig forekommende mineralisk form av kalsium apatitt. Kjemisk formel $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$.

IS: Intern standard, benyttes for å kompensere for at prøvemengden som ablateres varierer.

Isometric log-ratio transform (ILR): En transformasjon som benyttes på compositional data for å gjøre det analyserbart med statistiske metoder. Brukes i situasjoner der man vil bevare avstand mellom datapunkter.

K: Kalium, grunnstoff.

Klassifisering: En prosess som forsøker å plassere en observasjon i korrekt kategori (her: Skjell fra fisk og lokalitet).

Klassifiseringspresisjon: Antall skjell som blir klassifisert til riktig anlegg, angitt i prosent.

Kollagen: Langstrakte proteiner i bindevev. De kollagene fibertråene danner skjellets basalplate og utgjør skjellets nederste lag.

Kruskal-Wallis test: En ikke-parametrisk test for å teste om det er signifikante nivåforskjeller mellom to eller flere grupper.

Kryssvalidering (her): En prosedyre for å få et bilde av ytelsen til klassifiseringsmodeller på ny data.

La: Lantan, grunnstoff.

LA-ICP-MS: Angir HR-SF-ICP-MS koblet med laser i denne rapporten. LA står for laser ablasjon.

Li: Litium, grunnstoff.

Mg: Magnesium, grunnstoff.

Mn: Mangan, grunnstoff.

Na: Natrium, grunnstoff.

Nd: Neodym, grunnstoff.

Oppløselighet: Et mål på hvor godt en modell klarer å skille mellom ulike grupper fisk.

Pb: Bly, grunnstoff.

PCA-projeksjon: En metode som tar en mengde med korrelerte variabler og transformerer det til en (ofte mindre) mengde med ukorrelerte variabler. Brukes i denne rapporten for å illustrere data.

Pr: Praseodym, grunnstoff.

Profil: Den kvantitative sammensetningen av grunnstoff i skjell. Profilen viser særpreget til en gruppe/et individ slik at de kan identifiseres.

Random Forest (RF), k-nærmeste nabo (k-*nn*), Linear Discriminant Analysis (LDA), Support Vector Machine (SVM), Naive Bayes (NB): Klassifiseringsmodeller som blir brukt i rapporten.

REE: Sjeldne jordmetaller, opprinnelig betegnelse for oksidene til metallene scandium, yttrium og lantan i gruppe 3 i grunnstoffenes periodesystem, og de 14 grunnstoffene cerium, praseodym, neodym, promethium, samarium, europium, gadolinium, terbium, dysprosium, holmium, erbium, thulium, ytterbium og lutetium som følger etter lantan i periodesystemet.

S: Svovel, grunnstoff.

Sjøvannprofil: Profil av grunnstoff som er hentet fra regionen av skjellet som ble dannet mens fisken sto i sjøvann.

Skleritt: Radiære bremmer eller forhøyninger som dannes regelmessig langs kanten i overflaten av skjellets øvre og ytre lag av HAP-laget. Skleritter kan ses på som årringene i et tre.

Sm: Samarium, grunnstoff.

Sr: Strontium, grunnstoff.

Testdatasett: Datasettet som blir brukt for å teste hvor bra modellen yter på ny data (for å unngå overspesialisering på treningsdatasettet).

Th: Thorium, grunnstoff.

Ti: Titan, grunnstoff.

Treningsdatasett: Datasettet som blir brukt for å kalibrere modellen som brukes på klassifiseringsoppgaven. Å kalibrere en modell på basis av et treningsdatasett blir kalt å "trene" modellen.

U: Uran, grunnstoff.

Uteligger: En observasjon vurdert som kvantitativt forskjellig fra resten av datasettet.

Zn: Sink, grunnstoff.

Delrapport A: Logistikk

Logistikk

Alle settefisk- og matfiskanlegg som deltar i prosjektet skal ta skjellprøver av fiskegruppene som settes ut i sjø i løpet av prosjektperioden. De innsendte skjellprøvene registreres i en database og lagres.

Prøvetak

Det tas skjellprøver av fiskegruppene i settefiskanlegg like før de flyttes til sjø, ideelt sett ikke mer enn tre dager før flytting. I matfiskanlegg tas det prøver åtte uker etter utsett. Fem skjellprøver fra hver av 15 individer plukkes med pinsett fra et område omtrent midt på kroppen på venstre side, se vedlegg 1 for prosedyre for prøvetak. Skjellene legges fortløpende opp enkeltvis på et papirark som brettes og legges i en skjellkonvolutt. Produksjonsopplysninger som omhandler fisken, det vil si navn på settefisk- og matfiskanlegg, prøvetaksdato, dato for utsett og fiskelengde blir notert på skjellkonvoluttene og på et eget følgeskjema (Vedlegg 2 og 3).

Database

Databasen inneholder en fullstendig oversikt over alle innsendelser, hvilke anlegg som har sendt inn prøver, dato for prøvetak og flytting av fiskegrupper mellom anlegg. Informasjon om anleggene knyttes opp mot akvakulturregisteret og oppdateres jevnlig. Per 16.februar 2017 er det totalt registrert 1 028 innsendelser i databasen, fordelt på 71 settefiskanlegg og 157 matfiskanlegg. Databasen benyttes for registrering av settefisk- og matfisksaker, oversikt over innsendelser, kontaktpersoner, varsling av kommende prøvetak i anlegg og kartfunksjon som viser plassering av anlegg og flytting av fiskegrupper.

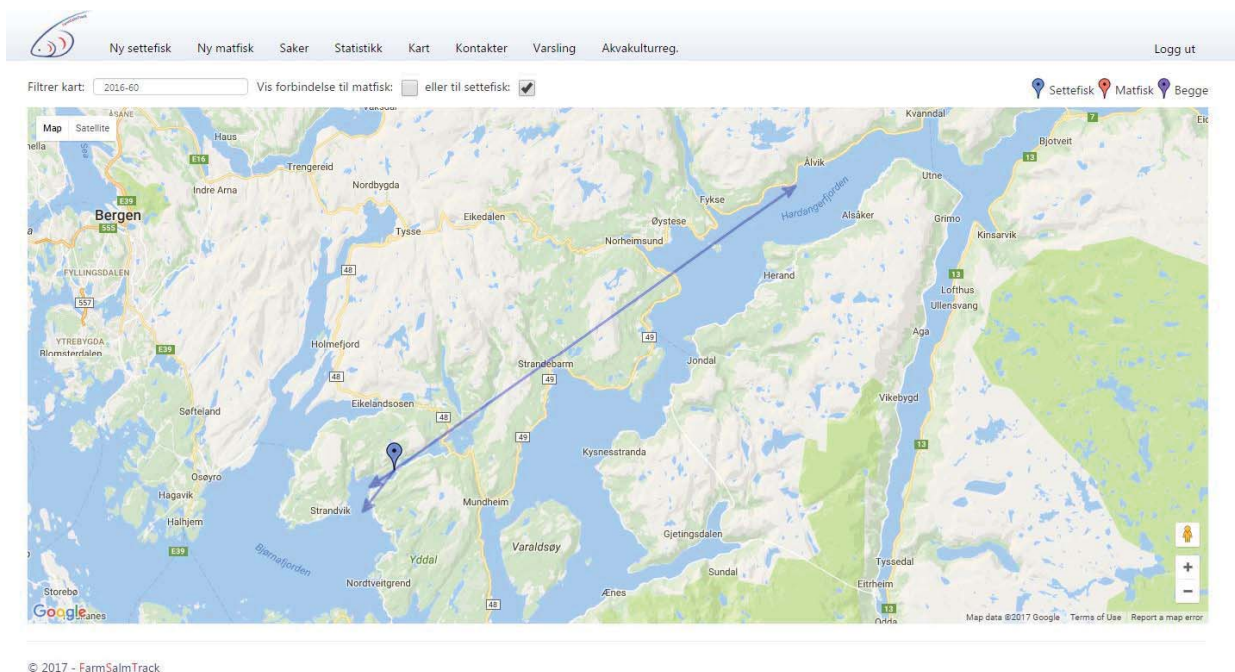
Registrering av saker og koblinger mellom anlegg

Etter mottak av en innsendelse med skjellkonvolutter blir all informasjon om settefisk- og matfiskanlegg, flyttedato, prøvetakingstidspunkt og fiskelengder kontrollert og lagt inn i databasen. Innsendelsen blir tildelt saksnummer og prøver fra en merd eller et kar blir registrert med eget undersaksnummer. Skjellkonvoluttene oppbevares mørkt og tørt i romtemperatur på et lager.

Registrering av settefisksak utløser en varslingsrutine i databasen. Det blir sendt varsel om dato for kommende prøvetak på epost og SMS til kontaktperson på matfiskanlegg som mottar fisken. Ved registrering av matfisksak blir informasjon om fiskegruppen kontrollert mot tidligere innsendt informasjon fra settefiskanlegg. Saksnummer på settefisksaker registreres opp mot undersaksnummer på matfisksak for søkbar kobling mellom de aktuelle sakene. I tilfeller der det er mottatt skjellprøver fra et settefiskanlegg, men tilsvarende prøver fra matfiskanlegg ikke mottas innen det definerte tidsrommet for prøvetak tas det kontakt med det aktuelle anlegget per telefon eller epost.

Kartfunksjon

Databasen inneholder en kartfunksjon som viser alle anlegg som er registrert i databasen, anleggene markeres med røde (matfisk) og blå (settefisk) punkter i kartet. Det er mulig å se en oversikt over alle saker som er assosiert med et anlegg, samt se koblinger mellom anleggene. Kartfunksjonen gjør det mulig å få en enkel oversikt over geografisk tilhørighet og hvordan fisken flyttes (figur 1).



Figur 1. Skjerm bilde av kartfunksjon i databasen. Kartet er filtrert slik at det kun vises en settefisksak. I denne saken er det sendt fisk til tre ulike matfiskanlegg. De blå linjene viser hvor matfiskanleggene ligger. Settefiskanlegget er angitt med et blått punkt.

Delrapport B: Analysemetode

Analysemetode

Alle analyser av grunnstoff i skjell ble utført på LA-ICP-MS. Før selve analysene ble skjellene montert på objektglass, vasket og presset, samt at posisjon og bane for ablasjon ble påtegnet. Bakgrunn for valg av parametere brukt i analysene beskrives i slutten av denne delrapporten.

Forbehandling av skjellprøver

Utvelgelse av prøvemateriale ble gjort på bakgrunn av kravene for de ulike problemstillingene som skulle undersøkes. Typiske parametere var prøvetakingstidspunkt, differanse mellom prøvetak og utsett til sjø, tid i sjø, geografisk område og vannmiljø i settefiskanlegget.

All preparering av skjell ble utført i laboratorium med krav til renhet for å hindre kontaminering. Før skjellene ble montert ble de kontrollert for skader og erstatningsskjell. Erstatningsskjell dannes der opprinnelige skjell har falt av og representerer et kortere tidsintervall i fiskens liv, de er derfor ikke ønskelige i analysene. Skjellene ble montert på objektglass med dobbeltsidig tape (Scotch Double Sided, 19 mm). For å fjerne eventuelle forurensninger og slim ble de monterte skjellene bløtlagt i H₂O₂ (5%) i to minutter før de ble skylt godt med ultrarent vann og lufttørket. For å holde skjellene flate ble de lagt i press i 48 timer.

Etter pressing ble skjellene påtegnet posisjon og mønster for ablasjon med en offline-laserenhet (Eximer UP193UC laser fra NewWave, ESI, utstyrt med NWR TV2 ablasjonskammer). Det ble brukt to ulike metoder for ablasering; punktablasering og linjeablasering. Figur 1 viser hvordan ablaseringene ble tegnet på skjellet.



Figur 1. Skjermbilde av tegnede laserablaseringsbaner. Bildet til venstre viser punktablasering utover på skjellet (gule firkanter), mens bildet til høyre viser linjeablasering langs sklerittene (gule linjer).

Laserablasjon induktivt koblet plasma massespektroskopianalyse

Alle analyser ble utført på et dobbelfokuserende sektor felt induktivt koblet plasma massespektrometer (HR-SF-ICP-MS) av typen ELEMENT2 fra Thermo Scientific. Instrumentet var satt opp med Jet Interface. Prøveinnføringsystemet var en eximer NewWave UP193UC laser fra NewWave, ESI, utstyrt med NWR TV2 ablasjonskammer. Helium ble brukt som bæregass for å bedre ablasjons- og transportforholdene (Gunther & Heinrich, 1999). Bæregassen ble blandet med argon før ioniseringen for å oppnå stabile og optimale eksitasjonsbetingelser. Typiske innstillinger av ICP-MS og laser er gitt i Tabell 1.

Tabell 1. Typiske instrumentinnstillinger.

ICP-MS	
Plasmaspenning	1300 W
Støttegass (auxiliary) Ar	1.0 l min ⁻¹
Ar bæregass	1.0 l min ⁻¹
”Samplercone”	High performance Ni, Jetutgave
”Skimmercone”	High performance Ni, X-utgave
Injector tube	Quartz
Ion lens settings	Justert daglig for optimal signalstyrke og masseoppløsning
CD-2 Guard Electrode	Ja
Skanntype	”Magnethopp” med elektrisk skanning over småmasseområder
Antall skann	20
Laser	
Frekvens	20 Hz
Energy fluens	4 J/cm ²
He bæregass	0.8 l min ⁻¹

Kalibrering

Ekstern multistandard kalibrering ble gjort ved hjelp av tre silikatglass fra National Institute of Standards and Technology, USA (NIST SRM 610, 612, og 614). I tillegg ble egne standarder av apatitt laget for prosjektet av Nanograde Ltd. Sveits (Tabersky et al., 2014). Analysepresisjon og reproducerbarhet mellom analysesekvenser ble kontrollert ved å analysere en uavhengig apatittstandard i tillegg til NIST612. Metodikk for beregning fra instrument-rådata til konsentrasjonsdata er beskrevet i detalj i Flem et al. (2002, 2005 og 2017).

Valg av grunnstoff

Typisk konsentrasjonsnivå for mange grunnstoffer i HAP-laget i skjellet hos Atlantisk laks er ikke angitt i litteraturen. Det ble derfor gjort et pilotstudie som inkluderte fire lokaliteter, hvor det ble analysert for nærmest alle grunnstoffer i det periodiske system som kan danne positive ioner i et argon plasma. Grunnstoffene ble vurdert mot tellefeil i detektoren. Dersom tellefeil i detektor utgjorde mer enn 5 % av målefeilen for alle fire grupper ble også disse grunnstoffene tatt ut av analyseprogrammet.

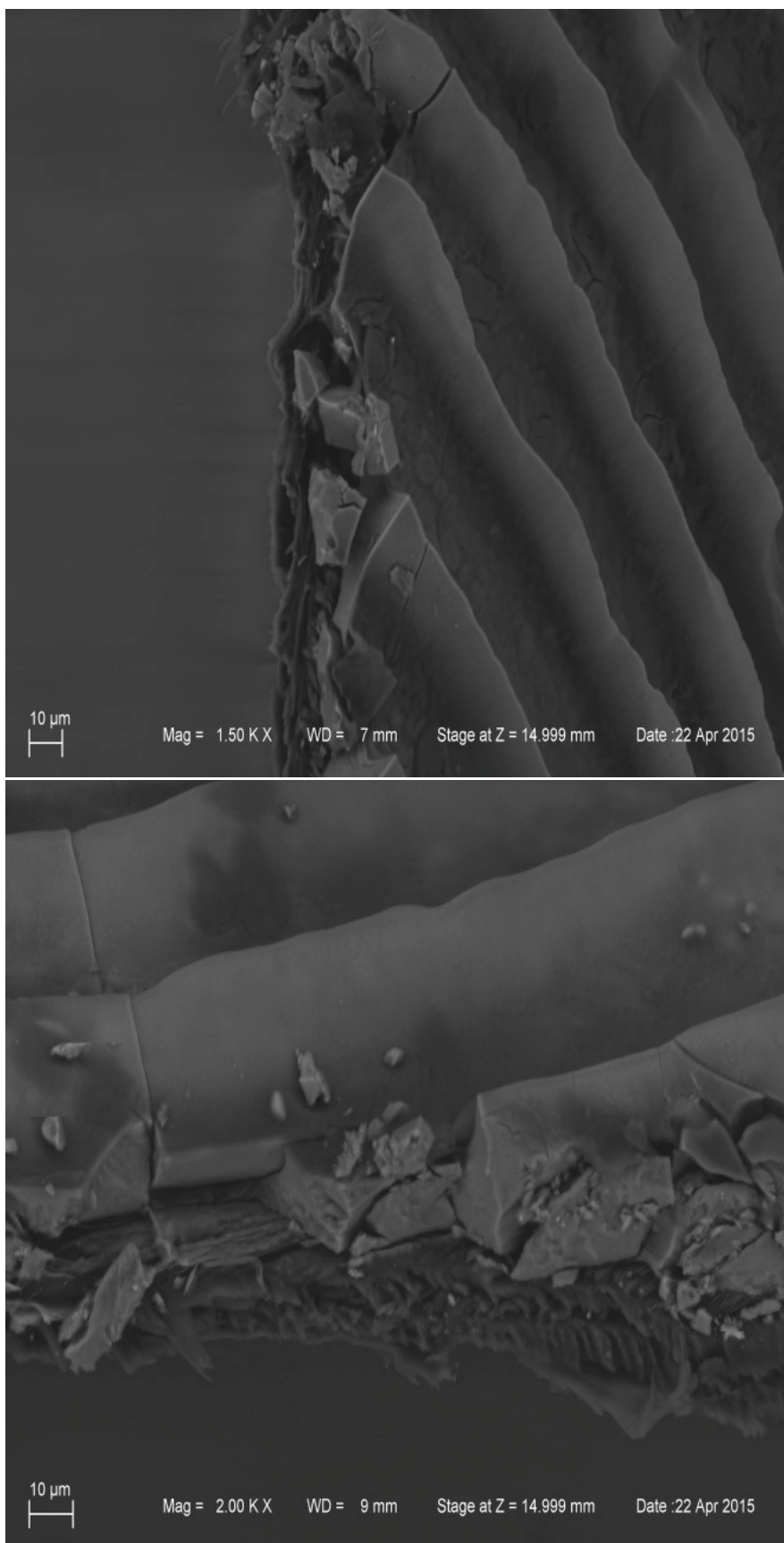
I Tabell 2 er isotopene av grunnstoffene som inngår i analyseprogrammet, brukt masseoppløsning ($m/\Delta m$) og anvendte deteksjonsgrenser angitt. Ved bruk av laser vil prøvemengden som ablateres variere med tid både innen en prøve og mellom prøver på grunn av minerallagets varierende hardhet. For å kompensere for dette må et grunnstoff, gjerne ett av hovedgrunnstoffene analyseres og brukes som internstandard (IS). Vi har fra tidligere god erfaring med å bruke kalsium (Ca) som IS og har satt konsentrasjonen av Ca fast til 37.4 % (Flem et al., 2005; Flem et al., 2017). Isotopen ⁴²Ca er benyttet som IS både i lav masseoppløsning (LR), medium masseoppløsning (MR) og høy masseoppløsning (HR). I LR har ⁴²Ca en spektroskopisk interferens fra 4He38Ar+, men siden denne genereres av gassen og er prøveuavhengig kan den korrigeres for ved å subtrahere det analytiske signalet fra ren gass fra signalet for gass og prøve.

Tabell 2. Isotoper av grunnstoffer som inngår i analyseprogrammet for gruppeklassifisering av Atlantisk laks. Lav masseoppløsning ($m/\Delta m=300$), medium masseoppløsning ($m/\Delta m=4000$) og høy masseoppløsning ($m/\Delta m=10\ 000$) er angitt som henholdsvis LR, MR og HR.

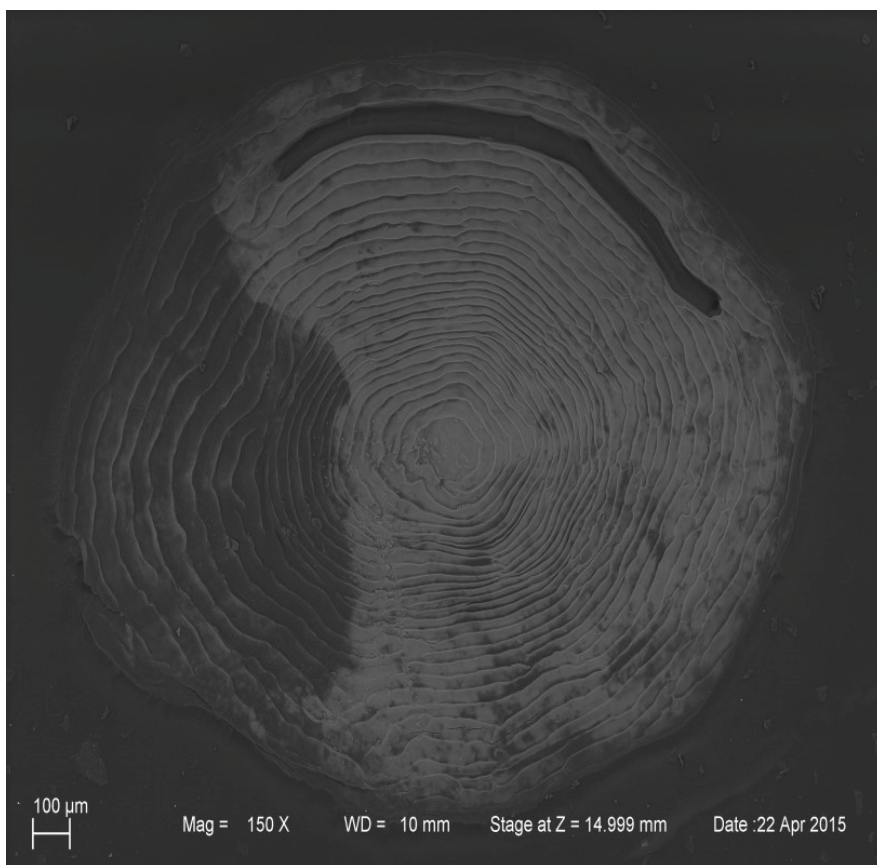
Grunnstoff	Isotop	m/ Δ m	Deteksjons grense (mg/kg)	Grunnstoff	Isotop	m/ Δ m	Deteksjons grense (mg/kg)
Litium	⁷ Li	LR	0.260	Natrium	²³ Na	MR	21.0
Bor	¹¹ B	LR	1.80	Magnesium	²⁴ Mg	MR	1.00
Kalsium	⁴² Ca	LR		Svovel	³² S	MR	590
Cesium	¹³³ Cs	LR	0.030	Kalium	³⁹ K	MR	5.50
Barium	¹³⁷ Ba	LR	1.10	Kalsium	⁴² Ca	MR	
Lantan	¹³⁹ La	LR	0.130	Titan	⁴⁷ Ti	MR	0.650
Cerium	¹⁴⁰ Ce	LR	0.180	Krom	⁵² Cr	MR	0.160
Praseodym	¹⁴¹ Pr	LR	0.030	Mangan	⁵⁵ Mn	MR	0.280
Neodym	¹⁴³ Nd	LR	0.210	Jern	⁵⁶ Fe	MR	2.30
Samarium	¹⁵² Sm	LR	0.030	Sink	⁶⁶ Zn	MR	9.70
Gadolinium	¹⁵⁷ Gd	LR	0.040	Strontium	⁸⁸ Sr	MR	0.560
Bly	²⁰⁸ Pb	LR	0.230	Kalium	³⁹ K	HR	5.50
Thorium	²³² Th	LR	0.020	Kalsium	⁴² Ca	HR	
Uran	²³⁸ U	LR	0.030				

Valg av ablasjonsdiameter

Apatittlaget på et skjell fra Atlantisk laks varierer i tykkelse fra typisk 4-6 μm i bunn til 15-20 μm på toppen av en skleritt (se Figur 2 og Hutchinson & Trueman, 2006). Ved ablatering over nødvendig energigrense (threshold energy for ablation) vil laserstrålen gå ned i det kollagene laget, noe som ikke er ønskelig. Mengde abladert materiale kan justeres ved å endre diameteren på laserstrålen. Desto større diameter på laserstrålen som brukes, desto mer prøvemateriale når plasmaet, men desto større er også tidsrommet av fiskens liv som analyseres. Ut fra signalstyrke for grunnstoffene gitt i Tabell 2, ønske om analyse av et lite tidsrom (< 2 uker) og ICP-MS-detektorens metningssignal på 10^9 cps (counts per second) ble det vurdert at en ablasjonsdiameter på 50 μm var det beste alternativet. Typiske ablasjonsmønstre på settefisk er vist i figur 3.



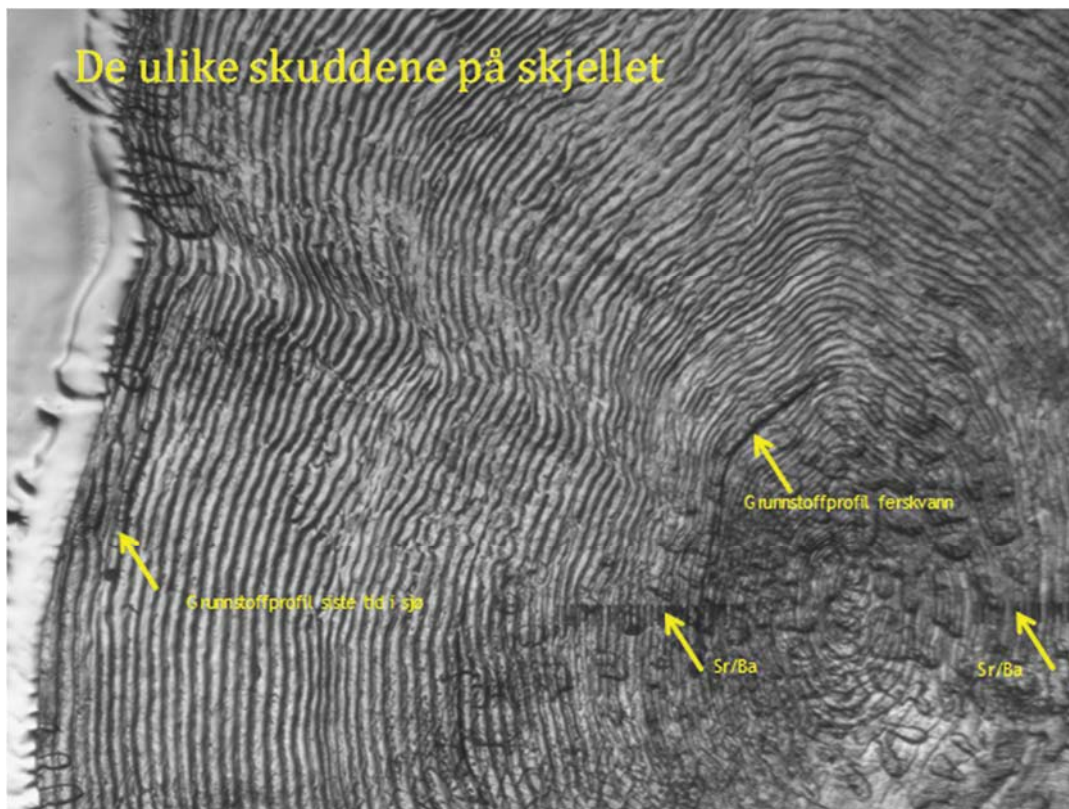
Figur 2. Skanning elektronmikroskop bilder av skjell av Atlantisk laks. Skjellet er delt på langs slik at et tverrsnitt vises av det mineralske apatittlaget som hviler på den kollagene fiberplaten. Foto: Belinda Flem, Norges geologiske undersøkelse.



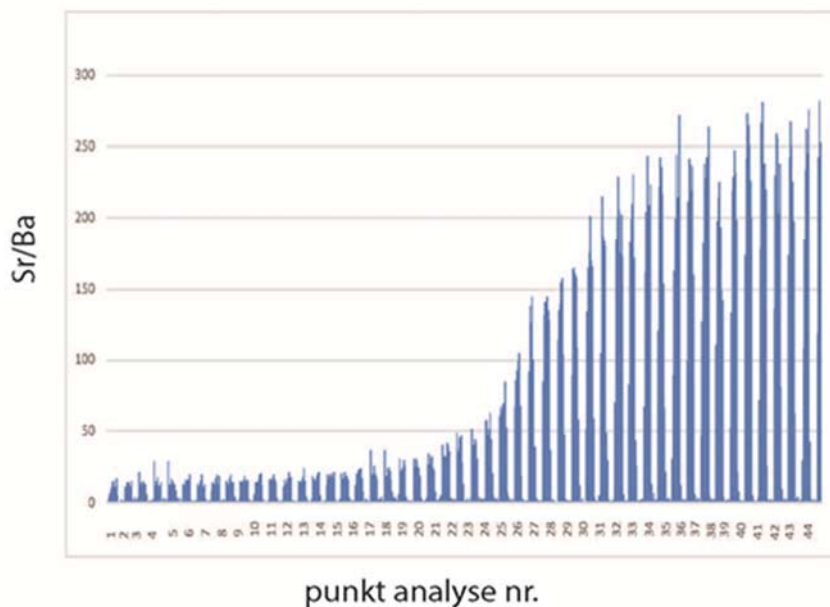
Figur 3. Skanning elektronmikroskop bilde av settefiskskjell av Atlantisk laks. Ablasjonsdiameter 50 µm. Foto: Belinda Flem, Norges geologiske undersøkelse.

Valg av analyseområder og posisjonering på skjellet

Det ble benyttet tre analyseområder på skjellet for å danne profiler for fiskegruppene; ferskvannssonen som er dannet mens fisken står i settefiskanlegget danner ferskvannprofilen, mens sjøvannssonen etter fem uker i sjø (tidlig sjøfase) og sonen i ytterkant av matfiskskjell (siste sjøfase) danner sjøvannsprfiler (figur 4). For å standardisere posisjonene for analyse av ferskvanns- og sjøvannsprfiler har det vært behov for å orientere seg på skjellet. En markert endring i forholdet av Ba og Sr ved overgang til sjø ble benyttet som ankerpunkt for å definere standard posisjon for analyser (figur 5). Normalt vil Ba-nivået være høyere i ferskvann enn i sjøvann og motsatt for Sr. For å bestemme riktig posisjon for overgangen til sjø ble det gjort punktbladering fra sentrum og ut mot ytterkanten innen den aktuelle sonen i skjellet (figur 1). Fra punktet hvor forholdet mellom Sr og Ba begynte stigningen ble det telt 3.5 skleritter inn mot senterplaten for analyse i ferskvannsfasen. For analyse i tidlig sjøfase ble det telt fem skleritter ut fra punktet. For analyse i ytterkant av skjellet ble det telt fire skleritter inn fra kanten. Alle analyser ble gjort på venstre side av skjellet om ikke annet er angitt.



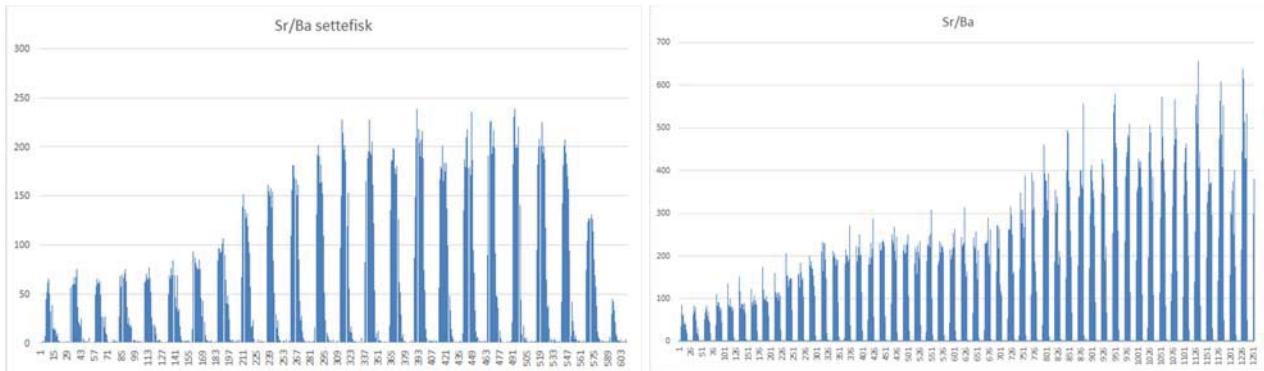
Figur 4. Posisjonering av laserskudd på skjell. Punktskudd (markert som "Sr/Ba") fra senter av skjellet og ut mot ytterkant ble benyttet til orientering på skjellet basert på forholdet mellom Sr og Ba, mens "Grunnstoffprofil" er linjeskudd som benyttes for analysering av henholdsvis ferskvannprofil og sjøvannprofil. Foto: Vegard Sollien, VI. Ikke vist: Grunnstoffprofil tidlig sjøfase



Figur 5. Sr/Ba-ratio fra senter og ut mot ytterkant av skjell fra oppdrettslaks uten sjøvannstilsetning i settefiskanlegget. Overgangen til sjø er her satt til punkt nummer 15, like før ratioen øker.

Et markert skifte er tydelig ved overgang fra ferskvann i settefiskanlegg til sjøvann i sjøanlegg (5). Merk at et Sr/Ba-punkt ikke nødvendigvis tilsvarer en skleritt.

Det er vanlig å benytte sjøvannstilsetning i settefiskanlegg. I slike tilfeller har det vist seg utfordrende å finne riktig posisjonen for overgang til sjø ved hjelp av Sr/Ba-ratioen. På grunn av at konsentrasjonen av Ba som regel er lavere, og konsentrasjonen av Sr er høyere i disse skjellene blir ratioen høyere, mer ujevn og angir mindre tydelige overganger (figur 6). Dette kan gi mindre sikker posisjonering.



Figur 6. Sr/Ba-ratio fra senter og ut mot ytterkant av skjell. Venstre bilde: Settefisk med sjøvannstilblending. Høyre: Matfisk fra samme settefiskgruppe. Form og ratio av Sr/Ba i settefiskskjellet finnes igjen i ferskvannsdelen av matfiskskjellet (området til venstre i matfisk-grafen). Overgangen fra settefiskanlegg til sjøanlegg er her satt til punkt nummer 24 (angitt som 601) på analysen av matfiskskjellet. Y-aksen angir Sr/Ba-ratio, x-aksen angir tid i sekunder for analysen.

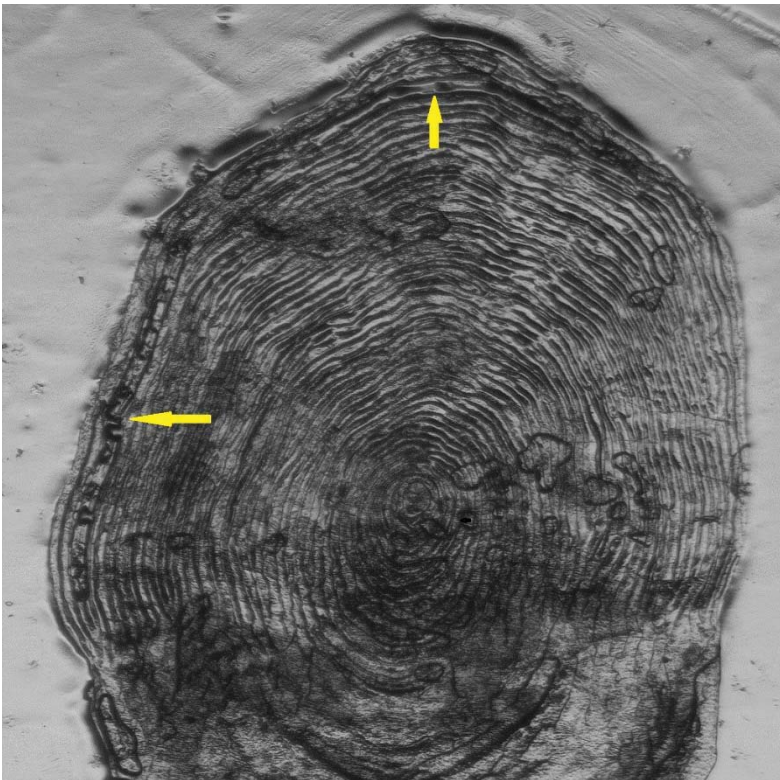
Referanser

- Flem, B., Larsen, R. B., Grimstvedt, A., Mansfeld, J. (2002). In situ analysis of trace elements in quartz by using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Chemical Geology*, 182 (2-4), 237-247.
- Flem, B., Moen, V., Grimstvedt, A. (2005). Trace element analysis of scales from four populations of Norwegian Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) for stock identification using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Appl. Spectrosc.* 59, 245-251.
- Flem, B., Moen, V., Finne, T.E., Viljugrein, H., Kristoffersen, A. B. (2017). Trace element composition of smolt scales from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), geographic variation between hatcheries. *Fisheries Research* 190, 183-196.
- Gunther, D., & Heinrich, C. A. (1999). Enhanced sensitivity in laser ablation-ICP mass spectrometry using helium-argon mixtures as aerosol carrier - Plenary lecture. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 14 (9), 1363-1368.
- Hutchinson, J. J. & Trueman, C. N. (2006). Stable isotope analyses of collagen in fish scales: limitations set by scale architecture. *Journal of Fish Biology* 69, 1874-1880.
- Tabersky, D., Luechinger, N. A., Rossier, M., Reusser, E., Hametner, K., Aeschlimann, B. (2014). Development and characterization of custom-engineered and compacted nanoparticles as calibration materials for quantification using LA-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 29(6), 955-962.

Delrapport C: Sammenlikning av frontskudd og sideskudd

Et skjell dekker en definert del av fiskens overflate. Når laksefisk vokser øker den mer i lengde relativt til i bredden. Det samme skjer for skjell, de vokser relativt mer i fronten enn langs siden, og blir slik gradvis mer utstrakt i lengderetningen. I overgangen mellom side- og frontpartiet, ca. 30 grader ut til begge sider fra midtlinjen forover, opptrer gjerne det som kalles gafling, hvor skleritter deler seg og blir til to. Det fører gjerne til at antall skleritter er høyere og mønsteret av skleritter mer uryddig i front enn langs siden. Ved aldersbestemmelse og tilbakeberegning av vekst hos laksefisk leses den fremre sektoren i skjellene (Dahl, 1909; Fraser 1916; Lee 1920).

Ved abladering med laser benyttes en fast diameter på 50 µm på laserskuddet. Mens skjell ofte er lettere å lese langs siden vil den integrere en lengre tidsperiode enn en prøve i front. Fordi det er ønskelig å analysere en kort tidsperiode ble det gjennomført en test for å undersøke om det er forskjeller i konsentrasjoner av grunnstoff eller varians innad i fiskegruppen ved laserskudd langs siden kontra i front (figur 1).



Figur 1. Bildet viser et skjell hvor det er gjort analyser både på siden av skjellet og i front. Pilene angir midten av laserskuddene i de to områdene.

Materialer og resultater

Skjellene brukt for å undersøke ferskvannsprøfilens stabilitet etter 2 måneder i sjø (Delrapport G) ble analysert både i front og side. Innledende kryssvalidering på treningsdatasettene viste at begge metodene ga bra resultater: klassifiseringspresisjonen var 98.5% (256 av 260 skjell riktig klassifisert) for frontskudd, og 98.4% (306 av 311 skjell riktig klassifisert) for sideskudd, se tabell 1.

Tabell 1. Kryssvalidering (CV i %) av resultat ved side og frontskudd for tre ulike statistiske metoder (K-nærmeste nabo, med n=3 (3-nn); Random forest (RF, 3000 trær) og Lineær diskriminantanalyse (LDA)).

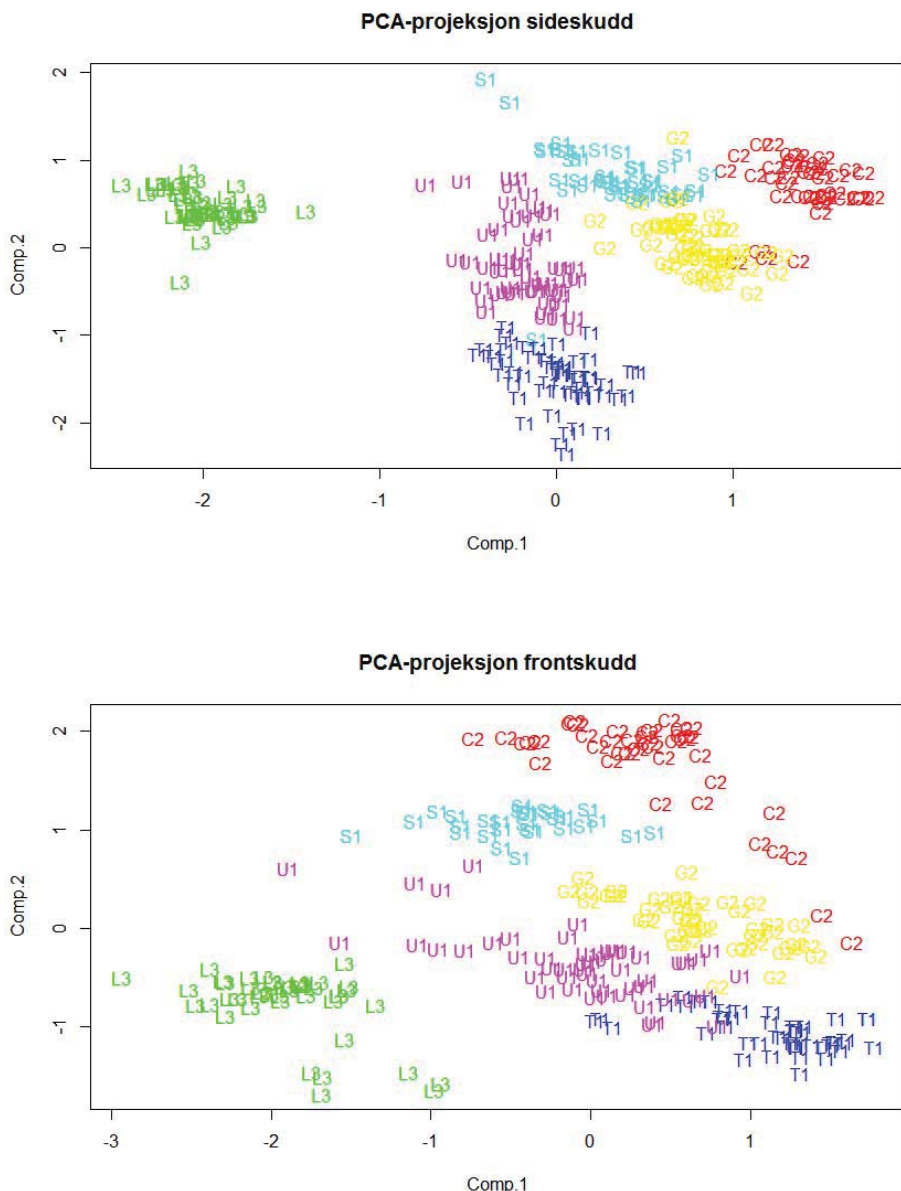
Data	Modell	CV-presisjon (%)
Side	3-nn	99.7
Front	3-nn	98.4
Side	RF	98.7
Front	RF	99.6
Side	LDA	99.7
Front	LDA	100

Det var ingen signifikant forskjell i presisjon mellom analyse av sonen på siden av skjellet og i front på skjellet. En annen måte å sammenlikne metodene på er å se hvilken metode som minimerer variasjonen innad i hver gruppe. Dette er ønskelig fordi det minsker sannsynligheten for overlapp i profilen for ulike grupper.

På grunn av at datasettet er sammensatt (compositional) og at normalitetsantakelsen ikke holder, er en beta-dispersjonstest en egnet måte å evaluere og sammenlikne variasjonen på. En beta-dispersjonstest regner ut gruppevis dispersjon (som betyr gjennomsnittlig avstand fra alle datapunkt til gruppesentrum) og bruker en F-test for å sammenlikne variasjonen mellom gruppene (Anderson, 2006). En sammenlikning av variasjon for frontskudd og sideskudd sammen med den assosierte p-verdien er vist i tabell 2. Analysene gir en marginal fordel til sideskudd, men forskjellene kan ikke sies å være signifikante. Sammenlikning av PCA-projeksjonen for frontskudd og sideskudd gir tilsvarende bilde (figur 2).

Tabell 2. Sammenlikning av variasjon for front- og sideskudd ved bruk av en beta-dispersjonstest utført for seks grupper. Den assosierte p-verdien er angitt.

Gruppe	Front	Side	p
C2	0.92	0.77	0.17
G2	0.86	0.81	0.46
L3	0.72	0.66	0.43
S1	0.84	0.87	0.77
T1	0.89	0.75	0.04
U1	0.94	0.87	0.33



Figur 2. PCA-projeksjon for skjell analysert på venstre side (øverst) og i front (nederst).

Konklusjon

Det ble ikke funnet større forskjeller i konsentrasjoner eller varians ved analyse av side og front. Sklerittenes vekstmønster er tydeligere på siden enn i front, noe som gjør det enklere å oppnå presis posisjonering. Det ble derfor valgt å gjennomføre analysene langs siden på skjellet.

Referanser

- Anderson, M. J., (2006). Distance-based tests for homogeneity of multivariate dispersions. *Biometrics*, 62(1), pp.245-253.
- Dahl, K. (1909). The assessment of age and growth in fish. *Int. Revue Ges. Hydrobiol. Hydrogr.* 2.
- Fraser, C. McL. (1916). Growth of the spring salmon. *Trans. 2. meet. (1915). Pac. Fish. Soc.* 29-35.
- Lee, R. M. (1920). A review of the methods of age and growth determination in fishes by means of scales. *Fishery Invest., Lond., Ser. 2, vol. 4 no. 2.*

Delrapport D: Variasjon i kjemisk profil for ett individ kontra flere individ

Introduksjon

Inkorporering av grunnstoffer i fiskens skjell er antatt å være styrt av fysiologi og omgivelser, men den relative effekten av disse to faktorene har ikke blitt undersøkt. En mulig måte å undersøke dette på er å analysere om variasjonen i kjemisk profil er lavere på skjell fra samme individ enn på skjell fra separate individ. Variasjoner i grunnstoff i skjell har også en innvirkning på logistiske vurderinger: hvis variasjonen i data hentet fra skjell fra samme individ ikke er mindre enn variasjonen i data hentet fra skjell fra flere individ, vil det være fornuftig, fra et logistisk standpunkt, å plukke flere skjell fra få individer heller enn få skjell fra flere individer. Antall skjell man prøvetar fra én fisk har også innvirkning på fiskevelferd. På grunn av disse momentene ble det bestemt å gjøre en test for å se om det er signifikante forskjeller i variasjon i profilen for ett individ kontra flere individ.

Det er rimelig å anta at alle fisker innen samme gruppe vil bli eksponert for de samme omgivelsene, slik at eventuelle variasjoner i profil mellom individer vil stamme fra variasjoner i fysiologi. Hvis de fysiologiske variasjonene er neglisjerbare, forventes det å se varianshomogenitet (samme spredning i data) på individ og mellom individ.

Metode og resultater

For å teste hypotesen ble det hentet inn 30 individer fra et settefiskanlegg. Fra hvert av individene ble det plukket 20 skjell til analyse. Etter forkasting av erstatningskjell og uteliggere var det igjen 396 skjell fordelt på 30 individer. Disse skjellene ble fullstendig randomisert for å unngå kunstig lav variasjon innen individer. Det ble deretter utført en sammenlikning av variasjon innen og mellom individ på følgende måte:

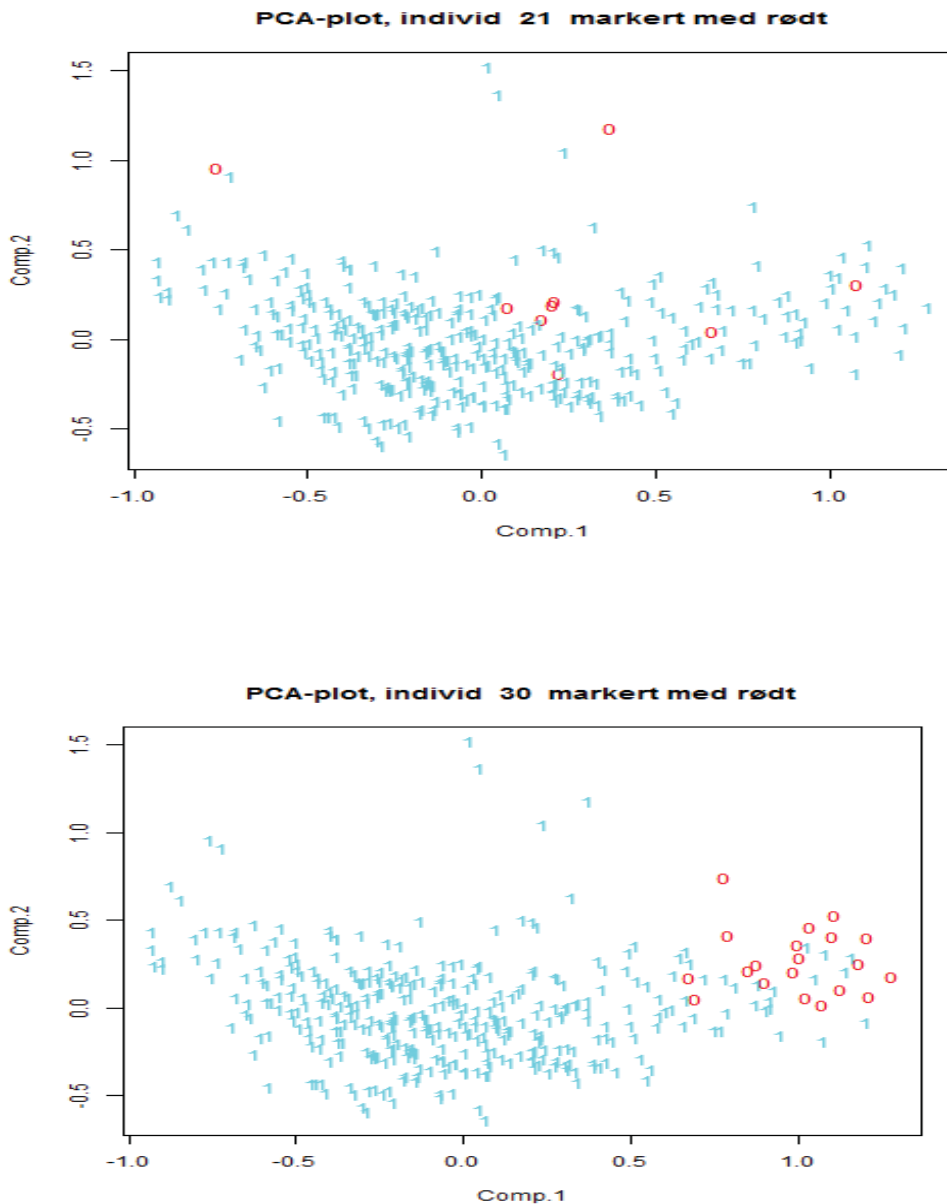
Innad i hvert individ, regn ut beta-dispersjon for alle skjellene. Deretter, regn ut beta-dispersjon for resten av individene. Sammenlikn verdiene ved en F-test for å se om det er signifikante forskjeller. Resultatene er oppsummert i Tabell 1.

Tabell 1. Resultater fra beta-dispersjonstest. Disp(ID) står for resultat for individet som ble testet (n=antall skjell analysert for individet), mens Disp(resten) står for resultat for de 19 andre individene. F står for resultater av F-test og viser sammen med p-verdien (P) om forskjellene er signifikante

ID	Disp(ID)	Disp(resten)	F	p
1 (n=16)	0.35	0.60	11.3	0.0008
2 (n=14)	0.34	0.60	11.2	0.0008
3 (n=4)	0.47	0.59	0.75	0.4
4 (n=13)	0.32	0.60	11.9	0.0006
5 (n=17)	0.46	0.60	3.82	0.05
6 (n=5)	0.39	0.59	2.48	0.1
7 (n=3)	0.60	0.59	0.01	0.9
8 (n=14)	0.32	0.60	13.4	0.0003
9 (n=15)	0.38	0.60	8.24	0.004
10 (n=14)	0.45	0.60	3.55	0.06
11 (n=14)	0.39	0.60	7.70	0.006
12 (n=15)	0.31	0.59	13.8	0.0002
13 (n=16)	0.43	0.59	5.03	0.02
14 (n=16)	0.43	0.59	5.02	0.02
15 (n=13)	0.39	0.60	6.68	0.01
16 (n=6)	0.43	0.59	1.83	0.2
17 (n=6)	0.46	0.60	1.25	0.3
18 (n=13)	0.32	0.60	12.2	0.0005
19 (n=11)	0.33	0.59	8.68	0.003
20 (n=14)	0.37	0.60	8.97	0.003
21 (n=9)	0.62	0.59	0.10	0.8
22 (n=12)	0.26	0.60	17.3	0.00005
23 (n=17)	0.39	0.60	8.65	0.003
24 (n=13)	0.32	0.60	11.7	0.0007
25 (n=16)	0.31	0.60	16.0	0.00008
26 (n=17)	0.36	0.58	10.0	0.001
27 (n=16)	0.36	0.60	9.90	0.002
28 (n=20)	0.26	0.60	26.1	0.0000005
29 (n=17)	0.41	0.57	6.12	0.01
30 (n=20)	0.29	0.56	20.4	0.000008

Resultatene indikerer at variasjonen er lavere innen individ enn mellom individ. For de individene der det ikke finnes noen signifikant forskjell er antallet analyserte skjell som regel lavt, med unntak av individ 21. En Kruskal-Wallis test i gruppeforskjell mellom dispersjon på individ og mellom individ forkastet hypotesen om at dispersjonen er lik for de to gruppene med $p < 0.0001$.

Et PCA-plot kan brukes til å illustrere hvordan data fra ett individ fordeler seg kontra data fra resten av individene. Et utvalg av slike plot er illustrert i figur 1 nedenfor.



Figur 1. PCA plot av fordelingen til individ 21 (øverst) og 30 (nederst) kontra resten. Hvert punkt representerer et skjell. Individ 21 hadde ikke signifikant forskjell i beta-dispersjon mens individ 30 var signifikant ulikt resten.

Konklusjon

Resultatene fra beta-dispersjonsanalysen, F-tester og Kruskal-Wallis indikerer at variasjonen i data er lavere i skjell fra samme individ enn i skjell fra flere individer. Årsaken til dette er ukjent, men kan stamme fra metabolske årsaker eller at vannmiljøet er heterogent nok til at individer kan utsettes for forskjellige nivåer av grunnstoff. Dette betyr at man vil få et mer representativt bilde av en gruppe dersom det prøvetas relativt få skjell fra mange individer. Basert på dette og resultatene fra den simulerte rømmingen anbefales det å føre et prøvetakingsregime med minst 3 analyserte skjell fra rundt 17 individer for å karakterisere en gruppe i referansematerialet.

Delrapport E: Kartlegging og klassifisering av kjemisk profil i skjell fra 24 grupper settefisk

Innledning

Hensikten med dette studiet er å finne ut om det var mulig å skille grupper av settefisk fra ulike settefiskanlegg ved å benytte profiler av grunnstoff i skjellene. Dette er en forutsetning for å lage en modellarkitektur som sporer fisk tilbake til riktig anlegg.

Siden vannkjemien gjenspeiler lokal geologi og nedbørsforhold, bør settefiskanlegg som ligger i ulike geografiske områder gi smoltens skjell ulik kjemisk profil. Smoltskjell fra settefiskanlegg langs hele kysten ble derfor analysert for å se om hvert anlegg gav en unik kjemisk profil. Vannkjemien varierer gjerne med årstidene og dette må det tas hensyn til ved definisjon av en gruppe smolt. I dette forsøket ble derfor en gruppe definert som smolt som har stått i felles vann de 6 siste ukene før de ble flyttet til sjømerd. En gruppe kunne da komme fra flere kar så lenge disse hadde samme vannbehandling. Prøvetaking av gruppen skal ideelt skje 1-2 dager før flytting til sjø.

Resultatene i denne rapporten er et utdrag av Flem et al. (2017).

Materiale og metoder

Konsentrasjoner av 12 grunnstoff (B, Ba, Fe, K, Mg, Mn, Na, Pb, S, Sr, U og Zn) ble kartlagt i 24 grupper settefisk fordelt på 18 settefiskanlegg (A-R). De 24 gruppene fra de 18 settefiskanleggene hadde ulike vannbehandlingsregimer, dette for å sikre at de mest vanlige produksjonsregimene i oppdrettsnæringen var representert (Tabell 1). I noen anlegg ble det tatt prøver fra flere grupper for å teste variasjonen mellom grupper fra samme anlegg. Flere detaljer rundt gruppeinndeling og settefiskanleggenes geologiske lokaliteter er gitt i Flem et al. (2017).

Tabell 1. Vannbehandlingskategorier (1-5). Gjennomstrømningsanlegg er forkortet FT og resirkuleringsanlegg er betegnet RAS.

	Vannbehandling	Grupper
1	FT	D2, D3, E, F, M1, M2, O, R
2	FT + sjøvann	G, Q
3	FT + sjøvann + silikat	H, J, K, P
4	RAS + en eller flere tilsetninger (e.g. silikat, kalk, natriumbikarbonat)	C, D1, I1, I2, L1, L2, M3, N
5	FT + pH-justeringer	A, B

Resultater og diskusjon

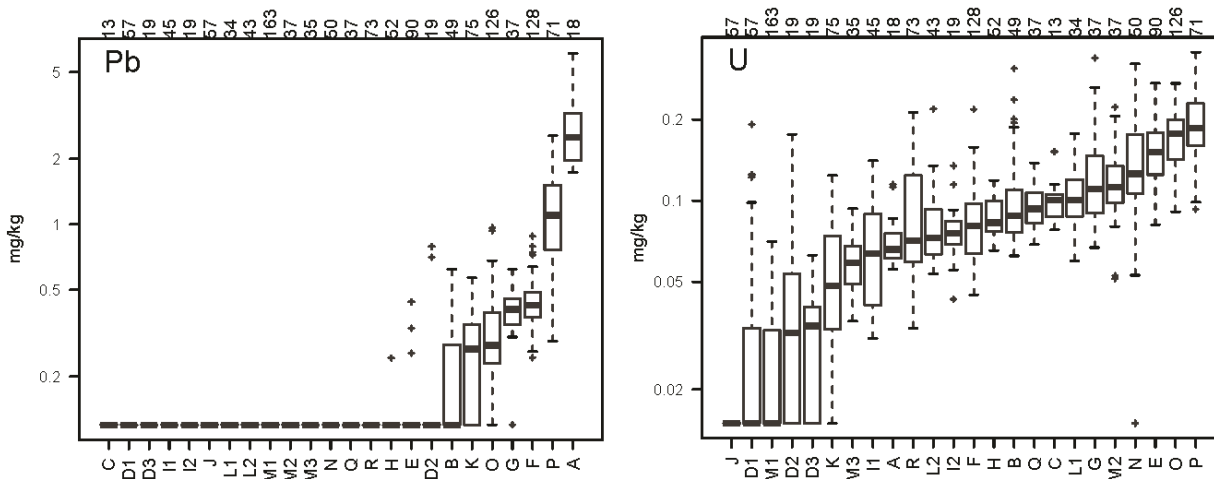
Ved klassifiseringen ble ett og ett skjell tatt ut av datasettet og prøvd tilbakeført til rett gruppe. To av klassifiseringsmetodene som er brukt, RF og KNN, ga noe ulikt resultat fra hver kjøring mens NB og LDA ga samme resultat hver gang siden de ikke gjør tilfeldige utvalg. Klassifiseringspresisjonen etter en Majority Vote (MV) mellom de fire klassifiseringsmetodene er vist i tabell 2.

Tabell 2. Settefiskanlegg nummerert A-R og grupper innen disse. Antall analyserte skjell innen hver gruppe er angitt i kolonnen N. Prosent gjennomsnittlig korrekt klassifisering etter en Majority Vote mellom de fire klassifiseringsmetodene er gitt. KNN: k=3. Lokalitet for feil plassering av skjell er gitt som "Feil klassifisert".

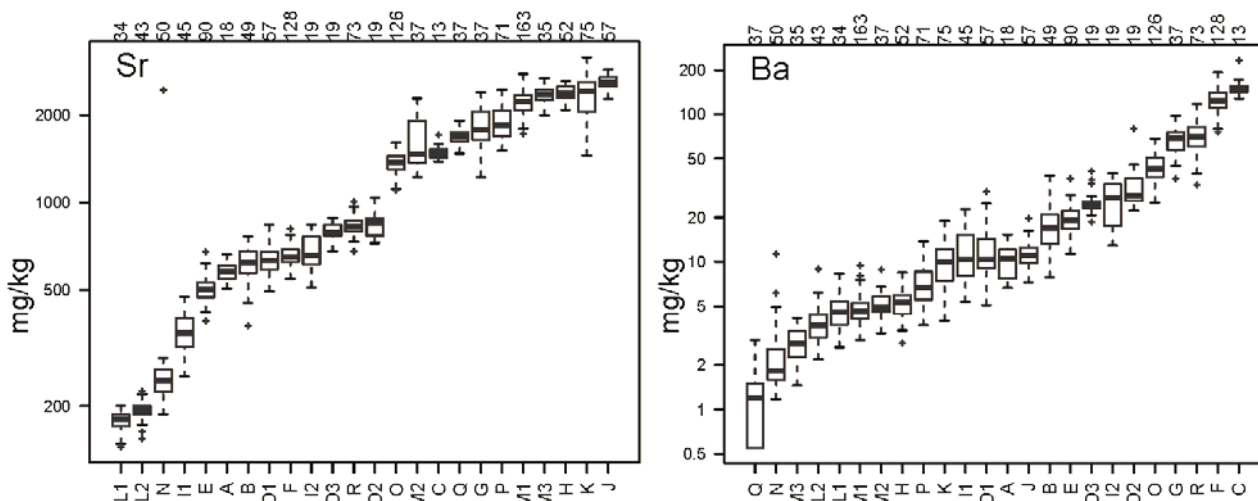
Settefiskanlegg /Grupper	N	MV	Feil klassifisert
A	18	100	
B	49	89.2	3xE, 2xI1, I2
C	13	90.8	R
D	95	92.9	3xB, F, I, R
D1	57	93.2	3xB
D2	19	76.3	3xD3, F, R
D3	19	70.5	D1, 4xD2, I2
E	90	98.1	B, R
F	128	100	
G	37	88.7	D, 2xO
H	52	94.4	M1, 2xM2
I	64	86.1	3xB, 2xD, 4xE
I1	45	83.8	2xB, 5xE, I2
I2	19	79.5	B, D2, D3, I1
J	57	100	
K	75	98.5	H
L	77	100	
L1	34	97.1	L2
L2	43	99.1	L1
M	235	97.7	6xH
M1	163	100	
M2	37	91.9	4xH
M3	35	92.9	3xH
N	50	92.8	K, L
O	126	98.1	2xG
P	71	100	
Q	37	97.0	
R	73	100	

Gjennomsnittlig andel av prøvene klassifisert til riktig settefiskanlegg basert på MV var 95.9% og varierte mellom 86.1 (anlegg I) og 100% (anlegg A, F, J, L, P og R). For grupper var presisjonen litt lavere enn for anlegg: gjennomsnittlig andel av skjellprøver klassifisert til riktig gruppe for MV var 93%, og varierte mellom 70.5 (gruppe D3) og 100% (seks grupper) for de 24 gruppene.

Enkelte skjell ble feilplassert av modellene. For eksempel feilplasserte modellene 3 skjell fra settefiskanleggene B og I (6 av 118 skjell). Dette kan skyldes at områdene som settefiskanleggene ligger i har sammenlignbare anrikelsesfaktorer (EF) for K og Mn. Fra 4 av de 18 settefiskanleggene (D, I, L, M) er det mer enn en gruppe (tabell 2). Gruppe D2 og D3 er smolt fra samme hall med samme vannkilde og vannbehandling, men er fortsatt kvantitativt forskjellige. Dette kan skyldes at gruppene ble transportert til sjømerd med 10 dagers mellomrom, slik at vannmiljøet kan ha endret seg i perioden. For å finne ut hvilke grunnstoff som var de sterkeste indikatorene på gruppetilhørighet, ble det gjort en analyse der ett og ett grunnstoff ble utelatt. Dette viste at Sr og Ba er de to mest betydningsfulle grunnstoffene på klassifiseringspresisjon. Uten Sr ble klassifiseringsprosenten redusert fra 95.9% til 92.2% og uten Ba ble den redusert til 93.4%. Bly og uran var også viktige grunnstoffer ved klassifiseringen da disse gir unike signaturer til enkeltanlegg (figur 1 og 2)



Figur 1. Konsentrasjonsfordeling av bly (Pb) og uran (U) i skjellene hos de ulike anleggene. Tallene over grafen angir antall analyserte skjell for gruppen.



Figur 2. Konsentrasjonsfordeling av Sr og Ba i skjellene hos de ulike anleggene. Tallene over grafen angir antall analyserte skjell for gruppen.

En mer inngående diskusjon om resultatene fra dette studiet kan finnes i Flem et al. (2017).

Konklusjon

Basert på profiler av naturlig forekommende grunnstoff i skjell ble 24 grupper av smolt klassifisert til riktig settefiskanlegg med en gjennomsnittspresisjon på 95.9%. Det ble også utført klassifisering av forskjellige grupper fra samme anlegg. Disse gruppene ble klassifisert riktig med en gjennomsnittspresisjon på 93.0%. Den høye presisjonen viser at ulike settefiskanlegg har unike profiler.

Referanser

Flem, B., Moen, V., Finne, T. E., Viljugrein, H., Kristoffersen, A. B. (2017). Trace element composition of smolt scales from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), geographic variation between hatcheries. *Journal of Fisheries Research*, 190, 183-196.

Delrapport F: Kartlegging og klassifisering av sjøvannsprofil i skjell fra 17 grupper matfisk

Innledning

Springsmetoden som anvendes i dette prosjektet baseres stort sett på å analysere ferskvannsprøfilen. Profilen fra analyse av ytterkanten av skjellet og inn til overgangen fra ferskvann til sjø blir betegnet som sjøvannsprøfilen fordi denne delen av skjellet dannes mens fisken står i sjø, og gjenspeiler dermed dette vannmiljøet. Hensikten med dette studiet er å finne ut om det er mulig å skille mellom grupper av matfisk fra ulike lokaliteter ved å benytte sjøfasen i skjellet.

Materiale og metoder

Det ble samlet inn skjell fra 17 anlegg fra et bredt geografisk område. Fiskegruppene brukt i denne undersøkelsen hadde stått 50-79 dager i sjø. Skjellene ble analysert i fronten av skjellet, langs en skleritt som skal tilsvare tidspunktet der fisken har stått omtrent fem uker i sjø, det vil si 2-5 skleritter inn fra ytterkanten av skjellet.

Klassifiseringsmodellen var en versjon av den som ble brukt for å klassifisere settefiskprofilen (utvalg av RF, LDA, k-nn og Naive Bayes) (Delrapport E). For å evaluere modellen ble det gjort "leave-one-out"-kryssvalidering (1-CV).

Resultat og diskusjon

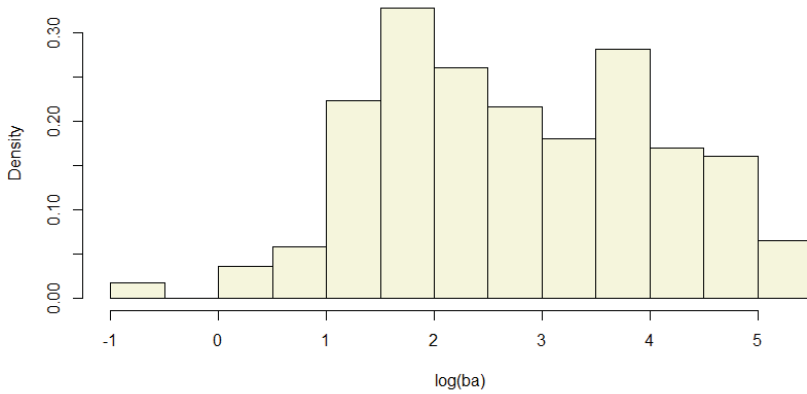
Resultatene fra 1-CV er vist i tabell 1. Noen av gruppene sto i samme område, for eksempel H1 og H2. Allikevel var det ingen overlapp (ingen fra H1 ble klassifisert til H2 og vice versa) i disse profilene, som betyr at to profiler dannet i samme geografiske område kan være forskjellige. Årsaken til dette kan være at gruppene ikke ble prøvetatt på samme tidspunkt, eller at de ble påvirket av ulike vannstrømmer.

Tabell 1. Presisjon ved "leave-one-out" - kryssvalidering (1-CV) for modellutvalget på sjøvannsprøfiler for de ulike gruppene (A-P).

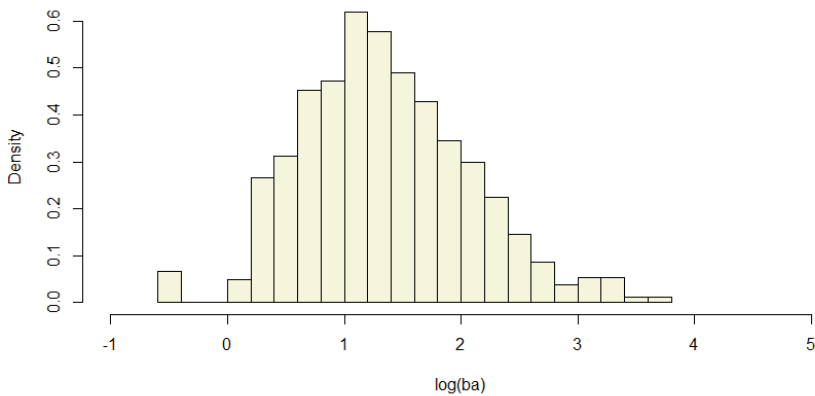
Anlegg	1-CV (%)
A	59.3
B	90.1
C	81.6
D	32.0
E	95.8
F	64.5
G	81.8
H1	50.0
H2	88.0
I	84.3
J	81.6
K	69.8
L	74.6
M	76.6
N	67.4
O	56.7
P	83.7
TOT	74.2

Generelt var oppløseligheten dårligere for sjøvannsprøvet enn for ferskvannsprøvet. Dette kan skyldes at variasjonene i konsentrasjoner av de undersøkte grunnstoffene er større i ferskvann enn i sjø. Histogrammene nedenfor (figur 1) viser fordelingen av Sr og Ba (som er to av de fire viktigste indikatorene på gruppetilhørighet) i henholdsvis ferskvann og sjøvann for alle gruppene som inngikk i analysene på ferskvanns- og sjøvannsprøvet (se Delrapport E for en oversikt over data for ferskvannsprøvet).

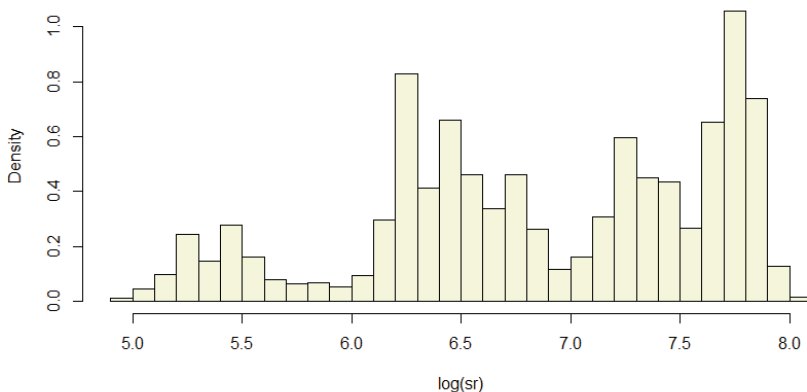
Histogram over Ba-verdier for ferskvannsprøvet

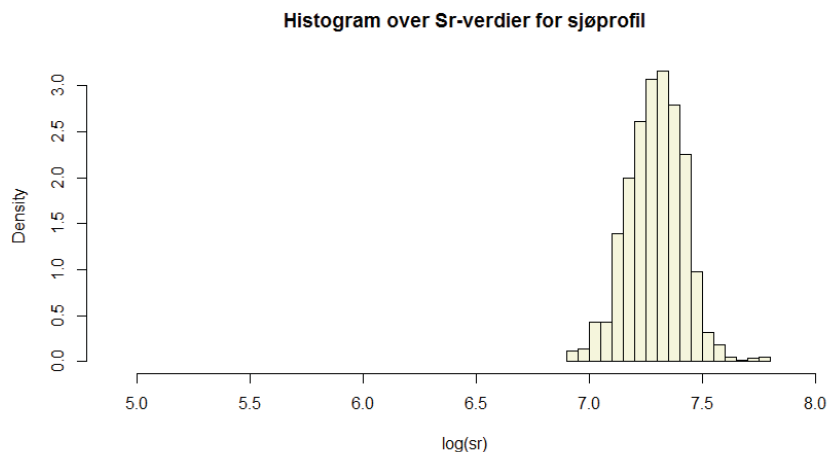


Histogram over Ba-verdier for sjøprofil



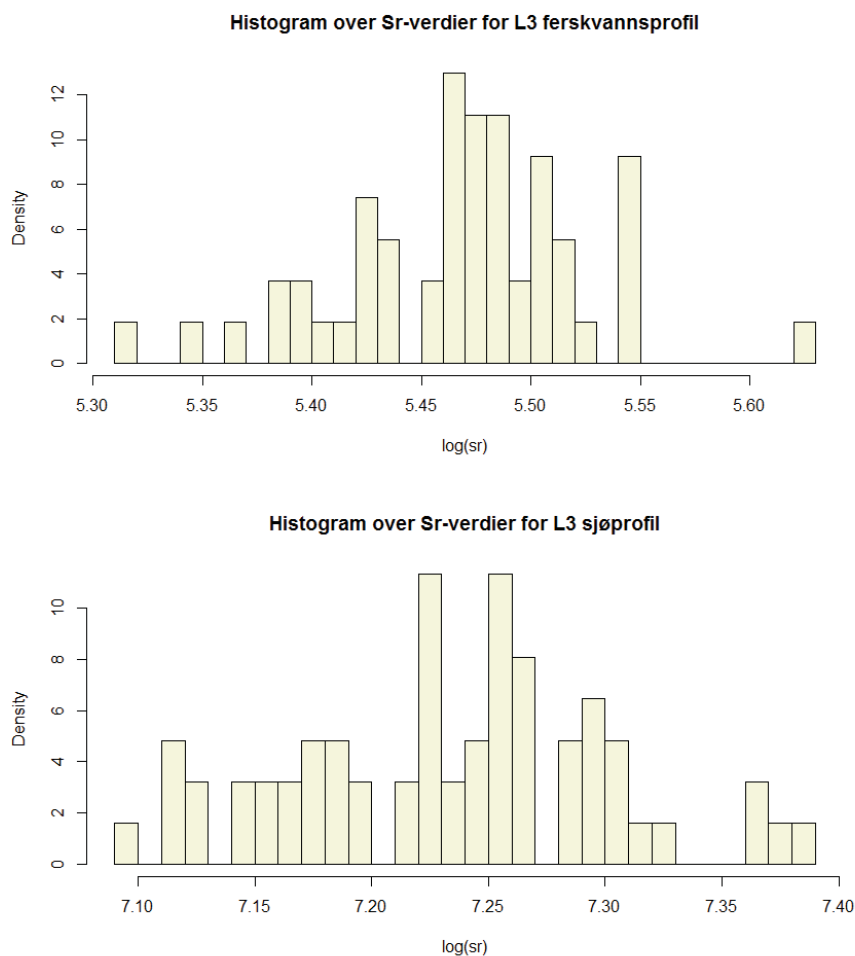
Histogram over Sr-verdier for ferskvannsprøvet





Figur 1. Histogrammer over log-konsentrasjonsnivået til Sr og Ba for henholdsvis ferskvanns- og sjøvannsprofil.

Nivåforskjellene for Sr og Ba er mindre i sjø enn i ferskvann: log (Sr) varierte fra 5 til 8 for ferskvann, mens for sjøvann lå den på 6.9-7.8. En tilsvarende innsnevring kan også sees i log(Ba). Samtidig, selv om verdiene er snevret inn i sjøvannsprofilen, ser det ut som at gruppevis varians ikke er lavere enn ferskvannsprofilene. Histogrammene i figur 2 viser Sr-nivået til en gruppe slik det forekom i settefiskanlegget (L3) og Sr-nivået for en gruppe sjøsatt fisk med opphav i samme settefiskanlegg.



Figur 2. Histogrammer over log-nivået til Sr for L3 henholdsvis ferskvanns- og sjøvannsprofilen.

Begge profilene hadde omtrent samme variasjon i Sr-nivå. En beta-dispersjonstest kan brukes for å kvantifisere denne observasjonen. Det ble gjort et utvalg av 6 grupper som hadde data på analyse av ferskvannsfasen i settefiskskjell og data på analysen av sjøfasen i matfiskskjell, resultatene er oppsummert i tabell 2.

Tabell 2. Oversikt over dispersjon for sjøvanns- og ferskvannsprofilene for de ulike gruppene, sammen med den assosierte p-verdien.

Gruppe	disp(sjø)	disp(fersk)	p
C	1.25	0.66	0.0000000058
F	1.26	1.05	0.0033
G	1.40	1.28	0.45
H2	1.00	0.80	0.0010
I	1.44	1.27	0.096
M	1.05	0.98	0.51
ALLE	1.46	1.90	< 0.000000000010

P-verdien representerer sannsynligheten for at disp(sjø) og disp(fersk) er trukket fra samme fordeling, det vil si hvorvidt de kan sies å være like. Den gruppevise variasjonen var minst like stor (og ofte større) i sjøvannsprofilen enn i ferskvannsprofilen. Den totale variansen mellom gruppene var mye større i ferskvannsprofilen enn i sjøvannsprofilen. Konsekvensen av dette er at det blir lettere å skille mellom ferskvannsprofiler enn sjøvannsprofiler.

Konklusjon

Klassifiseringspresisjonen på sjøvannsprofilene varierte fra 32.0% til 95.5% med gjennomsnittlig klassifiseringspresisjon på 74.2%. Det ble også vist at profiler fra samme område kan være forskjellige. Disse resultatene støtter opp under at sjøvannsprofilen kan være nyttig i en større analyse, for eksempel slik den ble brukt i den simulerte rømmingen.

Delrapport G: Ferskvannsprofilens stabilitet etter 2 måneder i sjø

Innledning

Tidligere undersøkelser av konsentrasjoner av allerede inkorporerte grunnstoffer indikerer at det skjer endringer i konsentrasjonsnivå over tid. Dette er tidligere påvist hos andre anadrome fiskearter enn laks (Wells et al., 2003; Ramsay et al., 2011) og hos stasjonære laksefisk i ferskvann (Ryan et al., 2016). Omfanget av endringene og konsekvenser for gruppeforståelsen etter overgang til sjø vil bli undersøkt for grupper av oppdrettslaks. Resultatene vil belyse om det fortsatt er mulig å spore fisken tilbake til riktig settefiskanlegg etter at fisken har stått i sjøvann.

Materiale og metode

Ferskvannsprofil i settefiskskjell ble sammenlignet med ferskvannsprofil i matfiskskjell fra samme fiskegruppe etter to måneder i sjø. Det ble valgt seks grupper settefisk som ble fulgt videre ut til seks ulike matfiskanlegg. Gruppene ble gitt følgende ID: C2, L3, S1, G2, T1 og U1, og sammen med 25 grupper settefisk fra delrapport E utgjorde dette treningsdatasettet. Data fra matfisk blir heretter kalt testdatasett. Gruppene blir kalt [gruppe_ID]-"mf", for eksempel "C2-mf". Mf står for matfisk.

Resultat og diskusjon

Det ble foretatt en innledende kryssvalidering for å undersøke hvordan modellene forventes å prestere. I tillegg ble det gjort en vurdering på om enkelte grunnstoff var unødvendige eller bidro negativt til klassifiseringspresisjonen. Tabell 1 nedenfor viser kryssvalidert presisjon for de seks gruppene for to av modellene (RF og KNN). Presisjonen på kryssvalideringen er et gjennomsnitt av ti kjøringar.

Tabell 1. Kryssvalidert presisjon (%) for de seks gruppene

Modell/ID	C2	G2	L3	S1	T1	U1
RF	99.9	100	95.8	97.3	82.3	98.4
KNN	92.7	94.0	77.3	95.1	98.3	90.2

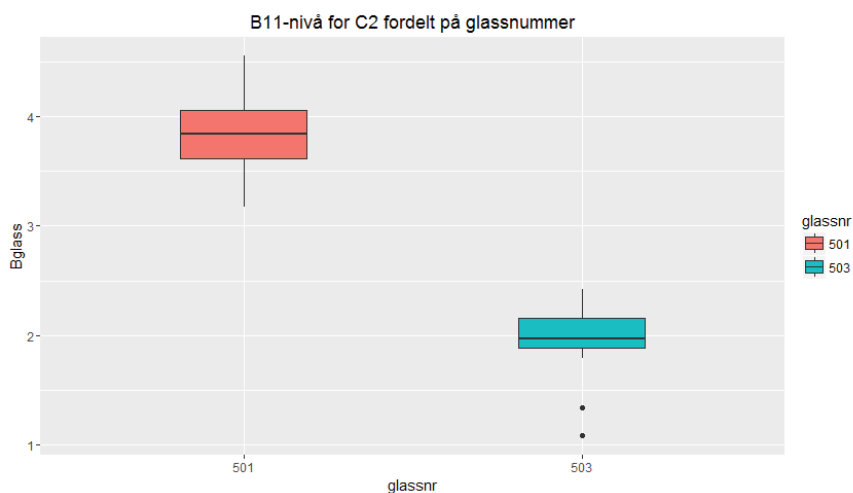
Det ble observert at kalium (K) bidro netto negativt til klassifiseringen. Tabell 2 viser kryssvalidert presisjon uten K.

Tabell 2. Kryssvalidert presisjon (%) for de seks gruppene uten K

Modell/ID	C2	G2	L3	S1	T1	U1
RF	99.9	100	95.8	97.7	91.2	100
KNN	86.7	90.9	81.5	95.3	98.3	90.0

Total kryssvalidert presisjon (på alle 31 gruppene) økte fra 90.3% til 90.6% for KNN og fra 89.3% til 91.3% for Random Forest. På bakgrunn av disse observasjonene ble K forkastet fra analysen.

Bor (B) hadde en observert blokkeffekt i treningsdatasettet. Figur 1 viser forskjellene i B-nivå i gruppe C2 over to glass for sideskudd.



Figur 1. Boksploott for log B-nivå (mg/kg) i gruppe C2 fordelt på glass nr. 501 og 503

En ikke-parametrisk test (se f.eks Kruskal & Wallis., 1952) for gruppetilhørighet forkastet hypotesen om at dataene i de to glassene kommer fra samme fordeling med $p < 0.001$ ($p=10^{-8}$, $n_1 = 25$, $n_2 = 18$). På grunn av disse vurderingene ble B forkastet fra analysen.

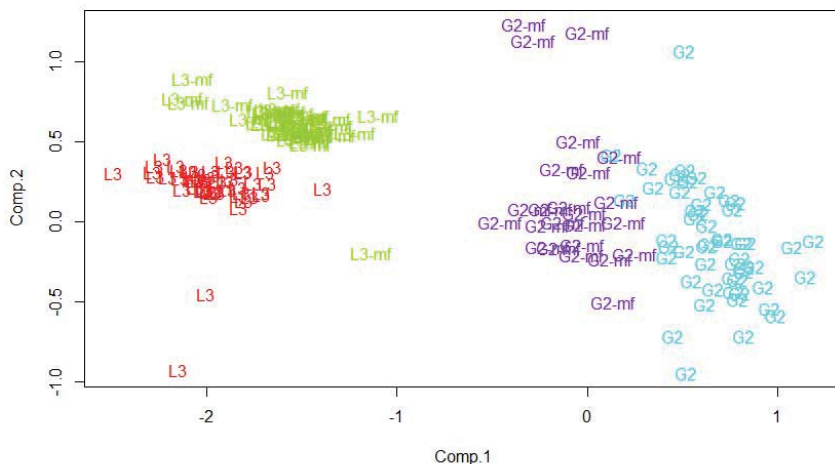
Klassifisering av fisk etter 2 måneder i sjø

Klassifiseringsalgoritmen som ble brukt er et utvalg av forskjellige modeller, herunder Random Forest, k-nærmeste naboer, Naive Bayes og Support Vector Machine. Modellene ble plukket fra en gruppe med 12 kandidatmodeller, basert på iterativ modelltesting og kryssvalidering. De 8 kandidatmodellene som ble vurdert men forkastet var Nevrale Nettverk, XGboost, LDA, Regularized Discriminant Analysis, LVQ, Logistic Regression, Linear Regression og Weighted k-Nearest Neighbours. Sideskudd ble brukt på både treningsdatasettet og testdatasettet. Tabell 3 viser gjennomsnittlig gruppevis klassifiseringspresisjon med standardavviket for modellutvalget basert på 100 kjøringene. Presisjonen for S1, T1 og U1 hadde ingen variasjon mellom kjøringene.

Tabell 3. Gruppevis klassifiseringspresisjon (%) \pm SD for fisk 2-mnd i sjø, klassifisert ved hjelp av Majority Vote av fire modeller trent på 31 settefisk-grupper.

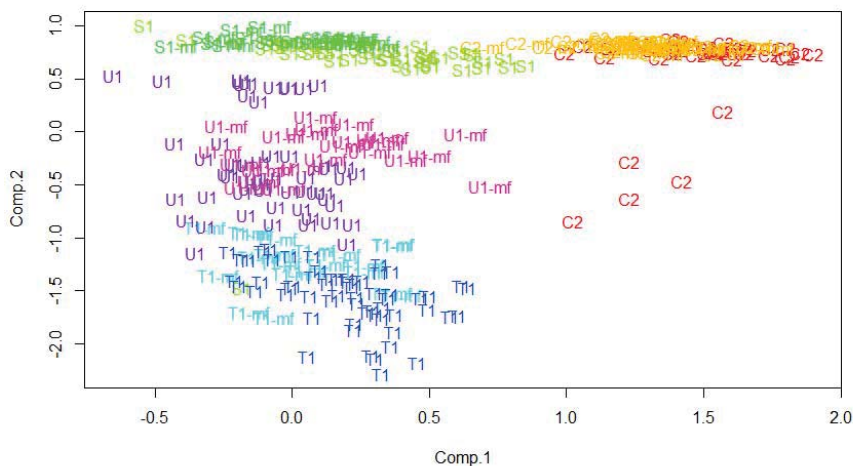
C2-mf	G2-mf	L3-mf	S1-mf	T1-mf	U1-mf	Tot
94.6 \pm 0.3	94.9 \pm 1.7	64.4 \pm 1.2	94.4	80.9	100	86.6 \pm 0.3

PCA-projeksjonene for gruppe L3 og G2 i sjø og ferskvann er illustrert i Figur 2



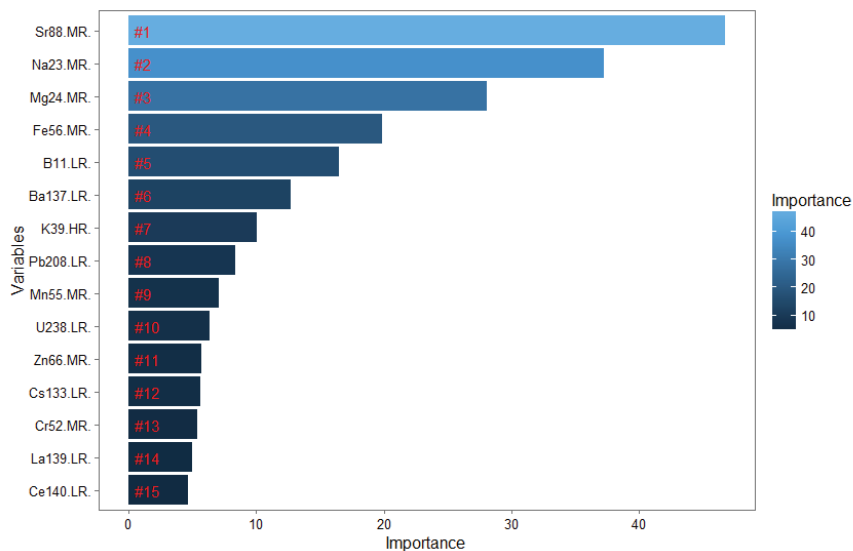
Figur 2. PCA-plot for gruppene L3 og G2 i sjø (grønn og lilla) og ferskvann (rød og blå). Endelsen «-mf» betegner skjell fra matfisk.

Det er en klar forskyvning i gruppe L3 og G2 fra settefisk til matfisk (figur 2), mens for de resterende gruppene er forskyvningen mindre markant (figur 3). Disse forskyvningene tyder på at nivåene for ulike grunnstoff endret seg fra ferskvann til sjø, og at endringene varierte fra gruppe til gruppe. Med treningsdatasett på 31 ulike grupper ble distinksjongrensene for hver gruppe marginal, og en forflytning førte til lavere presisjon i klassifiseringen, spesielt for gruppen som driftet mest (L3).



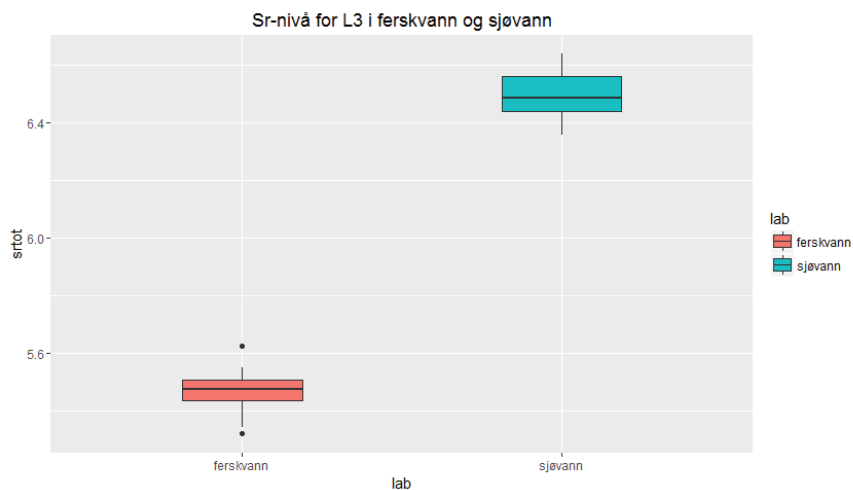
Figur 3. PCA-projeksjonene av gruppe C2, S1, T1 og U1. For disse gruppene var det større grad av overlapp mellom de to prøvetakingstidspunktene, noe som indikerer at enkelte grupper viser mindre endring i ferskvannprofil etter 2 måneder i sjø.

Ved hjelp av kryssvalidering ble det vist at modellen klarte å skille mellom settefisk og matfisk med 98% nøyaktighet. Dette indikerer en signifikant endring i grunnstoffene. For å finne ut hvilke grunnstoff som hadde størst endring, ble det gjort et Importance Plot (Friedman et al., 2001) av Random Forest-modellen. Et Importance Plot rangerer hver variabel etter hvor mye innvirkning den har på avgjørelsen til modellen. Plottet er illustrert i Figur 4.

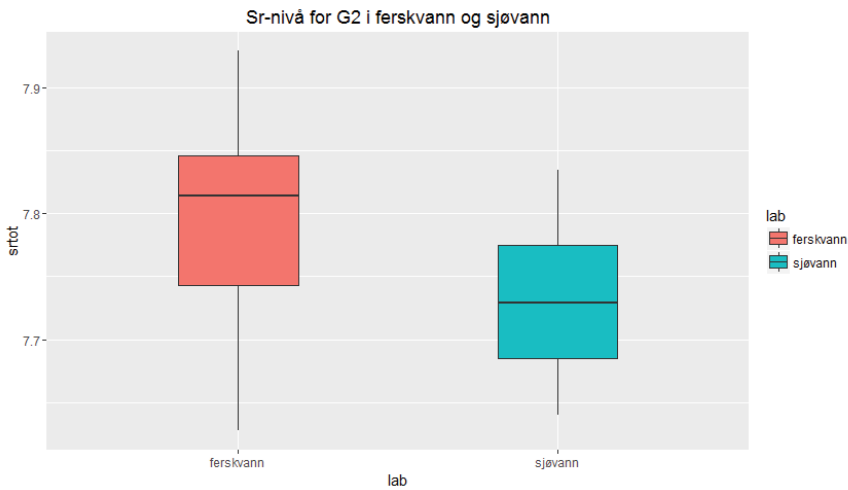


Figur 4. Importance Plot for Random Forest trent på å skille mellom settefisk og sjøsett fisk. Grunnstoffene øverst i listen har mest innvirkning på avgjørelsen av gruppetilhørighet.

Et utvalg av endringer i nivå for ulike grunnstoff er illustrert i figur 5-8.



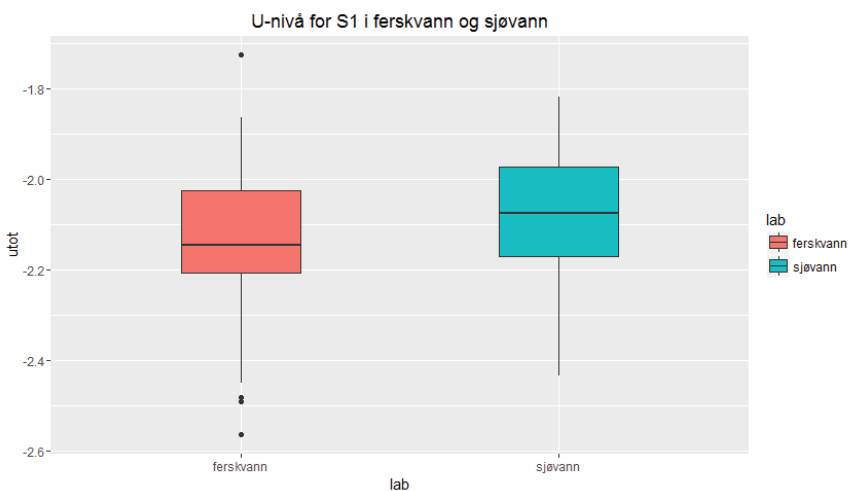
Figur 5. Boks-plot som viser Sr-nivå log(mg/kg) for L3 i ferskvann og etter 2 måneder i sjø



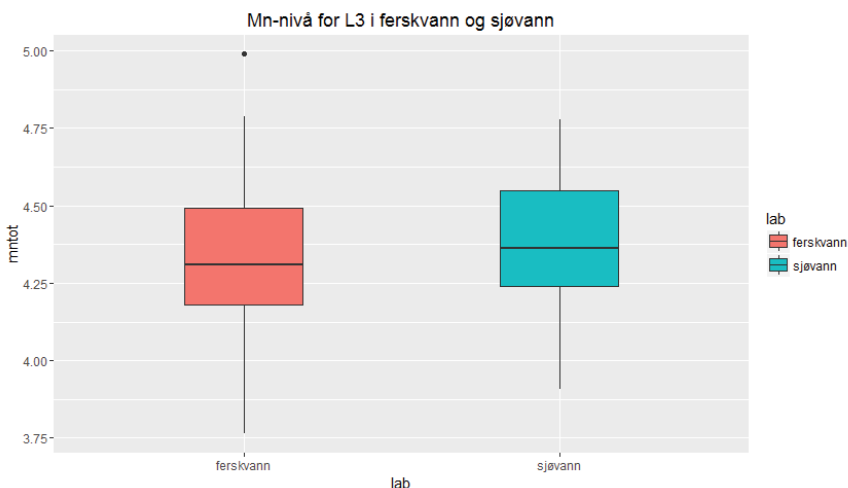
Figur 6. BoksploTT for Sr-nivå log(mg/kg) for G2 i ferskvann og etter 2 måneder i sjø

En Kruskal-Wallis test av Sr i gruppe L3 og L3-mf gir $p < 0.0001$ ($p=2.2 \cdot 10^{-16}$, $n_1 = 54$, $n_2 = 41$) på at nivåene kommer fra samme fordeling. Tilsvarende tester gir $p < 0.0001$ ($p=4.5 \cdot 10^{-6}$, $n_1 = 53$, $n_2 = 24$) for Sr-nivå i gruppe G2 og $p < 0.0001$ ($p=3.4 \cdot 10^{-7}$, $n_1 = 45$, $n_2 = 22$) for Na-nivå i gruppe S1. Disse signifikante nivåforskjellene har ulik påvirkningsgrad på modellene. Bemerk også at Sr-nivået går signifikant ned i gruppe G2 (figur 6), men signifikant opp i gruppe L3 (figur 5).

På den andre siden finnes det grunnstoff som ikke endrer konsentrasjon signifikant i tidsperioden. U-nivå for S1 og Mn-nivå for L3 er illustrert i 7 og 8.



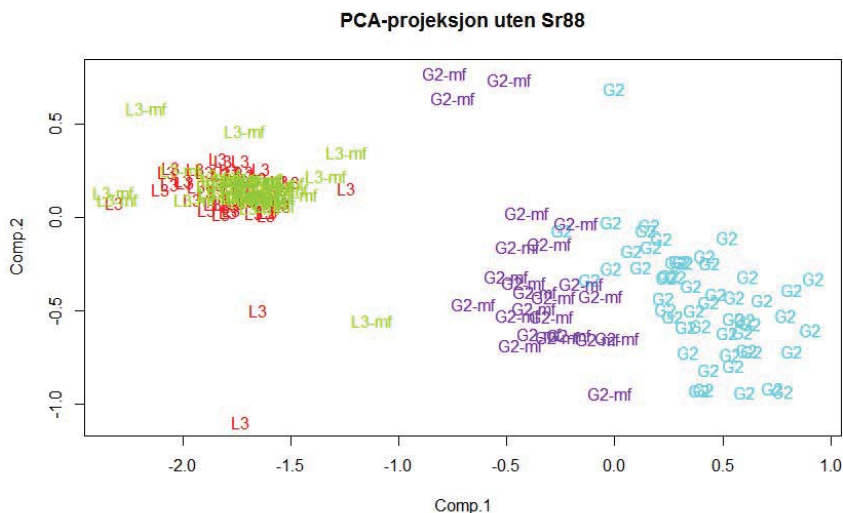
Figur 7. BoksploTT for U-nivå log(mg/kg) for S1 i ferskvann og etter 2 måneder i sjø



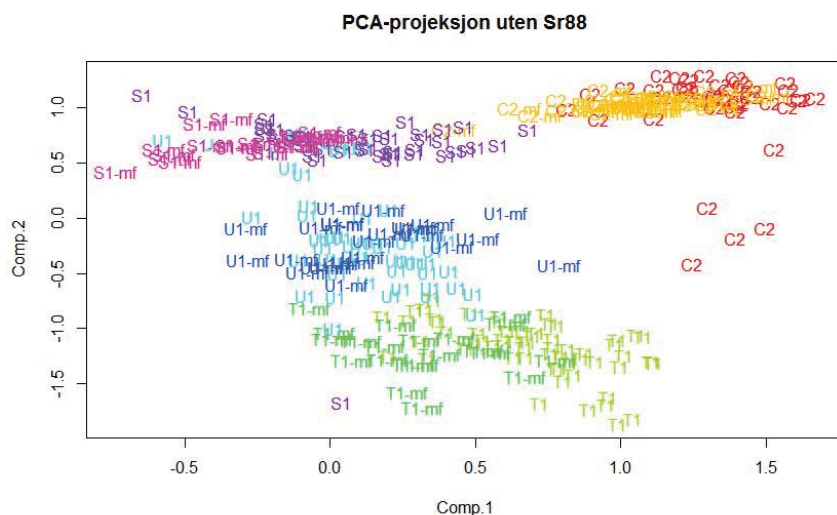
Figur 8. Bokplott for Mn-nivå log(mg/kg) for L3 i ferskvann og etter 2 måneder i sjø

Den samme testen som tidligere gir ikke signifikant endring i nivå. $p = 0.71$ for S1 og $p=0.09$ for L3. Dette underbygger observasjonene i Importance-plottet (figur 4).

Fjerning av de mest endringsutsatte grunnstoffene gir varierende resultater mellom gruppene. En PCA-prosjeksjon av L3 og G2 der Sr er tatt ut er vist i figur 9 og av gruppe C2, S1, T1 og U1 i Figur 9.



Figur 9. PCA-prosjeksjon for L3 og G2, der Sr har blitt utelatt fra analysen



Figur 10. PCA-projeksjon for gruppe C2, S1, T1 og U1, der Sr har blitt utelatt fra analysen.

For de fleste gruppene er settefisk- og matfiskpunktene mindre samlet når Sr er utelatt fra analysene (se figur 3, 9 og 10). Dette viser at Sr er en sterk indikator på gruppetilhørighet for mange grupper, mens hos noen, spesielt L3, er det en variabel som bidrar til feilklassifisering. Sammenlignet med PCA-projeksjonen av gruppe L3 i figur 2 er settefisk- og matfiskpunktene mer samlet i figur 9 der Sr er tatt ut.

Forkasting av de mest endringsutsatte grunnstoffene kan bidra til en stabilisering av datasettet fra ferskvann til sjø. De fire grunnstoffene med mest signifikant endring, Sr, Na, Mg og Fe ble forsøkt forkastet. Tabell 4 viser gjennomsnittlig klassifiseringspresisjon og standardavvik av 100 kjøringer fra modellutvalget med de gjenværende grunnstoffene.

Tabell 4. Klassifiseringspresisjon (%) ± SD der Sr, Na, Mg og Fe har blitt utelatt fra analysen

C2-mf	G2-mf	L3-mf	S1-mf	T1-mf	U1-mf	Tot
87.7 ± 1.3	50.0 ± 1.8	70.7	68.1	90.4	57.7 ± 2.2	71.7 ± 0.5

Enkelte grupper har høyere klassifiseringsprosent (L3, T1), mens klassifiseringsprosenten for andre grupper faller betydelig, eksempelvis faller U1 fra 100% til 57.7%. Den totale presisjonen faller fra 86.6% til 71.7% når Sr, Na, Mg og Fe utelates (se tabell 3 og 4). Dette viser at en fullstendig forkasting av endringsutsatte grunnstoffer ikke løser problemet.

Fra PCA-plottene ser det ut som at matfiskgruppene fortsatt har veldefinerte profiler (figur 9 og 10), selv om de har endret seg. Dette kan verifiseres med en kryssvalidering som vist i Tabell 5.

Tabell 5. kryssvalidert presisjon (%) for matfisk

Modell/ID	C2-mf	G2-mf	L3-mf	S1-mf	T1-mf	U1-mf	Tot
RF	100	100	95.2	91.1	95.3	96.0	96.4
KNN	97.3	87.5	100	100	100	96.0	97.0

Dette viser at profilene fortsatt skilles, og at problemet ligger i endringen av profilene over tid.

Konklusjon

Resultatene fra klassifiseringsalgoritmen, Kruskal-Wallis-testene på grunnstoff og Importance Plots, viste at det er mulig å klassifisere fiskegrupper som har stått to måneder i sjø tilbake til riktig settefiskanlegg basert på ferskvannsprofilen i skjellet. Presisjonen på gruppene varierte mellom 65.9 og 100%. Ferskvannsprofilen endret seg etter to måneder i sjø, og det er forventet at presisjonen vil gå ned for et økende antall fiskegrupper, dette betyr at det er nødvendig å modifisere modellen. Å fjerne de mest endringsutsatte variablene er et netto tap for modellen, så andre modifikasjoner er nødvendig.

Kryssvalidering og PCA-plots for datasettet med matfisk viser at selv om profilen er noe ustabil, vil en gruppe fisk i sjø fortsatt oppføre seg som en gruppe. Dette betyr at det fortsatt er mulig å definere veldefinerte profiler av matfiskgrupper, men at en merd bør prøvetas med jevne mellomrom fra utsett til slakt slik at profilen kan oppdateres over tid.

Referanser

- Friedman, J., Hastie, T., Tibshirani, R., (2001). *The elements of statistical learning* (Vol. 1). Springer, Berlin: Springer series in statistics, pp.594.
- Kruskal, W.H. & Wallis, W.A., (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American statistical Association*, 47(260), pp.583-621.
- Ramsay, A. L., Milner, N. J., Hughes, R. N., McCarthy, I. D., (2011). Comparison of the performance of scale and otolith microchemistry as fisheries research tools in a small upland catchment. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 68, 823-833.
- Ryan, D., Shephard, S., Kelly, F. L. (2016). Temporal stability and rates of post-depositional change in geochemical signatures of brown trout *Salmo trutta* scales. *Journal of Fish Biology*. 89. 3. 1704-1719.
- Wells, B. K., Thorrold, S. R., Jones, C. M., 2003. Stability of elemental signatures in the scales of spawning weakfish, *Cynoscion regalis*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 60, 361-369.

Delrapport H: Langtidsstudie av ferskvannprofilens stabilitet for fisk satt i sjø

Innledning

På bakgrunn av endringene i ferskvannprofil etter 2 måneder i sjø som ble avdekket i delrapport G ble det igangsatt undersøkelser for å dokumentere endringer i ferskvannprofil som funksjon av tid i sjø. Hensikten var å undersøke hvor mye en profil endrer seg over tid, om den er forutsigbar, og hvorvidt profilen stabiliseres etter en viss tidsperiode.

Materiale og metode

Fem av gruppene fra delrapport G ble fulgt videre med prøvetak etter 4, 6, 9 og 12 måneder. I tillegg ble det lagt til en ny gruppe (Z1). Treningsdatasettet (referansematerialet) som ble brukt som basis for klassifiseringen var 31 grupper fra settefiskanlegg, og modellutvalget som ble brukt for klassifiseringen var en finjustert versjon av den som ble brukt i studiet om stabilitet etter 2 måneder i sjø (Delrapport G). Det ble opprettet ett datasett per gruppe, der hvert datapunkt ble markert med hvor lenge det hadde stått i sjø. Gruppen ble deretter forsøkt klassifisert tilbake dit den kom fra. Materialet som ble innsamlet er oppsummert i tabell 1 nedenfor. Hver rubrikk representerer antall skjell undersøkt ved et gitt tidspunkt.

Tabell 1. Oversikt over grupper og antall skjell analysert, først i settefiskanlegget og deretter etter 2-12 måneder i sjø. (-) markerer tidspunkt uten prøvetak.

Gruppe	Settefisk	2 mnd	4 mnd	6 mnd	9 mnd	12 mnd
L3	54	52	-	-	55	50
S1	45	28	29	-	30	29
C2	43	28	26	-	26	29
G2	53	30	-	-	26	24
Z1	58	34	29	29	-	-
U1	57	39	58	30	43	-

Resultater og diskusjon

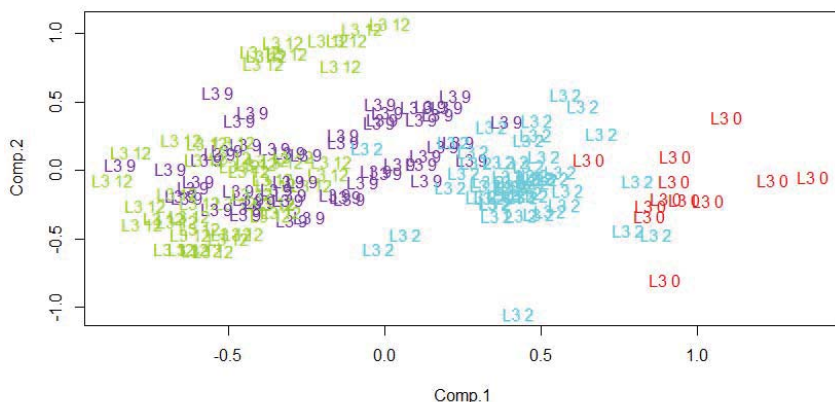
Resultatene fra klassifiseringen er vist i Tabell 2. For disse resultatene og de resterende i delrapporten har det ikke blitt oppgitt standardavvik mellom kjøringene fordi det ble vurdert som neglisjerbart.

Tabell 2. Klassifiseringspresisjon (%) for de seks gruppene som funksjon av tid etter utsett til sjø. (-) markerer tidspunkt uten prøvetak.

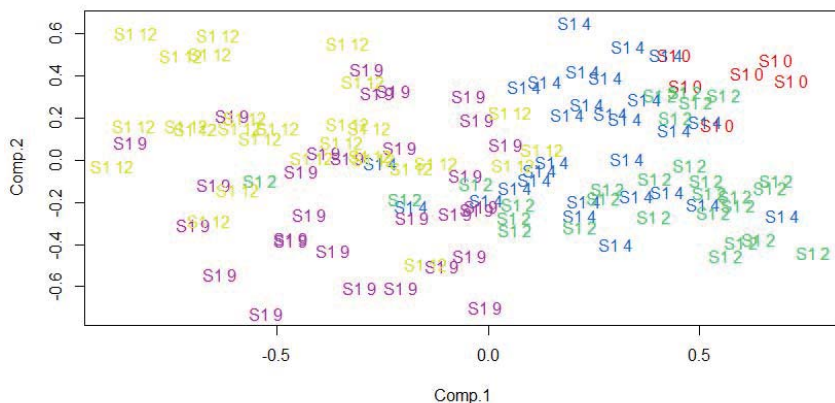
Gruppe	2 mnd	4 mnd	6 mnd	9 mnd	12 mnd
L3	61.5	-	-	0	0
S1	92.9	79.3	-	43.3	27.6
C2	100	58.6	-	6.7	6.7
G2	90.0	-	-	53.8	50.0
Z1	80.0	75.9	72.4	-	-
U1	84.6	1.7	0	0	-

Det var et tydelig fall i klassifiseringspresisjon over tid. Fallet var mest dramatisk for L3, som også var den gruppa med lavest klassifiseringspresisjon i tidligere studier. Fallet i klassifiseringspresisjon over tid tyder på at profilen for gruppene har endret seg over tid, slik at de har driftet vekk fra den gjenkjennbare ferskvannsprofilen. Gjennomsnittlig klassifiseringspresisjon etter 12 måneder er på 24.6%.

Fallet i klassifiseringspresisjon varierte mellom gruppene. Dette tyder på at graden av drift er ulik mellom grupper, og avhenger av hvordan den opprinnelige profilen så ut. Driften kan illustreres ved en PCA-projeksjon. Figur 1 og 2 illustrerer PCA-projeksjonen for to grupper: L3 og S1.



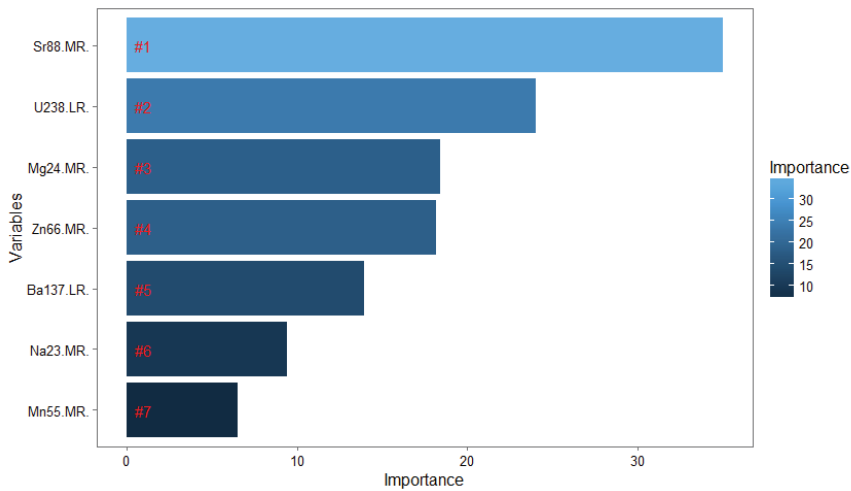
Figur 1. PCA-plot for gruppen L3 i ferskvann(L3-0) og over tid i sjø (L3-2 til L3-12) (2-12 mnd i sjø).



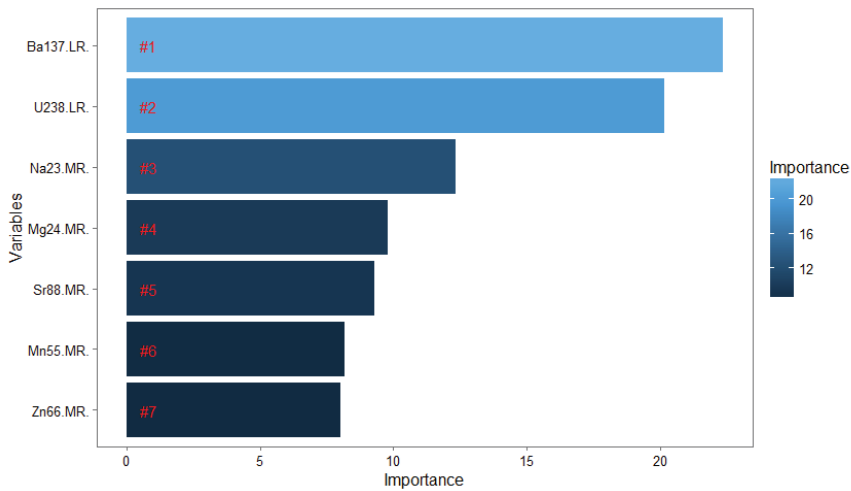
Figur 2. PCA-plot for gruppen S1 i ferskvann(S1-0) og over tid i sjø (S1-2 til S1-12).

Fra PCA-plottene (Figur 1 og Figur 2, merk at skalaene er ulike i de to figurene) kan en se at det er større avstand fra L3-0 (settefisk fra L3) til L3-12 (fisk stått i sjø i 12 måneder) enn fra S1-0 til S1-12. Denne forskjellen kommer primært av at Sr-nivået ble endret mye mer i L3 enn i S1. Fra PCA-plottene er det også mulig å se at gruppene holder seg samlet på gitte tidspunkt. Dette betyr at det fortsatt vil være mulig å bruke gruppedefinisjonen i en analyse.

Det er mulig å vise hvilke grunnstoff som driftet mest i den aktuelle tidsperioden. For å gjøre dette ble en Random Forest trent på å skille mellom ulike tidspunkter innad i en gruppe. For L3 klarte modellen å skille mellom tidspunktene med 90% presisjon, noe som antyder en stor kvantitativ forskjell mellom profilene for de ulike tidspunktene. Importance-plot (figur 3 og 4) illustrerer hvilke grunnstoff som var enklest å skille mellom for de ulike tidspunktene.

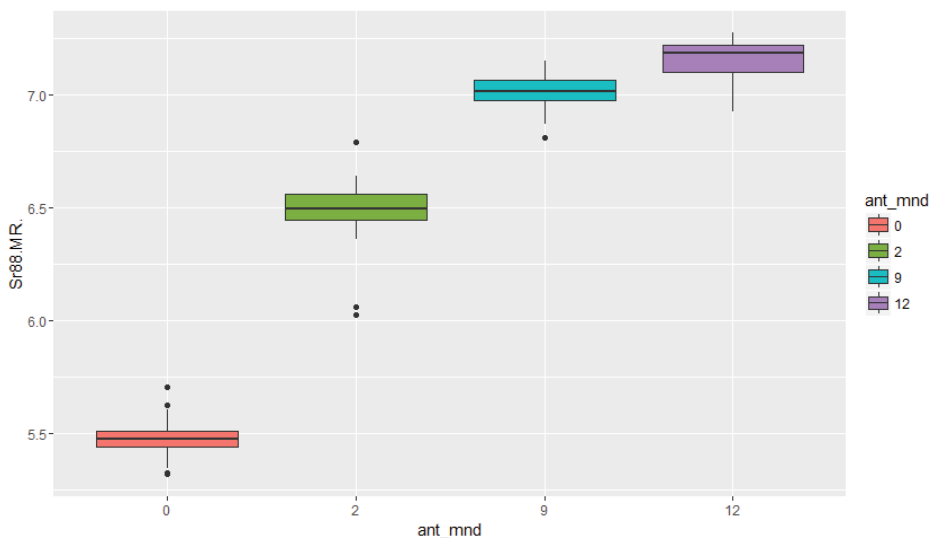


Figur 3. Importance-plot for grunnstoffene i profilen til gruppen L3. Grunnstoffene er rangert etter hvor mye de forbedret klassifiseringspresisjonen.

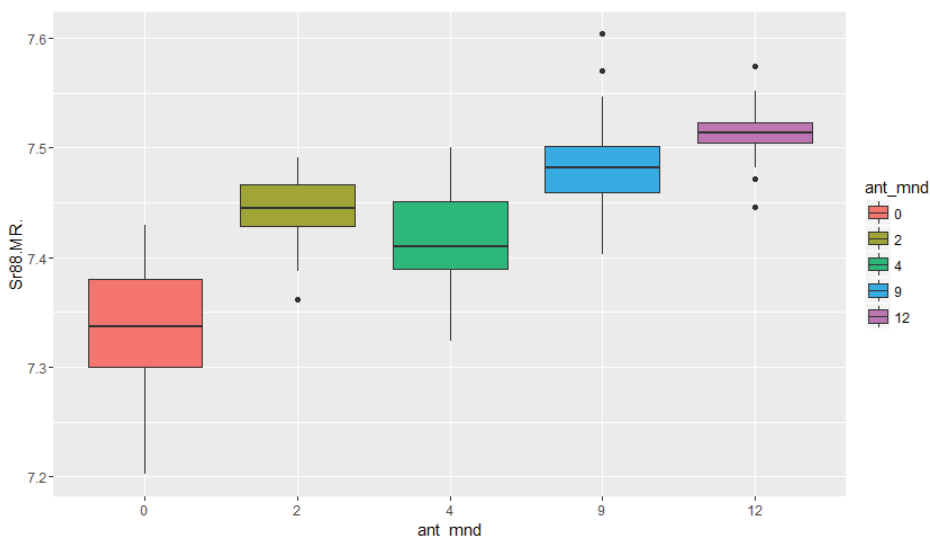


Figur 4. Importance-plot for grunnstoffene i profilen til gruppen C2. Grunnstoffene er rangert etter hvor mye de forbedret klassifiseringspresisjonen.

Driften synes å være forskjellig fra gruppe til gruppe. For eksempel ser det ut som at Sr-nivået var ulikt i de forskjellige tidspunktene for L3, men forholdsvis likt hos C2. Et boksplokk av Sr-nivået for de to gruppene som funksjon av tid i sjø underbygger denne antakelsen (Figur 5 og Figur 6).

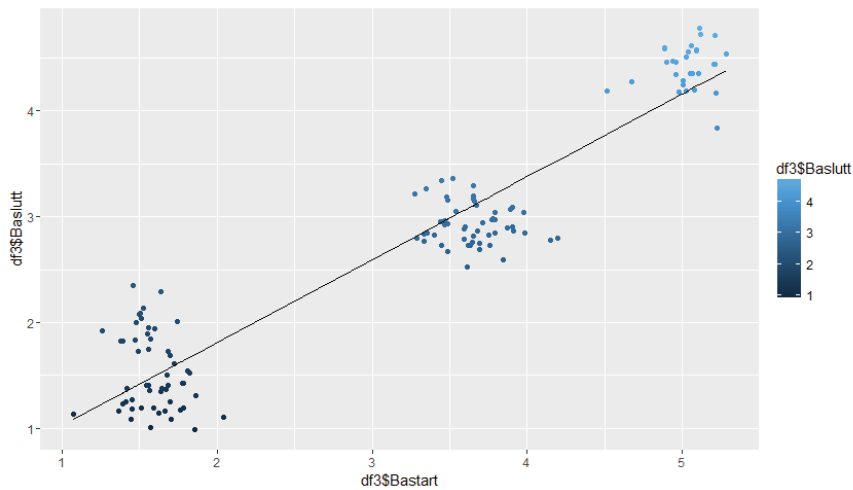


Figur 5. Sr-nivå for gruppe L3 over tid. X-aksen betegner antall måneder etter flytting til sjø, y-aksen betegner log-transformert Sr-nivå.

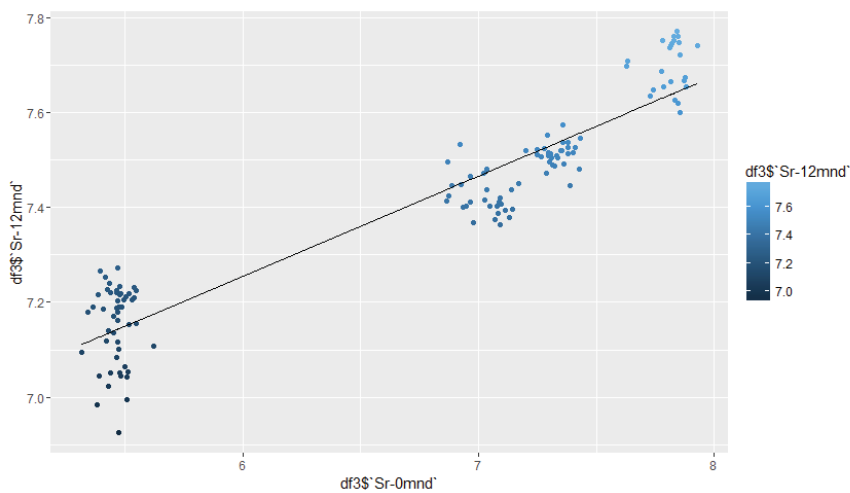


Figur 6. Sr-nivå for gruppe C2 over tid. X-aksen betegner antall måneder etter flytting til sjø, y-aksen betegner log-transformert Sr-nivå.

Graden av endring i Sr-nivå for de to gruppene ser ut til å kunne forklares ved å se på konsentrasjonen av Sr i skjellene før fisken ble flyttet til sjø. Median-nivået av Sr i L3 lå på 238 mg/kg før flytting, mens median-nivået for C2 lå på 1536 mg/kg. Etter ett år i sjø lå median-nivået for L3 på 1303 mg/kg, mens for C2 lå det på 1834 mg/kg. Dette betyr at den relative økningen i Sr for C2 var på 19%, mens for L3 var den på 547%. Dette er også med på å forklare hvorfor noen profiler drifter mer enn andre. Et tilsvarende mønster kan bli funnet for Ba-nivået i skjellene (selv om det ikke er like tydelig): desto høyere Ba-nivå i ferskvann, desto høyere var det relative fallet etter fisken ble flyttet til sjø. Figur 7 og 8 nedenfor illustrerer et "før-etter-plot". Ved å plote log-nivået av Sr og Ba for ferskvannsprøven til settefiskgruppene L3, S1, G2 og C2 mot log-nivået av Sr og Ba for ferskvannsprøven til grupper stått 12 måneder i sjø illustreres sammenhengen mellom Ba- og Sr-nivå i skjellene på de to tidspunktene.

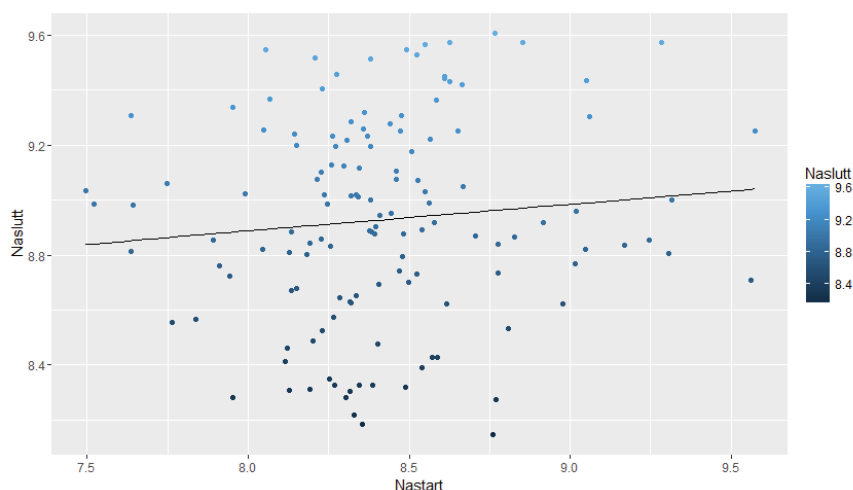


Figur 7. Log-nivået av Ba for ferskvannsprøfingene til settefiskgrupper (x-aksen) mot log-nivået av Ba for ferskvannsprøfingene til de tilsvarende gruppene etter 12 måneder i sjø (y-aksen).

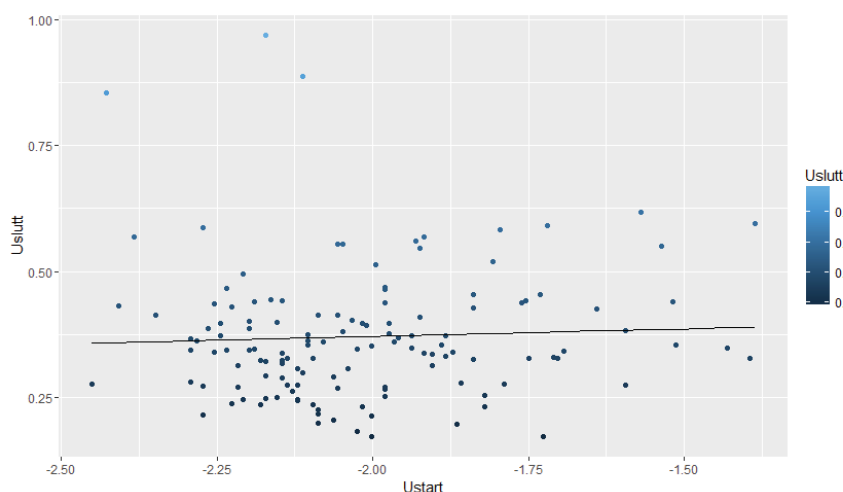


Figur 8. Log-nivået av Sr for ferskvannsprøfingene til settefiskgrupper (x-aksen) mot log-nivået av Sr for ferskvannsprøfingene til de tilsvarende gruppene etter 12 måneder i sjø (y-aksen).

De andre grunnstoffene ser også ut til å ha en viss drift, men det er ikke funnet noen sammenheng mellom verdiene i ferskvannsfasen og verdiene i sjø. Før-etter-plot for Na og U er vist i Figur 9 og Figur 10.



Figur 9. Log-nivået av Na for ferskvannsprøfelen til settefiskgrupper (x-aksen) mot log-nivået av Na for ferskvannsprøfelen til de tilsvarende gruppene etter 12 måneder i sjø (y-aksen).



Figur 10. Log-nivået av U for ferskvannsprøfelen til settefiskgrupper (x-aksen) mot log-nivået av U for ferskvannsprøfelen til de tilsvarende gruppene etter 12 måneder i sjø (y-aksen).

Dynamikken i driften for utvalgte grunnstoff for de seks gruppene som er undersøkt er oppsummert i listen nedenfor:

- Sr: økning i medianverdi fra ferskvann til sjø, graden av økning var avhengig av de opprinnelige konsentrasjonene i ferskvann.
- Ba: medianverdien sank fra ferskvann til sjø, graden ser ut til å være relatert til de opprinnelige verdiene i ferskvann, men sammenhengen er ikke like åpenbar som for Sr.
- Uran: økning av medianverdi fra ferskvann til sjø, fra rundt 0.1 mg/kg til 0.4 mg/kg.
- Mangan: økning av medianverdi fra ferskvann til sjø, moderat sammenheng mellom verdiene i ferskvann og verdiene i sjøvann.
- Litium: økning av medianverdi fra ferskvann til sjø

Fiskens skjell består av kalsium-hydroksoapatitt (CaHAP), og det er blitt påvist i flere studier at det foregår ionebytting mellom Ca^{2+} -ioner i CaHAP-strukturen og Sr^{2+} -ioner i omgivelsene (se f.eks. Bigi et al., 2007). Dette fenomenet har også blitt diskutert i andre studier av anadrom fisk (Wells et al., 2000; Courtemanche et al., 2006). Den samme dynamikken er blitt påvist mellom Ca^{2+} og Ba^{2+} (LeGeros & LeGeros, 1993). Sjøvann har generelt høyere Sr-nivå, og lavere Ba-nivå enn ferskvann. Når fisken blir eksponert for sjøvann vil konsentrasjonene av disse grunnstoffene i skjellet gå mot en ny likevekt. Det er

gjort mindre undersøkelser på hvordan Li og U reagerer med CaHAP: et studie indikerte at CaHAP-strukturen kan ta opp Li (Koutsoukos & Nancollas, 1986), men at nivået var under deteksjonsgrensen for datidens analyseinstrumenter. Simon et al., (2008) viste at U kan renses fra saltvann ved bruk av CaHAP-strukturer, dette er konsistent med resultatene i denne delrapporten.

Mulige løsninger på drift i profilen

Fire mulige måter å motvirke driften i profil er diskutert under.

En mulig måte å motvirke driften på er å fjerne grunnstoffene som er mest ustabile fra analysen. Sr ble vurdert som det grunnstoffet som er mest ustabil. Klassifiseringspresisjonen for gruppene der Sr er utelatt fra analysen er vist i Tabell 3.

Tabell 3. Klassifiseringspresisjon (%) for grupper ved gitte tidspunkt etter flytting til sjø der Sr er utelatt fra analysen. (-) markerer tidspunkt uten prøvetak.

Gruppe	2 mnd	4 mnd	6 mnd	9 mnd	12 mnd
L3	61.5	-	-	60.0	38.0
G2	3.3	-	-	0	0
S1	60.7	17.2	-	0	0
C2	100	65.4	-	57.7	24.1
Z1	56.7	69.0	69.0	-	-
U1	79.5	43.1	10.0	18.6	-

Presisjonen økte fra 0% til 60.0% og 38.0% for L3, der Sr-nivået endret seg mest (tabell 2 og 3). For de andre gruppene derimot, hadde fjerningen av Sr en negativ effekt på helheten. Det samme viste seg å stemme for flere av grunnstoffene som driftet mest (Ba, U, Mn). Dette betyr at fjerning av ustabile grunnstoff ikke er en tilfredsstillende løsning på problemet.

En annen mulig måte å gå fram på er å rekonstruere profilen slik den opprinnelig så ut ved hjelp av lineær regresjon eller liknende. Data på 12 måneder i sjø ble forsøkt tilbakeberegnet på denne måten og deretter klassifisert. Resultatet er vist i Tabell 4.

Tabell 4. Klassifiseringspresisjon (%) for fire grupper etter 12 måneder i sjø, der profilen er forsøkt tilbakeberegnet ved hjelp av regresjon. De resterende gruppene er utelatt fordi de ikke hadde data på 12 måneder.

L3	S1	G2	C2
13.2	3.6	41.7	82.7

Resultatene ser ut til å bli noe bedre, men presisjonen er fortsatt ikke tilfredsstillende. Denne prosedyren kompliseres også av at man vil trenge én tilbakeskrivingsmodell per tidspunkt, altså en for fisk som har stått 12 måneder i sjø, en for 9 måneder i sjø og så videre.

Et tredje alternativ er å lage noen erfaringsbaserte beslutningsregler (tommelfingerregler) basert på observasjonene av drift i grunnstoff. På denne måten kan man eliminere noen anlegg fra analysen i en innledende vurdering, og deretter kjøre de resterende kandidatene gjennom en statistisk modell. To regler som er naturlig å trekke basert på resultatene fra denne problemstillingen er:

- Sr-nivået i skjellet vil enten øke eller holdes konstant når det blir eksponert for sjøvann
- Ba-nivået i skjellet vil enten synke eller holdes konstant når det blir eksponert for sjøvann

Disse kan kvantifiseres på følgende måte: For en ukjent gruppe fisk og en mengde med kandidatanlegg, behold eller forkast et kandidatanlegg basert på følgende regler:

- Hvis medianen av Sr-nivået for kandidatanlegget er høyere enn øvre 95-persentil av Sr-nivået for den ukjente gruppa, forkastes kandidatanlegget fra analysen
- Hvis medianen av Ba-nivået for kandidatanlegget er lavere enn nedre 5-persentil av Ba-nivået for den ukjente gruppa, forkastes kandidatanlegget fra analysen

Etter man har eliminert disse anleggene kjøres de resterende anleggene og den ukjente gruppa gjennom samme modellutvalg som tidligere. Denne modellen ble forsøkt implementert og testet. Resultatene er vist i Tabell 5.

Tabell 5. Klassifiseringspresisjon (%) for de ulike gruppene ved gitte tidspunkt (2-12 måneder i sjø) der en kombinasjon av en erfaringsbasert modell og et modellutvalg har blitt brukt i klassifiseringen.

Gruppe	2 mnd	4 mnd	6 mnd	9 mnd	12 mnd
L3	30.8	-	-	0	0
G2	93.3	-	-	50	54.2
S1	96.4	93.1	-	56.7	51.7
C2	100	73.1		100	89.7
Z1	86.7	93.1	100	-	-
U1	87.2	3.4	0	0	-

Resultatene ble forbedret noe sammenlignet med resultatene i tabell 2, spesielt for 2 og 4 måneder, men etter 9 måneder var presisjonen fortsatt uakseptabel. Et annet problem med en slik modell er at beslutningsreglene er basert på driften slik den ser ut for seks grupper, og siden driften viser seg å være heterogen, er det nærliggende å tro at reglene kan bli brutt for andre grupper som viser en annen type drift.

Siden profilene ser ut til å drifte likt gruppevis, vil et fjerde alternativ være å oppdatere datasettet over gruppenes levetid. Det vil si at man må ta skjell fra fisk i gitte tidsintervaller etter at de har blitt flyttet til sjø; på denne måten vil man kunne oppdatere profilen slik at profilen til rømt fisk ikke drifter for langt vekk fra referansematerialet. Siden profilene ser ut til å drifte mest i starten vil det være naturlig å prøveta oftere i starten og etter hvert kutte ned på prøvetakingsfrekvensen.

Denne metoden ble testet på gruppene som hadde data på 9 og 12 måneder (L3, G2, S1 og C2): i treningsdatasettet med de 31 settefiskgruppene ble datapunktene for L3, G2, S1 og C2 byttet ut med tilsvarende grupper prøvetatt etter 9 måneder. Deretter ble modellutvalget trent på det oppdaterte datasettet, og tilsvarende grupper prøvetatt etter 12 måneder ble forsøkt klassifisert av modellutvalget. Resultatet er gitt i Tabell 6.

Tabell 6. Klassifiseringpresisjon (%) for grupper stått 12 måneder i sjø med referansemateriale fra 9 måneder i sjø.

L3	G2	S1	C2	TOT
98.1	91.7	75.0	100	92.5

Metoden med gjentatt prøvetak gir klart best resultater av de fire alternativene. Sammenlignet med resultatene i tabell 2 har klassifiseringspresisjonen for L3 økt fra 0% til 98.1% etter 12 måneder i sjø, S1 har økt fra 27.6% til 75.0%, C2 har økt fra 6.7% til 100% og G2 har økt fra 50.0% til 91.7%.

Konklusjon

Seks fiskegrupper i ulike matfiskanlegg ble regelmessig prøvetatt over en periode på ett år. Skjellprøvene ble deretter analysert for å undersøke stabiliteten av grunnstoffene i ferskvannprofilen. Resultatene viste at klassifiseringspresisjonen falt for alle gruppene over tid, og at presisjonen etter 12 måneder i sjø varierte fra 0-50% med 24.6% gjennomsnittlig riktig klassifisert. Profilene framsto fortsatt som samlede grupper, selv om konsentrasjonen av de enkelte grunnstoffene i profilene ble endret over tid.

Fire mulige løsninger på forandringene i profiler ble undersøkt: fjerne grunnstoffene som drifter mest, ulike modeller for å tilbakeberegne profilene, erfaringsbasert modell basert på den observerte dynamikken, og gjentatt prøvetak av samme gruppe over tid. Det siste alternativet ga klart best resultater ved sammenlikning av grupper som hadde stått 9 måneder i sjø med grupper etter 12 måneder i sjø (gjennomsnittspresisjon på 92.5%). På grunn av at endringene ser ut til å være størst i perioden rett etter flytting fra ferskvann til sjøvann, vil det være mulig å redusere de logistiske utfordringene ved å samle inn prøver ofte i starten, og deretter redusere frekvensen etter hvert.

Referanser:

- Bigi, A., Boanini, E., Capuccini, C., Gazzano, M. (2007). Strontium-substituted hydroxyapatite nanocrystals. *Inorganica Chimica Acta*, 360(3), pp.1009-1016.
- Courtemanche, D. A., Whoriskey, Jr, F. G., Bujold, V., Curry, R. A. (2006). Assessing anadromy of brook char (*Salvelinus fontinalis*) using scale microchemistry. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 63(5), pp.995-1006.
- Koutsoukos, P.G. & Nancollas, G.H. (1986). The effect of lithium on the precipitation of hydroxyapatite from aqueous solutions. *Colloids and Surfaces*, 17(4), pp.361-370.
- LeGeros, R. Z. & LeGeros, J. P. (1993) "Dense hydroxyapatite." in Hench, L.L., Wilson, J. *Advanced series in ceramics Vol.1, An introduction to Bioceramics*, World Scientific Publishing, Singapore, pp.139-180.
- Simon, F. G., Biermann, V., Peplinski, B. (2008). Uranium removal from groundwater using hydroxyapatite. *Applied Geochemistry*, 23(8), pp.2137-2145.
- Wells, B. K., Bath, G. E., Thorrold, S. R., Jones, C. M. (2000). Incorporation of strontium, cadmium, and barium in juvenile spot (*Leiostomus xanthurus*) scales reflects water chemistry. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57(10), pp.2122-2129.

Delrapport I: Simulert rømming: Sporing av fisk tilbake til lokalitet

Introduksjon

I denne undersøkelsen ble det testet om sporingsmetoden kan benyttes i en beredskapssituasjon etter rømming fra sjøanlegg. For å simulere en rømmingssituasjon ble det gjennomført en innsamling av referansemateriale fra matfiskanlegg innen en region som omfattet øyene og områdene rundt Frøya og Hitra samt områdene innover til fastlandet.

Referansematerialet (de aktuelle anleggene innen regionen) som ble samlet inn ble brukt på to ulike måter. I scenario 1 ble det i tillegg til referansematerialet lagt til en gruppe «rømt laks» som kom fra et annet geografisk område og denne gruppen ble forsøkt identifisert for å sikre seg mot «feilaktig skyld» i en slik situasjon. Det ble også brukt kryssvalidering på alle gruppene for å teste om rømt fisk kunne plasseres tilbake til riktig lokalitet.

I scenario 2 ble det brukt samme referansemateriale. I tillegg ble det tatt inn en gruppe fra ett anlegg med ukjent tilhørighet samt andre enkeltfisk. Dette ukjente materialet, kalt «ukjentgruppa», representerer et rømmingsscenario der et gitt antall rømt oppdrettslaks blir fisket opp, og hvor enkelte av de oppfiskede individene tilhører andre rømminger enn den som undersøkes. Undersøkelsene av ukjentgruppa ble utført som en blindtest, og ble plassert tilbake til riktig lokalitet ved bruk av sammensatte analytiske og statistiske metoder.

Materiale og metode

Det ble satt følgende krav til valg av region/område og materiale i testen:

1. Anlegg fra flere av de største oppdrettsselskapene inkluderes i forsøket
2. Minimum seks anlegg med i simuleringen
3. Medianvekt på aktuelle grupper på rundt 3 kg
4. Det geografiske området skal være naturlig avgrenset

Regionen omfatter øyene rundt Frøya, Hitra og området inn mot fastlandet. Anleggenes geografiske plassering er vist i Figur 1 nedenfor.



Figur 1. Kartet viser de seks sjølokalitetene i test-regionen, og omfatter sjøområdene rundt øyene Frøya, Hitra og området inn mot fastlandet.

Referansemateriale

Det ble gjennomført innsamling av skjellprøver av 50 individer fra 11 merder ved 6 lokaliteter. For de fleste av disse ble innsamlingen foretatt i uke 29 og 30 (18-31 juli 2016). Unntaket var T-3 og T-4 som ble prøvetatt uke 33 (16 august 2016). Skjellprøver ble plukket og lagret etter vanlig prosedyre som beskrevet i vedlegg 1, Prosedyre ved uttak av skjellprøver. En oppsummering av materialet som ble samlet inn er gitt i Tabell 1.

Tabell 1. Oversikt over gruppene innsamlet fra matfiskanlegg i forbindelse med simulerings-testen. Vannkvaliteten i settefiskanlegget er vist: FV=ferskvann; FV/SV=ferskvann med sjøvannsinnblanding og TS= tørrsalt til 1-2 ‰. Fiskens totalengde er angitt for hver gruppe (min, med og max), N=50 per gruppe.

Vannkvalitet i settefiskanlegget	Matfiskanlegg	Lengde Fisk (mm)		
		Min	Med	Max
FV	B-4	595	710	765
FV	K-3	570	693	750
TS	K-6	505	640	745
FV	LT-3	530	610	740
FV/SV	LT-4	500	595	655
FV	O-3	435	608	705
FV/SV	O-5	530	625	715
FV/SV	O-11	530	618	685
FV/SV	S-9	550	560	720
FV/SV	T-4	490	720	800
FV/SV	T-3	480	665	750
FV	R-1	500	650	700
U	U	490	585	665

Ekstra materiale

Det ble analysert åtte individer fra en gruppe lokalisert utenfor regionen. Denne gruppen brukes i scenario 1 av problemstillingen for å teste om man kan skille ut en rømt gruppe som ikke kommer fra noen av anleggene i regionen (matfiskanlegg R-1 i tabell 1).

"Ukjentgruppa" i scenario 2 skulle representere en simulert rømt gruppe, denne gruppen (matfiskanlegg U i tabell 1) ble prøvetatt fra en av merdene representert i referansematerialet, men prøvetatt tre dager tidligere og anonymisert.. I dette uttaket ble det samlet inn skjellprøver fra 30 fisk. I tillegg ble det inkludert ni individer fra andre anlegg i denne gruppen, de skulle representere fisk fra tidligere rømminger. I løpet av analysen ble ett av individene forkastet slik at man sto igjen med åtte individer fra andre anlegg.

Scenario 1**Springing av rømt fisk til lokalitet ved kryssvalidering***Bakgrunn og materiale*

Det er rimelig å anta at en kryssvalidering vil kunne gi et representativt bilde av potensialet til springismetoden. Kryssvalideringen er beskrevet under "oppsett av simulering".

I tillegg til kryssvalidering av referansematerialet beskrives også en situasjon der den rømte fisken ikke tilhører referansematerialet. Dette representeres ved en gruppe fra Rogaland (R-1). Oversikt over de ulike lokalitetene og gruppene (merdene), antall skjell benyttet i simuleringen og betegnelser på gruppene som er med i testen er gitt i Tabell 2.

Tabell 2. Oversikt over anlegg, merder, samt antall skjell som ble benyttet i simuleringen. Anlegget R-1 ligger i Rogaland, utenfor den aktuelle regionen.

Anlegg	Merdnr	Betegnelse	Antall skjell
B	4	B-4	57
K	3	K-3	53
K	6	K-6	55
LT	3	LT-3	45
LT	4	LT-4	46
O	3	O-3	49
O	5	O-5	60
O	11	O-11	64
S	9	S-9	57
T	3	T-3	47
T	4	T-4	60
R	1	R-1	26

Oppsett av simulering

Rømmingsscenarier fra anleggene innen regionen ble simulert med følgende prosedyre:

1. Velg ett anlegg der rømmingen skal forekomme (eks: T-4)
2. Trekk tilfeldig ut 1/3 av skjellene fra det valgte anlegget og sett de til side. Dette materialet utgjør den «rømte fisken» i denne simuleringen.
3. Basert på de resterende skjellene trenes et utvalg modeller. De resterende skjellene representerer nå det opparbeidede materiale i en rømmingssituasjon hvor fisk, i dette tilfellet T-4, har rømt.
4. Hent skjellene fra punkt 2 og klassifiser de ved hjelp av modellene fra punkt 3.

5. Sammenlikn resultatene fra punkt 4 med «fasiten», i dette tilfellet T-4.
6. Gjenta punkt 1-5 for alle anlegg.

Resultat og diskusjon

Et modellutvalg bestående av fem forskjellige modeller (RF, LDA, SVM, NB, KNN) ble benyttet ved klassifisering av «rømt» fisk. En rømming ble simulert 300 ganger per anlegg for å få et representativt bilde av faktisk modellpresisjon. Resultatet er vist i tabell 3.

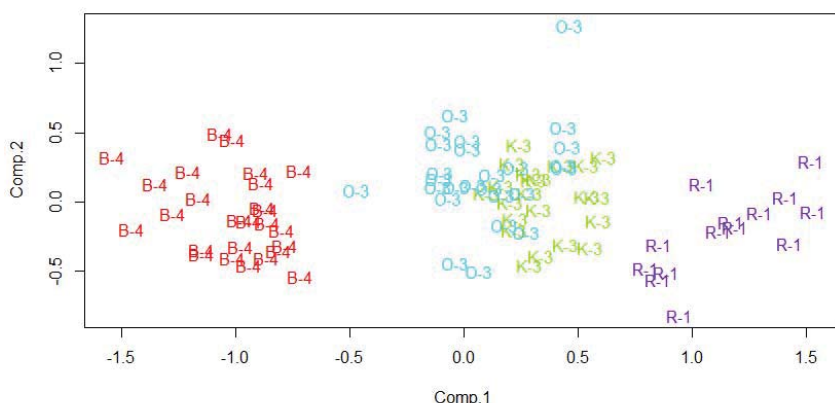
Tabell 3. Presisjon ved tilbakeføring av skjell til riktig gruppe, som her betyr riktig merd i sjøanlegg innen regionen.

Gruppe	B-4	K-3	K-6	LT-3	LT-4	O-3	O-5	O-11	S-9	T-3	T-4
Presisjon (%)	88.5	94.2	97.2	88.2	82.5	94.4	74.4	72.3	48.9	67.7	76.2

Resultatet viser høyest presisjon for grupper uten sjøvannstilblending i settefiskanlegg (85-97%), (B-4, K-3, K-6, LT-3 og O-3) og lavest presisjon for grupper gitt sjøvannstilsetning (49-88%), (LT-4, O-5, O-11, S-9, T-3 og T-4) (tabell 3). På grunn av økt usikkerhet ved posisjonering på skjell av disse gruppene var det forventet en noe lavere presisjon. Basert på disse simuleringene forventer en å kunne spore tilbake med 85-95% sikkerhet i en liknende rømmingssituasjon, gitt at fisken ikke har hatt sjøvannstilsetning. Dette forutsetter at materialet er samlet inn i løpet av en begrenset tidsperiode. Hvis en kan løse utfordringen rundt posisjonering i skjell fra fisk gitt sjøvannstilsetning forventer en å oppnå bedre presisjon også for disse gruppene.

Rømt fisk fra annen region (R-1)

Metoden bør avdekke om den rømte fisken kommer fra et annet anlegg enn det som er representert i referansematerialet. Dette ble simulert ved å inkludere et materiale fra et anlegg utenfor regionen (R-1). Ut fra Sr/Ba-metoden var det mulig å konkludere at gruppen ikke hadde hatt sjøvannstilsetning. Derfor ble anleggene S-9, LT-4, O-5, O-11, T-3 og T-4 eliminert som mulige kandidater. Analysene trakk frem tre kandidatgrupper som R-1 potensielt kunne høre til: B-4, O-3 og K-3. En PCA-projeksjon av fisk fra R-1 og de tre kandidataneleggene er vist i Figur 2.



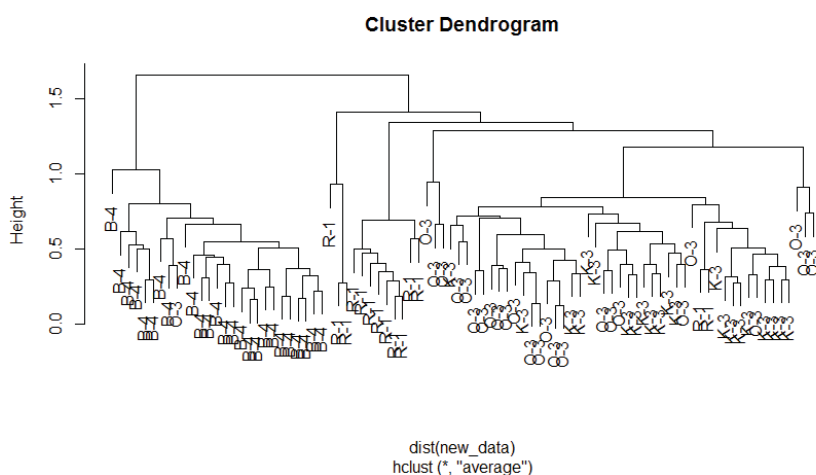
Figur 2. Første og andre komponenten i en PCA-projeksjon illustrerer at R-1 skiller seg ut fra de andre gruppene.

For å bestemme om R-1 kan sies å være signifikant forskjellig fra resten av referansematerialet ble det bestemt å gjøre en hierarkisk cluster-analyse. En hierarkisk cluster-analyse baserer seg på ideen om at individer som er «nær hverandre» (har mer lik kjemisk profil enn øvrige individer) hører til samme cluster (Hastie et al., 2009). En hierarkisk metode vil derfor binde sammen individer og forme cluster basert på innbyrdes avstand. Det finnes flere ulike avstandsmål man kan basere metoden på, men for datasettet i

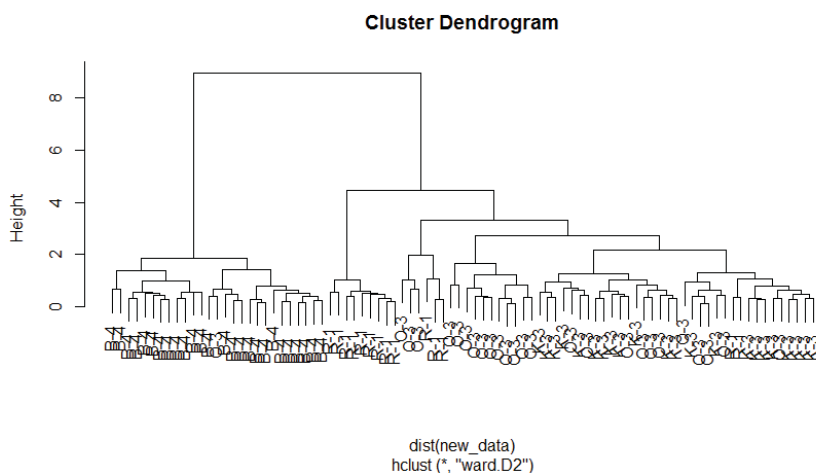
den simulerte rømmingen vil det være naturlig å bruke euklidisk avstand, da Aitchison-avstanden i compositional data «oversettes» til euklidisk avstand etter en ilr-transformasjon (Egozcue et. al, 2003). En hierarkisk clustermetode starter med antakelsen om at hvert individ er én cluster. Deretter, for hvert individ, finner metoden det andre individet som er mest likt og slår de sammen. Deretter vil algoritmen jobbe seg hierarkisk oppover, der den slår sammen forskjellige clusterer basert på hvor like de er.

Det finnes ulike måter å måle hvor like to clusterer er. De mest aktuelle metodene for dette datasettet er Average Linkage, som er definert som gjennomsnittlig avstand mellom individene i de to clusterene, og Ward's metode (Ward, 1963), som velger clusterne som minimerer innbyrdes varians i clusteren etter sammenslåing. En centroid-basert clustermetode baserer seg på å definere et sentrumspunkt for alle clusterer, og deretter allokere individer til dette sentrumspunktet basert på avstand. Det finnes ingen generell metode for å løse dette problemet, men det finnes ulike tilnæringsmetoder. Den mest brukte i litteraturen heter Lloyd's algoritme, eller k-means (Lloyd, 1982). En cluster-analyse med Ward's metode fant 3 clusterer, der R-1 ble definert som en egen cluster. K-means var splittet mellom 2 og 4 clusterer, mens Average Linkage fant 2.

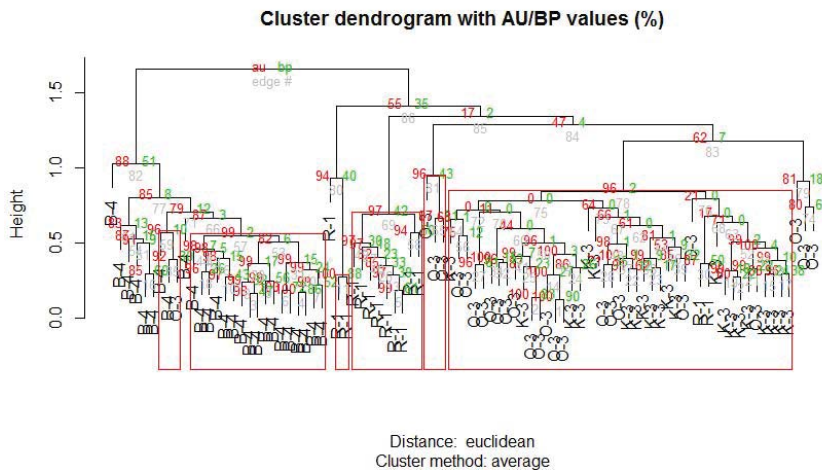
En måte å illustrere en hierarkisk cluster på er å lage et dendrogram. Høyden på dendrogrammet sier noe om graden av ulikhet: desto høyere opp en cluster forgrenes, desto mer ulik er den sammenliknet med resten av datasettet. Figur 3 illustrerer bruken av metoden Average Linkage mens figur 4 illustrer Ward's metode. R-1 forgrenes høyt opp i begge dendrogrammene og ser derfor ut til å være en egen gruppe.



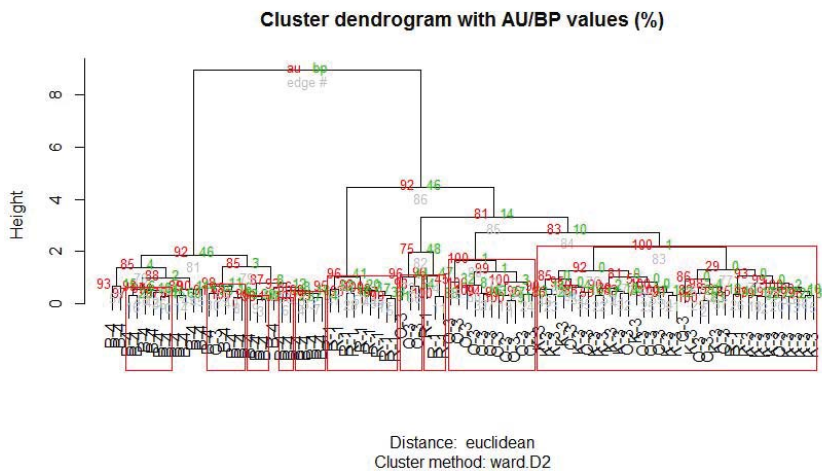
Figur 3. Cluster dendrogram illustrerer bruken av metoden Average Linkage. R-1 forgrenes høyt opp i dendrogrammet og ser derfor ut til å være en egen gruppe.



Figur 4. Cluster dendrogram illustrerer Ward's metode. R-1 forgrenes høyt oppe i dendrogrammet.



Figur 5. Cluster dendrogram med p-verdier (Average Linkage). Clustere med p-verdi over 0.95 er innrammet i rød boks.



Figur 6. Cluster dendrogram med p-verdier (Ward's). Clustere med p-verdi over 0.95 er innrammet i rød boks.

Figur 5 og 6 illustrerer de samme cluster dendrogrammene med p-verdier for Average Linkage og Ward's metode. Gruppene i de røde rektanglene hadde p-verdi over 0.95. Begge dendrogrammene har et rektangel som inneholder nesten hele R-1 gruppa. Basert på clusteranalysene og PCA-plottet (figur 2), anses det som meget sannsynlig at R-1 er en egen gruppe, og som derfor ikke hører hjemme i referansematerialet.

Konklusjon

Basert på resultatene fra kryssvalideringen vil det være mulig å avgjøre hvilken merd som har hatt en rømming med høy presisjon (88-97%), gitt at fisken ikke har fått sjøvannstilsetning i settefiskanlegget. For en ukjent gruppe som ikke har rømt fra det nærliggende geografiske området viser undersøkelsene at den mest sannsynlig ikke hørte til i noen av anleggene. For fisk som har stått på sjøvannstilblanding er det lavere presisjon. Det må jobbes videre med å øke presisjonen for disse gruppene.

Scenario 2

Spring av laks fra flere rømmingsepisoder

Bakgrunn

Fisk som ikke er en del av den ny-rømte fisken kan identifiseres og skilles ut under utfiskingen. Dette kan være villfisk, grupper av fisk fra en tidligere rømming eller enkeltfisk fra tidligere rømminger. Villfisk skilles gjerne ut ved skjellesing samt analyser av andre morfologiske trekk. Noen av den tidligere rømte fisken vil kunne identifiseres på grunn av ulik størrelse i forhold til majoriteten av den utfiskede gruppen. Resterende «falsk fisk» må identifiseres og fjernes fra gruppen ut fra kjemisk profil i skjellet. I dette scenariet er det simulert en rømming gjennom en blindtest. Det er gjort gjentatt prøvetak av en gruppe (ukjentgruppa), som er representert i referansematerialet I tillegg er det inkludert enkeltfisk fra tidligere rømminger i ukjentgruppa, dette er gjort for å undersøke om sporingsmetoden kan benyttes for å identifisere fisk som ikke hører til den store rømmingen, samt å undersøke om metoden kan identifisere lokaliteten den rømte fisken stammer fra.

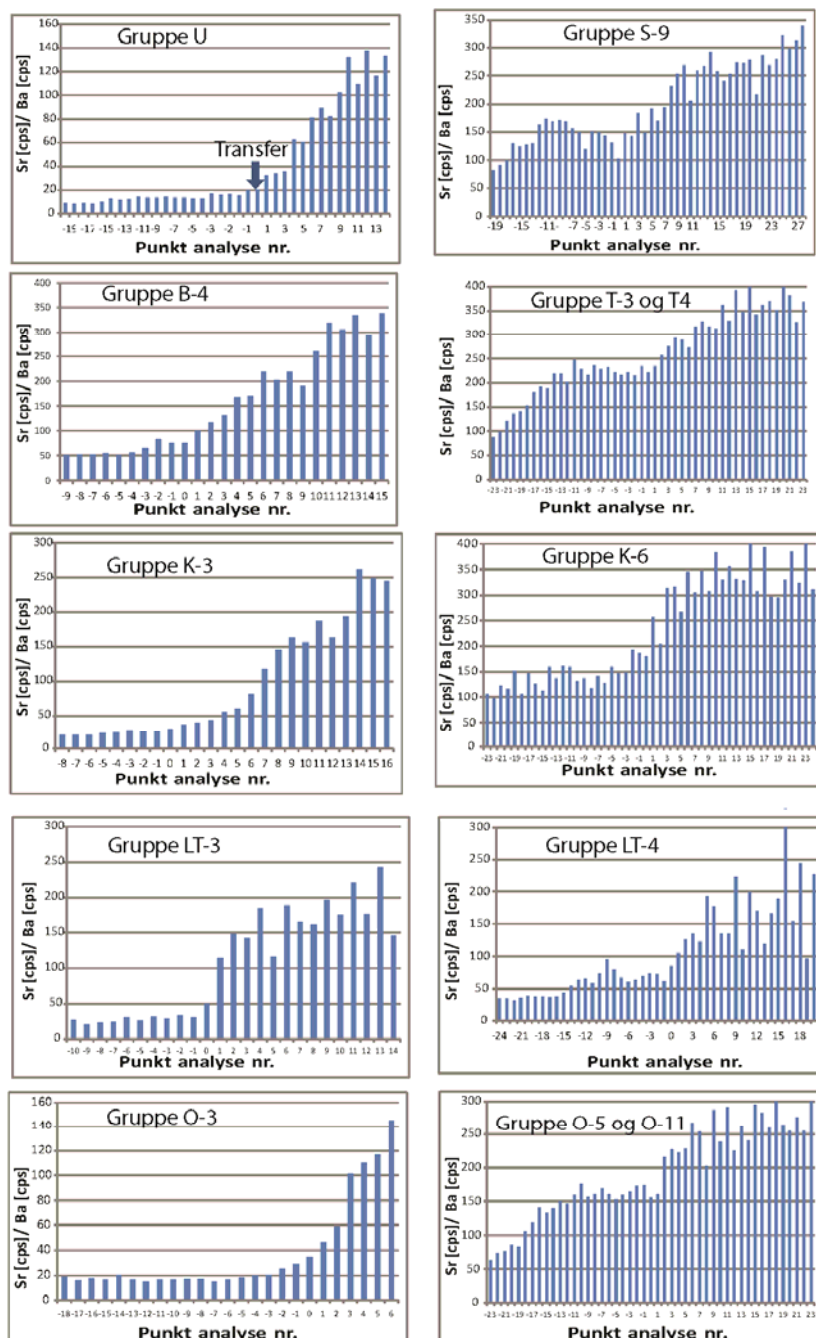
I det påfølgende kapitlet ønsker vi å vise hvordan man ved bruk av statistiske tester kan identifisere en sub-gruppe (flere fisk fra tidligere rømming) og enkeltfisk fra tidligere rømminger. Enkeltfisk fra tidligere rømminger/villfisk vil heretter bli kalt «uteliggere». Tabell 4 viser en oversikt over materialet som inngår i denne delen av undersøkelsen. Gruppen merket U representerer den ukjente gruppa. Den besto av fisk hentet fra en av gruppene i referansematerialet, samt noen «uteliggere» fra grupper som ikke var representert i referansematerialet. Opplysninger om dens sammensetning ble anonymisert før opparbeiding, prøvetak og analyser.

Tabell 4. Oversikt over materialet som inngår i scenario 2. Gruppen merket U representerer den ukjente gruppa.

Anlegg	Merdnr	Betegnelse	#skjellprøver
B	4	B-4	57
K	3	K-3	53
K	6	K-6	55
LT	3	LT-3	45
LT	4	LT-4	46
O	3	O-3	49
O	5	O-5	60
O	11	O-11	64
S	9	S-9	57
T	3	T-3	47
T	4	T-4	60
U	u	U	83

Metode og Resultater

Først ble det vurdert om gruppene hadde fått tilsatt sjøvann mens de sto i settefiskanlegget. Dette er opplysninger som også er gitt fra anleggene. Ved å lage et tidsplot av forholdet mellom Sr og Ba fra settefiskfasen og ut i sjøvannsfasen på skjellet, tilsvarende som man gjør ved å finne overgangen fra ferskvann til sjøvann (figur 1 og 6, delrapport B), kan man se om gruppen fått sjøvannstilsetning. Figur 7 er eksempel på Sr/Ba profil for referansematerialet. Figuren viser profilene uten sjøvannstilsetning i den venstre kolonnen, mens profilene med sjøvannstilsetning/tørssalt er i den høyre.



Figur 7. Punktanalyser av Sr/Ba-ratio for å bestemme posisjonen for utsett til sjø. Den siste skleritten som ble dannet i ferskvann er indikert med "0" på x-aksen, økende positive tall viser sjøfase, mens økende negative tall går tilbake i settefisk/ferskvannsfasen. I og med at vannbehandlingen for disse gruppene er kjent har en valgt å redusere antall punkter for gruppene uten sjøvannstilblending. Skjellene fra gruppe U ble analysert med 50 punkter, bare 30 er vist her.

Grupper som ikke har hatt sjøvannstilsetning har et tilnærmet konstant forhold mellom Sr og Ba i settefiskfasen. Grupper som har hatt en betydelig mengde sjøvannstilsetning i perioden før utsett i sjø viser et mindre jevnt forhold (Figur 7). Den rømte gruppen har tilsvarende Sr/Ba profil som merdene som er

oppgitt ikke å ha sjøvannstilsetning. Dette betyr at merdene som har hatt sjøvannstilsetning, S-9, T-3 og 4, K-6, LT-4 og O-5 og O-11 kan utelukkes som opphav til den rømte gruppen i fjorden.

Uteliggere

Mange metoder for å finne sub-grupper (clustere) er sensitive for uteliggere, som betyr at uteliggere som ikke tilhører noen sub-gruppe (enkeltfisk) kan «maskere» andre reelle grupper. Dette gjør det hensiktsmessig å identifisere og fjerne uteliggere fra datasettet først, og deretter gjøre en clusteranalyse for å finne eventuelle sub-grupper.

På grunn av datasettets natur (compositional data med støy), ble det valgt å bruke flere ulike statistiske metoder for å identifisere uteliggere. Konsensus mellom metodene ble vektlagt i høyere grad enn resultatene fra hver enkelt metode. Metodene har ulike styrker og svakheter slik at et konsensus-svar antakelig vil være mer robust enn en individuell metode. Det ble valgt fire ulike metoder for uteligger-identifikasjon: Nr. 1: mvoutlier.CoDa; Nr. 2: pcout; Nr. 3: NbClust med centroid-metoden og Nr. 4: outCoDa. Nr. 1 er spesialisert på å finne uteliggere i compositional data, og baserer seg på forskjeller mellom kvadrert Mahalanobis-avstand (som er en generalisering av euklidisk avstand der vektorer kan være korrelerte) og 1-alpha kvantiler i chi-kvadratfordelingen (Filzmoser et al., 2012). Metoden er robust for clr og ilr-transformasjonen, men suboptimal hvis normalitetsantakelsen blir brutt. Nr. 2 er en identifikasjonsmetode for uteliggere som ikke baserer seg på normalitetsantakelsen, og som har vist seg å fungere bra for høydimensjonal data (Filzmoser et al., 2015). Ulempen med metoden er at den kan gi høyere antall falske positive enn andre metoder. Nr. 3 er en clustermetode spesialisert på isolerte punkter. Clustere blir her identifisert ved en Majority Vote av 30 ulike beregninger (Charrad et al., (2014): package 'Nbclust'). Metoden trenger ingen normalitetsantakelse, men er lite sensitiv for multidimensjonale uteliggere. Nr. 4 er basert på en liknende metode som Nr. 2, men beregner Mahalanobis-avstand på en annen måte (Filzmoser et al., 2008). I uteligger-testen ble det for metode Nr. 1 og Nr. 4 benyttet alpha-verdi = 0.025 mens for metode Nr. 2 ble verdien satt til 0.05. Uteliggerkandidatene som viste høyest konsensus mellom metodene er vist i Tabell 5.

Tabell 5. Oversikt over fisk som ble foreslått som uteliggere av de fire metodene. Fisk nr. 29 hadde høyest konsensus (4 av 4), fisk nr. 3 nest høyest konsensus (3 av 4) og de øvrige fem fiskene hadde konsensus fra 2 av 4 metoder. Det er verdt å merke seg at metode nr. 1 og nr. 4 begge identifiserte alle individene som uteliggere. x markerer at en metode har foreslått at en fisk representerer en uteligger.

Fisk ID	#skjell ansett som uteliggere	Nr.1 (Mvout.CoDa)	Nr.2 (PcOut)	Nr.3 (NbClust)	Nr.4 (OutCoDa)
1	1/1	x			x
3	1/1	x	x		x
16	2/2	x			x
21	2/3	x			x
29	1/1	x	x	x	x
30	1/4	x			x
33	1/4	x			x

Individ 16 hadde to skjell som begge ble klassifisert som uteliggere hos metode 1 og 4. Individ 30 og 33 hadde begge fire skjell hvorav ett av skjellene ble ansett som uteligger. Individ 21 hadde tre skjell, der to av tre ble klassifisert som uteligger hos metode 1, mens ett ble klassifisert som uteligger av metode 4. Ved en Majority Vote ble individ 3 og 29 ansett som «reelle» uteliggere og fjernet fra datasettet.

Siden flere individer ble klassifisert som uteliggere med moderat konsensus, ble det foretatt en ny uteligger-test etter fjerning av individ 29 og 3. Dette for å se om flere av modellene fant «maskerte» uteliggere etter at de mest ekstreme datapunktene var tatt vekk.

Tabell 6 viser kandidater med høy konsensus på tvers av modellene etter at individ 29 og 3 var tatt ut.

Tabell 6. Oversikt etter andre runde med testing hvor individ 3 og 29 er tatt ut. Individ 16 hadde bred konsensus mellom modellene på begge skjell og ble derfor vurdert som en uteligger.

Fisk ID	#skjell ansett som uteliggere	Nr. 1 (Mvout.CoDa)	Nr. 2 (PcOut)	Nr. 3 (NbCluster)	Nr. 4 (OutCoDa)
1	1/1	x			x
2	1/1		x		x
16	2/2	x	x	x	x
17	1/3	x			x
21	2/3	x			x
25	1/1		x		x

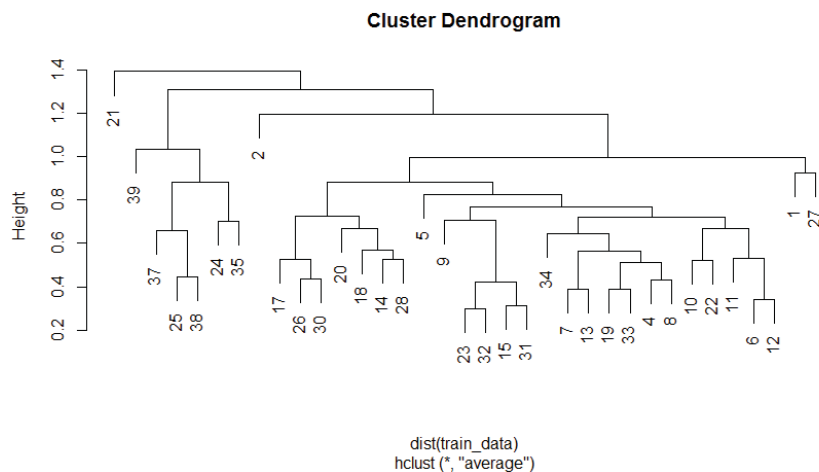
Statistisk testing for identifikasjon av sub-grupper

Subgrupper representerte her tidligere rømt fiskog utgjør et lavt antall. Disse kan identifiseres ved clusteranalyser, og ble analysert blant annet ved bruk av Aitchison distance (Boogaart & Tolosana-Delgado, 2011). Cluster-analyser har mange mulige tilnærminger avhengig av hvilke antakelser man gjør om datasettet. I tråd med metodikken i uteligger-analysen ble det derfor bestemt at ulike tilnærminger måtte brukes med vekt på konsensus mellom metoder.

Det finnes tre overordnede metoder å anvende på cluster-problemet i den simulerte rømmingen:

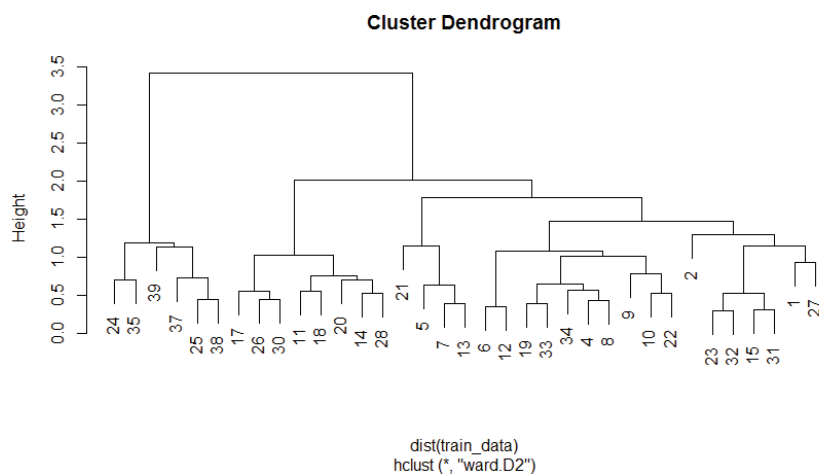
Hierarkisk clustering, senterbasert clustering og modellbasert clustering. Den hierarkiske clustermetoden ble beskrevet i scenario 1. En sentroidebasert clustermetode baserer seg på å definere et sentrumspunkt for alle clustere, og deretter allokere individer til dette sentrumspunktet basert på avstand. Det finnes ingen generell metode for å løse dette problemet, men det finnes ulike tilnærmingsmetoder. Den mest brukte i litteraturen heter Lloyd's algoritme, eller k-means, en sentroidebasert metode. En ulempe med sentroidebaserte metoder er at antall clustere ofte må spesifiseres på forhånd, noe som generelt (og også i dette datasettet) ikke vites på forhånd.

En modellbasert clusteringmetode antar at clustere i datasettet er sammensatt av en parameterisert statistisk modell, gjerne normalfordelingen eller varianter av den, og allokere individer til ulike clustere basert på kvantiler i fordelingene. Resultater på liknende datasett og fra uteligger-analysen indikerte at datasettet ikke lot seg beskrive av parameteriserte modeller, og modellbasert clustering ble derfor vurdert som uaktuelt i denne sammenhengen. På bakgrunn av vurderingene ovenfor ble det bestemt å gjøre en hierarkisk clusteranalyse (Average Linkage og Ward's metode) samt en sentroidebasert clusteranalyse (k-means). Hierarkisk clustering med Average Linkage kan visualiseres i et dendrogram som vist i Figur 8.



Figur 8. Hierarkisk cluster dendrogram med Average Linkage.

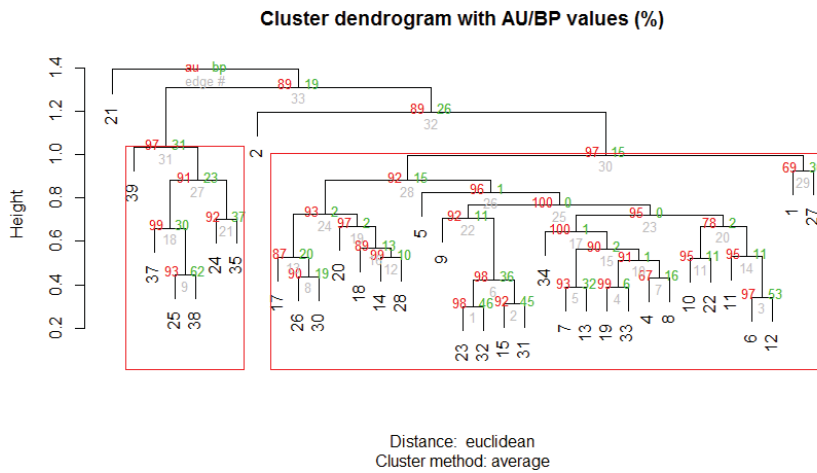
De ulike grenene til dendrogrammet viser potensielle cluster. Individ 21 og 2 er definert som egne cluster, som betyr at de til en viss grad er ulike resten av datasettet, og kan derfor sies å være potensielle uteliggere. Clusteren (39,37,24,25,35,38) forgrenes høyt oppe i dendrogrammet, og er derfor mer ulikt det resterende datasettet enn for eksempel (1,27), som forgrenes lenger ned. Dendrogrammet til hierarkisk clustering med Ward's metode er vist i Figur 9.



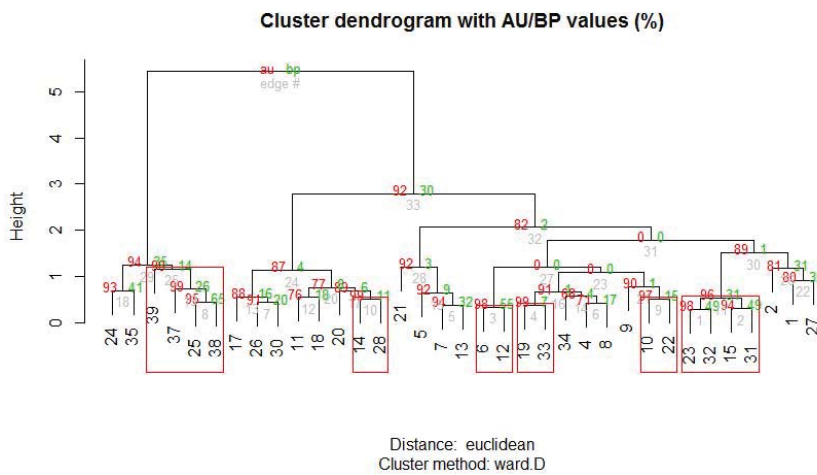
Figur 9. Hierarkisk cluster dendrogram med Ward's metode.

Ward's metode peker ut gruppen helt til venstre i dendrogrammet i Figur 9 som en mulig cluster-kandidat (individ 24,25,35,37,38,39). Individ nummer 2 og 21 er fortsatt isolerte, men mindre signifikante enn for Average Linkage.

Det er også mulig å estimere signifikansen til clusterne ved å simulere en tilfeldig trekning av en andel datapunkter fra datasettet og observere hvor ofte en cluster forekommer. Dendrogrammer med p-verdi for henholdsvis Average Linkage og Ward's metode kan sees i figurene 10 og 11 nedenfor.



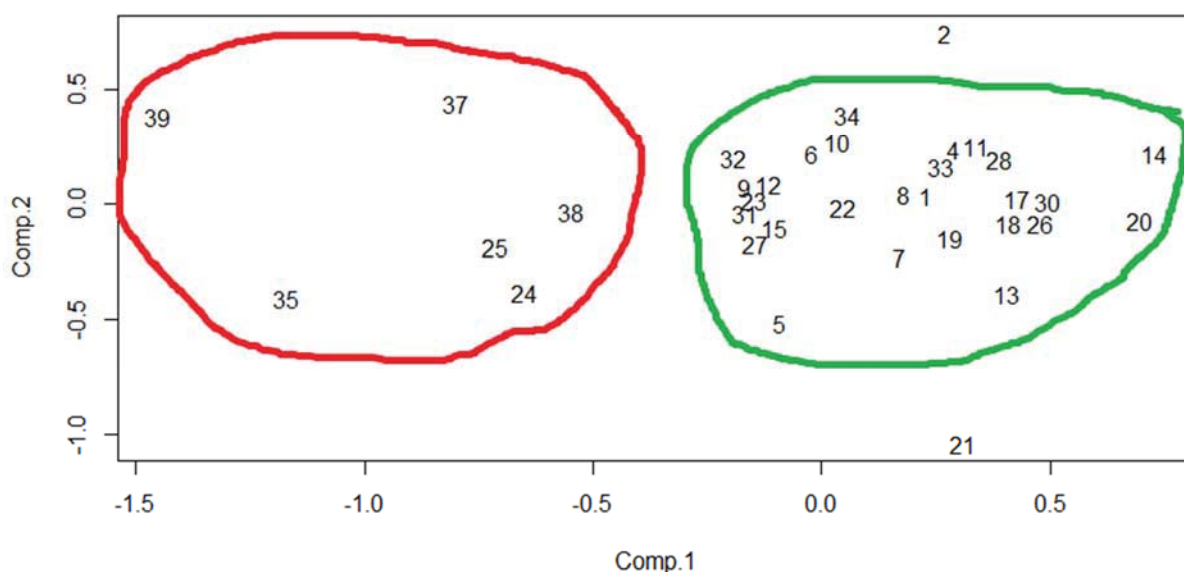
Figur 10. Cluster dendrogram med euklidisk distanse og bruk av Average Linkage metoden.



Figur 11. Cluster dendrogram med euklidisk distanse og bruk av Ward's metode.

Clustere med p-verdier høyere enn 95 er markert med røde rektangler. P-verdien for clusterkandidaten (24,25,39,37,38,35) med Ward's metode er 94 og faller derfor akkurat utenfor. Det finnes en god del andre clusterer som er signifikante, men siden de er langt nede i dendrogrammet gjenspeiler dette mest sannsynlig kun en signifikant innbyrdes likhet mellom et fåtall av individer som er ubetydelig i den store helheten (to amerikanske tvillinger vil demografisk sett være mer like enn den øvrige amerikanske befolkningen, men den totale amerikanske befolkningen vil demografisk sett være mye mer ulik den kinesiske befolkningen).

Det er også mulig å visualisere datasettet i et PCA-plot for å se om resultatene fra dendrogrammene gjenspeiles i en projeksjon av datasettet (Figur 12).



Figur 12. De to første aksene i PCA-analysen. Datapunktene innenfor den røde ringen er clusteren i den røde firkanten til venstre i figur 10. Den grønne ringen omfatter resten av datasettet men uten fisk 2 og 21 som faller utenfor den grønne sirkelen. Disse vil være mulige uteliggerne.

For å undersøke antall clusterer videre ble NbClust-metoden benyttet. Den består av flere metoder for å bestemme antall clusterer basert på en majority vote av 30 ulike beregninger. NbClust åpner også for bruk av ulike metoder (der k-means, Average Linkage og Ward's metode er inkludert). Det ble kjørt et NbClust-script med de tre ulike metodene for å identifisere antall clusterer og cluster-kandidater. Tabell 7 viser clusterkandidater med høy konsensus på tvers av modellene.

Tabell 7. Individuer med høy konsensus i clusteranalyse ved hjelp av de tre ulike metodene k-means, Ward's og Average Linkage.

Fisk ID	k-means	Ward	Average	Tot
24		x	x	2
25	x	x	x	3
35		x	x	2
37	x	x	x	3
38	x	x	x	3
39	x	x	x	3

Det var uenighet mellom metodene når det gjaldt antall clusterer: k-means fant 15 clusterer, som er et tegn på at metoden overspesialiserte og detekterte mønstre der de ikke fantes. Flere av clusterne var isolerte punkter, deriblant 21, 2 og 1. Metoden satte 25, 37, 38 og 39 under samme cluster. Average Linkage fant to clusterer, men et cluster var et isolert punkt med individ 21, og det andre clusteret var (24, 25, 35, 37, 38, 39). Ward-metoden fant ett cluster (24, 25, 35, 37, 38, 39). På basis av disse vurderingene ble dette clusteret vurdert som en uønsket subgruppe. Etter vurderinger av clusteranalysen og uteligger-analysen ble individ 1, 2 og 21 fjernet fra datasettet. Tabell 8 viser de endelige resultatene og tabell 9 viser fasit.

Tabell 8. Oppsummering av fisk identifisert som uteliggere i den oppfiskede gruppen. En «falsk positiv» betegner i denne sammenhengen et individ som ble klassifisert som uteligger men som faktisk hørte til hovedgruppa. En falsk negativ betyr et individ som ikke ble klassifisert som uteligger, men som faktisk tilhørte en annen gruppe.

Fisk ID/Type	Faktiskcluster	Faktisk uteligger	Falsk positiv	Falsk negativ
(25,35,37,38,39)	x			
1			x	
2			x	
3		x		
16		x		
21		x		
24			x	
29			x	

Tabell 9. Fasit. Ukjentgruppen består av de øvrige individene nummerert fra 1-39.

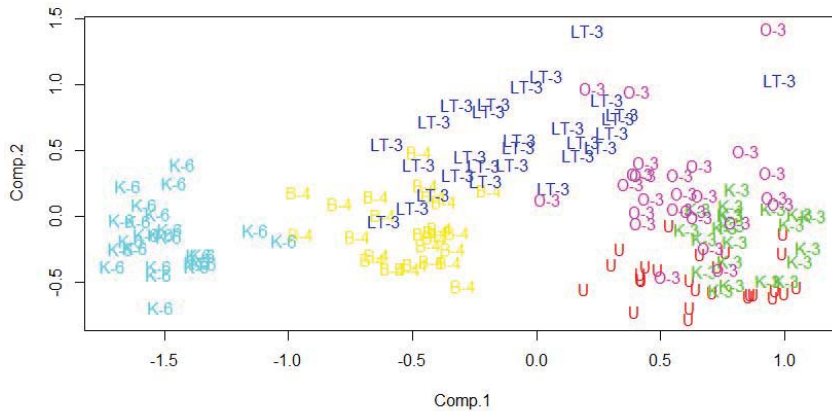
Fisk ID	Gruppe	Antall fisk
	Ukjentgruppe (rømt fisk)	30
25, 35, 37, 38, 39	Gruppe fra Stavanger (sub-gruppe)	5
16	Fisk fra Tromsø	1
3	Fisk fra Volda	1
21	Fisk fra Hitra satt ut i sjø i 2014	1
36	Fisk fra Sør-Trøndelag (Forkastet)	1

Sammenligning av resultatene i tabell 8 med fasit i tabell 9 viser at subgruppen ble riktig identifisert. Alle enkeltfisk som ikke hører til gruppen ble også identifisert. Det er en viss andel falske positive uteliggere, men dette blir vurdert som uproblematisk med tanke på at det ikke er noen falske negative. Et høyt antall falske negative hadde vært problematisk i en reell rømmingssituasjon da det kunne ført til at skylden ble lagt på feil anlegg. Det at det er en viss andel falske positive kan tyde på at det trengs mer data fra hvert individ: individ nummer 1, 2 og 29 hadde alle bare ett skjell til statistisk analyse.

Identifisering av ukjent-gruppa

Etter fjerning av uteliggere og uønskede clusterer fra den ukjente gruppa var det igjen 30 individer (75 skjell). Ved inspeksjon av Sr/Ba-grafer var det mulig å etablere at den ukjente gruppa hadde stått på et settefiskanlegg uten sjøvannstilblending. Gruppene uten sjøvannstilblending i denne problemstillingen er LT-3, O-3, K-3 og 6 og B-4.

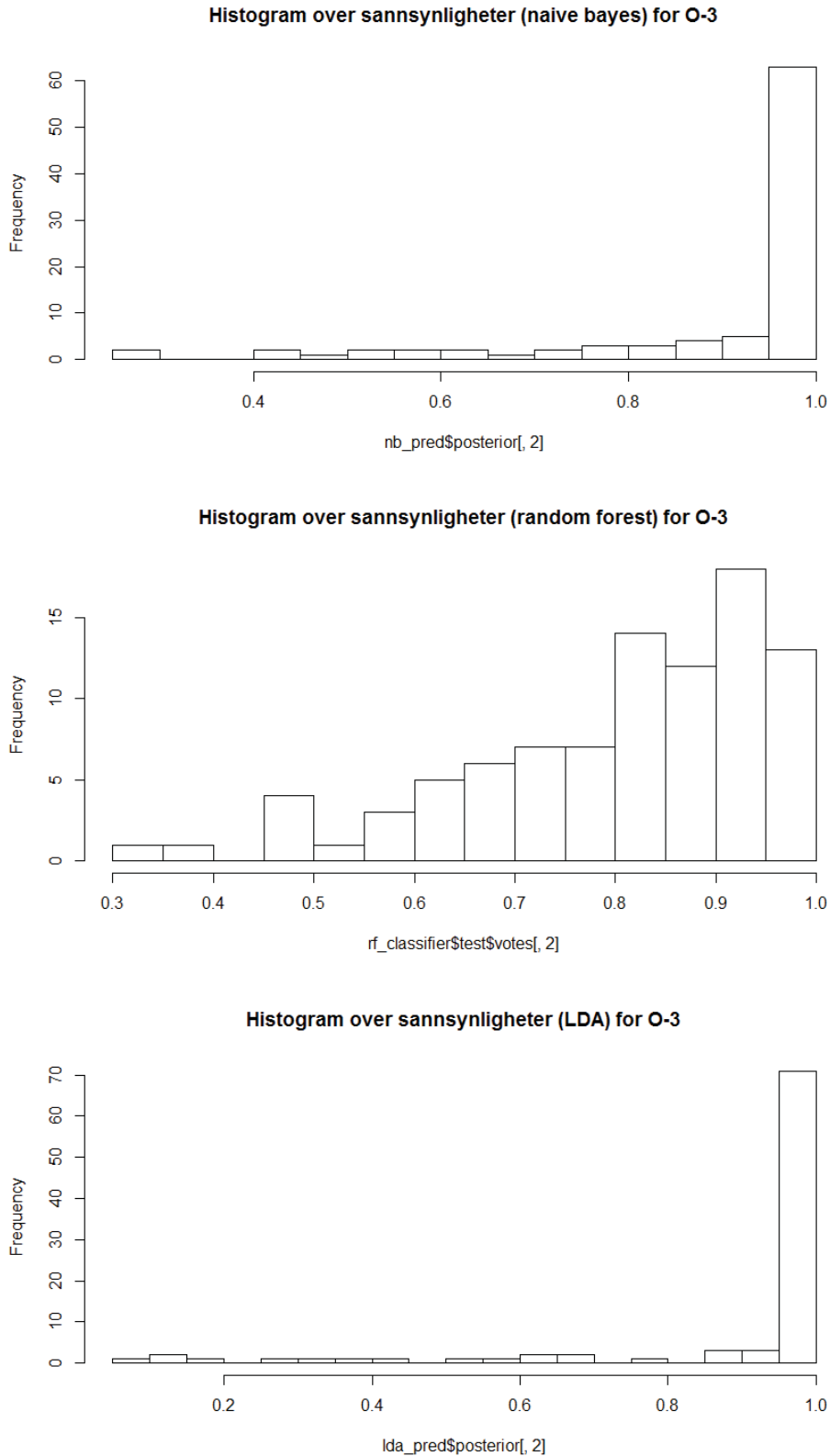
Et PCA-plot viser gruppeinndelingen for den ukjente gruppa og de aktuelle kandidatgruppene (figur 13).



Figur 13. PCA-plot av ukjent-gruppa og kandidatgruppene. Ukjent-gruppa er markert med «U». Ukjent-gruppa ligger nærmest O-3 og K-3.

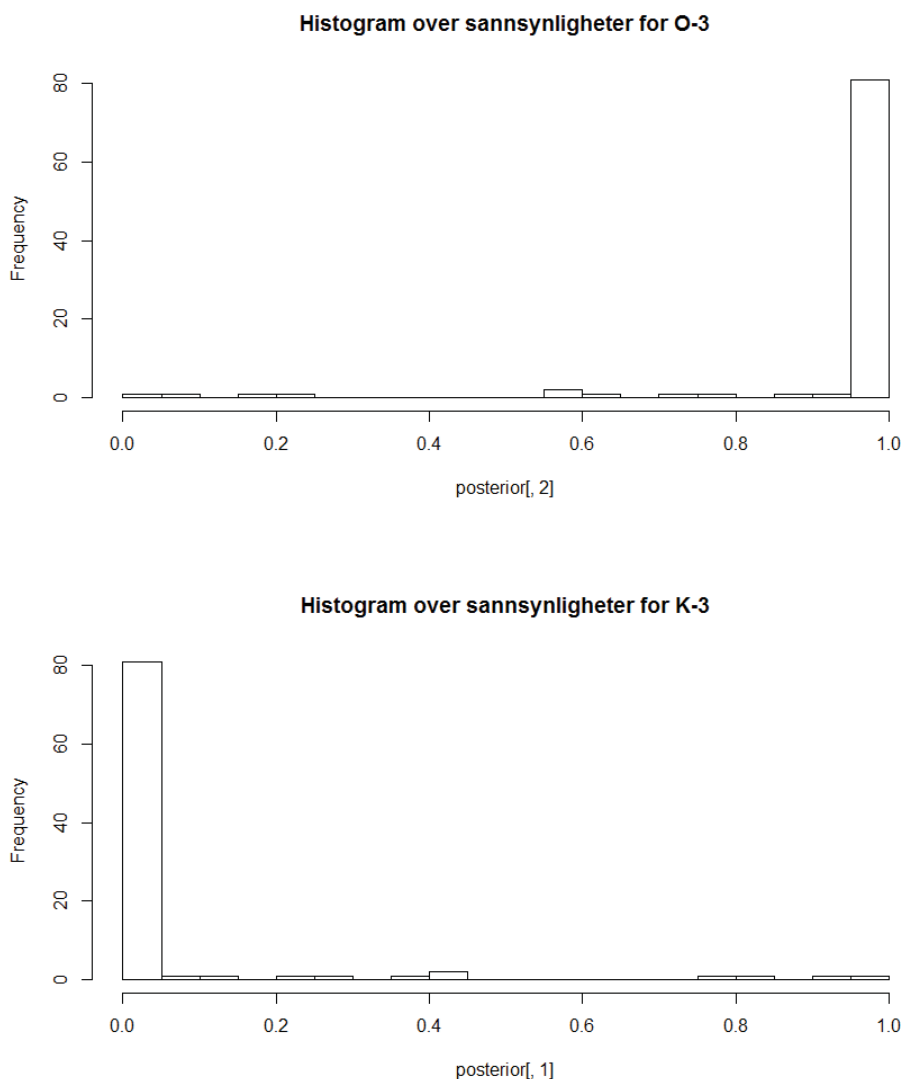
Det ble forsøkt å bestemme gruppetilhørigheten til ukjent-gruppa ved klassifisering av ferskvannsfasen på skjellet. En gruppe av klassifiseringsmodeller (Naive Bayes, k-nn, Random Forest, SVM og LDA) klassifiserte 50 av 75 skjell til O-3, og 25 av skjellene til K-3. Basert på denne klassifiseringen, en clusteranalyse og PCA-plottene, ble det bestemt at ukjent-gruppa tilhørte en av disse to grupper. Fisken fra disse to gruppene kom fra samme settefiskanlegg og analyse av ferskvannsfasen var derfor ikke tilstrekkelig for å bestemme lokalitet for gruppen med rømt fisk. Det ble analysert i ytterkant av skjellene, for å skille mellom de to lokalitetene basert på sjøvannprofilen.

Sjøvannprofilen ble ved at 92 skjell ble analysert 4 skleritter inn fra ytterkanten. Modellutvalget klassifiserte nå 86 av de 92 skjellene til O-3 og 6 av skjellene til K-3. 3 av modellene (Naive Bayes, LDA og Random Forest) har mulighet for å vise sannsynlighet for gruppetilhørighet på skjellnivå. Det vil si at de estimerer sannsynligheten for at et gitt skjell tilhører en gruppe. Histogrammene nedenfor viser fordelingen av sannsynlighetene for at hvert enkelt skjell tilhører O-3 (figur 14).



Figur 14. Histogrammer som viser sannsynlighet for gruppetilhørighet for skjell fra ukjentgruppa til gruppen O-3. På x-aksen vises sannsynligheten mellom 0 og 1 (hvor 1 = 100% sannsynlighet for riktig tilhørighet).

Merk at Random Forest har høyere variasjon i sannsynlighetene enn de andre modellene. Dette er en konsekvens av hvordan Random Forest er designet. En Random Forest er en kolleksjon av beslutningstrær, der hvert tre kun ser på en undermengde av alle grunnstoff. På grunn av dette vil hvert tre bare se en del av "bildet". Trær samles til en "skog" ved at hvert tre avgir sin stemme på hvilken gruppe de tror datapunktet tilhører. På grunn av dette vil en Random Forest være mer "demokratisk" i form av at man tar høyde for et større spekter av "meninger". Dette fører til høyere variasjon i sannsynlighetene. LDA og Naive Bayes er mer sikre, men er mer følsomme for systematiske feil i datasettet. Man kan kombinere disse tre fordelingene til en "simultanfordeling" for alle tre modellene. Histogrammene nedenfor viser sannsynlighet for gruppetilhørighet i en simultanfordeling (figur 15).



Figur 15. Histogram over sannsynlighet for gruppetilhørighet til henholdsvis O-3 og K-3.

81 av 92 skjell har mer enn 95% sannsynlighet for å stamme fra O-3. Nesten ingen skjell har høyere sannsynlighet enn 80% for å tilhøre K-3. Totalt 6 skjell har lavere enn 50% sannsynlighet for å tilhøre O-3. Tabell 10 oppsummerer resultatene.

Tabell 10. Sannsynlighetsfordeling (%) for at de 92 skjellprøvene fra ukjentgruppen tilhører gruppen O-3.

Sannsynlighetsfordeling	> 98%	98% > p > 95%	95% > p > 90%	P < 90%	tot
Antall skjell	79	2	1	10	92

79 av skjellene fra ukjentgruppa ble bestemt til gruppe O-3 med mer enn 98% sikkerhet, dette er riktig lokalitet og merd for den simulerte rømmingen og viser derfor at metoden kan brukes for oppklaring av en rømmingssituasjon.

11 skjell hadde sikkerhet på under 95% (95% > p > 90% og p < 90% i tabell 10) for å komme fra gruppen O-3. For disse skjellene kan man enten konkludere med at metoden ikke gir et svar med tilstrekkelig sikkerhet, eller vurdere å gjøre en ny analyse for å se om sikkerheten øker. Ett av skjellene ble klassifisert til feil anlegg (K-3) med høy sikkerhet (mer enn 90%). Dette skjellet var fra individ nr 29 som tidligere var mistenkt å være en uteligger. På gruppenivå kan det likevel konkluderes med at rømmingen med stor sannsynlighet har skjedd fra gruppe O-3, da hoveddelen av skjellene stammer derfra med høy sannsynlighet.

Bemerk at det at 6 av 92 skjell (6.5%) klassifiseres feil ikke betyr det samme som at en vil konkludere med feil anlegg i 6.5% av alle rømmingssituasjoner. For å illustrere dette går det an å gjøre et estimat over hvor ofte man i realiteten vil konkludere med feil anlegg, gitt at man har bestemt noen cutoff-verdier for å kunne gi en konklusjon. Cutoff-verdiene representerer prosentandel skjell som må havne i samme gruppe med en bestemt sannsynlighet for å kunne konkludere.

Som et eksempel, la cutoff-verdien være slik at 80% av skjellene må klassifiseres med minst 90% sannsynlighet eller høyere til en lokalitet for å kunne si at rømmingen skjedde derfra. I tilfellet over hadde ett av 92 skjell sannsynlighet på over 90% på feil anlegg. Hvis ukjentgruppa er representativ, betyr det at man kan forvente én slik feiltakelse per 92 skjell. Sagt på en annen måte, sannsynligheten for å trekke ett slikt skjell er $1/92 = 1\%$. For at modellene skulle konkludert med feil anlegg (K-3 i dette tilfellet), måtte man ha trukket minst 83 av 92 slike feilaktige skjell, der hvert skjell hadde 1% sannsynlighet for å bli trukket. Sannsynligheten for dette er tilnærmet lik 0, det vil si man vil aldri konkludere med feil anlegg i praksis, gitt disse cutoff-verdiene. Samtidig hadde 85% av skjellene en sannsynlighet over 90% for å høre til O-3, så man ville kunne konkludert med riktig rømming i denne situasjonen, selv med en streng cut-off. Tabell 11 viser ulike simulerte sannsynligheter for at modellutvalget vil konkludere med rett svar, gitt forskjellige cut-offs på andel av skjell som må klassifiseres med over 90% sannsynlighet. Basert på disse resultatene vil modellen nesten aldri konkludere med feil svar, men vil i ulik grad ikke kunne konkludere. Hvilke cut-offs som settes bestemmes i en kost-nytte analyse.

Tabell 11. Sannsynlighet for at modellen gir riktig, gal eller ingen konklusjon på gruppetilhørighet med ulike cut-offs (prosentandel skjell som må havne i samme gruppe). Cutoff for sannsynlighet for å tilhøre en gitt gruppe er satt til 90% for hvert skjell.

Cut-off	Riktig svar	Galt svar	Ingen konklusjon
85%	52.1%	$<10^{-16}$	47.9%
80%	81.5%	$<10^{-11}$	18.5%
75%	97.6%	$<10^{-7}$	2.4%
70%	99.6%	$<10^{-4}$	0.4%

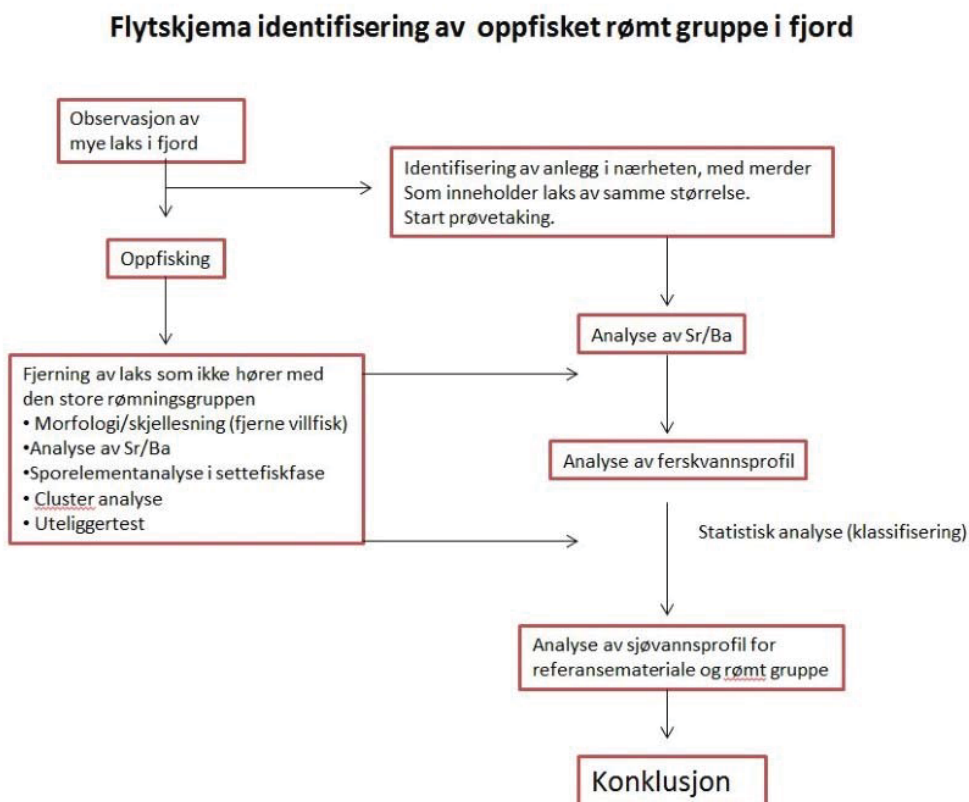
Konklusjon

Resultatene viser at sporingsmetoden er anvendbar i det simulerte rømmingsscenariet. I tillegg ble det vist at i tilfellet der flere lokaliteter hadde fisk fra samme settefiskanlegg, var det mulig å skille mellom gruppene ved å bruke sjøvannprofilen. Resultatene fra Sr/Ba-analysene viser at det er mulig å skille

mellom fisk gitt sjøvannstilsetting og fisk som ikke er gitt sjøvann i settefiskanlegg. Dette kan bidra til å redusere antall aktuelle grupper i en innledende analyse.

Et viktig funn er at selv etter å ha stått 11-13 måneder i sjøen holder gruppedefinisjonen seg, med veldefinerte grenser mellom hver gruppe. O-3 og K-3, som kom fra samme settefiskanlegg, har fortsatt lik profil etter omtrent ett år i sjø. Dette viser tegn på at endringene i profilen er i stor grad avhengig av hvordan profilen opprinnelig så ut. Uteligger- og subgruppetesten ga gode resultater, men det bør analyseres flere skjell (tre eller mer) fra hvert individ i en rømmingssituasjon for å minimere varians og antall falske positive individer.

Basert på erfaringene som ble gjort under arbeidet med denne problemstillingen er det blitt utviklet et flytskjema for en mulig arbeidsprosess i en reell rømming (Figur 16)



Figur 16. Flytskjema som illustrerer bruk av sporingsmetoden i en beredskapssituasjon.

Referanser

- Charrad, M., Ghazzali, N., Boiteau, V., Niknafs, A., Charrad, M .M. (2014). Package 'NbClust'. J. Stat. Soft, 61, pp.1-36.
- Egozcue, J. J., Pawlowsky-Glahn, V., Mateu-Figueras, G., Barcelo-Vidal, C. (2003). Isometric logratio transformations for compositional data analysis. *Mathematical Geology*, 35(3), pp.279-300.
- Filzmoser, P., Gschwandtner, M., Filzmoser, M. P., LazyData, T.R.U.E., (2015). Package 'mvoutlier'.
- Filzmoser, P., Hron, K., Reimann, C. (2012). Interpretation of multivariate outliers for compositional data. *Computers & Geosciences*, 39, pp.77-85.
- Filzmoser, P., Maronna, R., Werner, M. (2008). Outlier identification in high dimensions. *Computational Statistics & Data Analysis*, 52(3), pp.1694-1711.
- Hastie, T., Tibshirani, R., Friedman, J. (2009). 14.3.12 Hierarchical clustering. *The Elements of Statistical Learning* (2nd ed.). New York: Springer. pp. 520-528
- Lloyd, S. (1982). Least squares quantization in PCM. *IEEE transactions on information theory*, 28(2), pp.129-137.
- Ward Jr, J.H. (1963). Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American statistical association* 58.301 pp.236-244.

Delrapport J: Ferskvannsprofilens stabilitet etter tilbakeføring til ferskvann

Introduksjon

Rømt oppdrettslaks kan vandre opp i vassdrag for å gyte. I lys av at ferskvannsprofilen gjennomgår endringer fra ferskvann til sjøvann er det også nødvendig å undersøke hvordan ferskvannsprofilen oppfører seg i overgangen fra sjøvann til ferskvann. For å teste dette ble tre grupper fisk som hadde stått fire måneder i sjø flyttet til ferskvann og prøvetatt jevnlig.

Materiale og metode

Laks fra tre ulike lokaliteter i sjø ble transportert inn til VESO Vikan for eksponering for ferskvann. Fisken ble gitt fullt sjøvann under transporten. Etter overføring til kar ved Vikan ble saliniteten gradvis redusert til fullt ferskvann i løpet av tre dager. Fisken ble PIT-merket, lengdemålt og tatt skjellprøver av før transport fra sjøanlegg. Den ble videre prøvetatt ved starteksponering for fullt ferskvann (dag 0), og videre etter 18-21 dager og 31-35 dager i fullt ferskvann. Prøvetaket før flytting fra sjølokalitet ble brukt som referansemateriale og inngikk i treningsdatasettet. Treningsdatasettet besto av 29 ulike grupper som hadde vært sjøsatt fra 2 til 14 måneder. Modellutvalget som ble trent på dette datasettet var det samme som ble brukt i delrapport G og H som omhandlet stabilitet av ferskvannsprofiler, og ble valgt fordi det kan ta høyde for en viss endring i profilen. Posisjon for analyse av skjell tok utgangspunkt i ferskvannsfasen, 3-4 skleritter inn fra posisjon for utsett til sjø (ved punktscan av Sr/Ba/Ca). Prøvene ble randomisert på skjellnivå. Materiale og prøvetakingstidspunkt er oppsummert i tabell 1. To av gruppene, gruppe L3 og B var kun eksponert for ferskvann i settefiskanlegget, mens gruppe S hadde tilsatt sjøvann.

Tabell 1. Oversikt over grupper og antall skjell analysert på ulike tidspunkt etter start eksponering for fullt ferskvann.

Gruppe/Tidspunkt	Dag 0	Dag 18-21	Dag 31-35
L3	31	31	16
B	38	41	42
S	42	40	40

Resultater og diskusjon

Klassifiseringspresisjonen for de tre forsøksgruppene er gitt i Tabell 2.

Tabell 2. Gruppevis klassifiseringspresisjon (i %) på ulike tidspunkt etter start eksponering for fullt ferskvann.

Gruppe/Tidspunkt	Dag 0	Dag 18-21	Dag 31-35
L3	80.6	90.3	93.8
B	100	97.4	95.2
S	90.5	70.0	37.5

For gruppe S falt klassifiseringspresisjonen mest, antakeligvis på grunn av sjøvannsinnblandingen. For de to andre gruppene var klassifiseringspresisjonen fortsatt høy etter en måned i ferskvann selv med mange kandidatanlegg å skille mellom. Dette indikerer at det vil være mulig å oppklare rømminger i elver om fisken har vært på rømmen i en måned, selv med et stort referansemateriale. Videre prøvetak for disse gruppene etter to og tre måneder i ferskvann er planlagt og vil gi ytterligere informasjon.

For gruppe L3-3 dager ble 6 av 31 skjell klassifisert til en annen lokalitet (K-6 fra delrapport G). Nærmere undersøkelser viste at K-6 besto av fisk fra samme settefiskanlegg, dette betyr at det var en viss overlapp i ferskvannsprofilen i disse to gruppene. I et rømmingsscenario ville det her vært aktuelt å gjøre en ekstra analyse på sjøvannsprofilen. Tilsvarende var tilfelle for gruppe L3-21 dager, der 3 skjell ble klassifisert til K-6.

Konklusjon

Tre grupper ble tilbakeført til ferskvann og prøvetatt jevnlig for å se om ferskvannsprofilen kunne klassifiseres til riktig anlegg etter overgang fra sjøvann til ferskvann. For gruppene uten sjøvannstilblending i settefiskanlegget og 29 ulike grupper å skille mellom lå presisjonen på over 90 % etter en måned i ferskvann. Skjellene som her ble feilklassifisert viste seg å stamme fra lokaliteter med fisk fra samme settefiskanlegg. I oppklaring av en rømmingssituasjon vil det være aktuelt å supplere med analyser av sjøvannsprofilen, jfr. fremgangsmåte beskrevet i delrapport I. For gruppen med sjøvannsinnblanding i settefiskanlegget (gr. S) falt derimot klassifiseringspresisjonen utover i perioden. Den lavere klassifiseringspresisjonen for gr. S var forventet og viser at det er behov for å finne en løsning også i situasjoner hvor det er gitt sjøvannsinnblanding i settefiskanlegg.

Prosedyre ved uttak av skjellprøver

SETTEFISKANLEGG - gruppe-definisjonen

En gruppe er her å forstå som fisk som har delt en felles vannressurs/vannkvalitet de siste 6 ukene før flytting til sjø. , og som prøvetas til samme tid og som flyttes til samme tid (samme dato). Prøvetak skal gjennomføres 1-2 dager før flytting til sjø. Hvis det ikke lar seg gjøre tas det ut fisk for nedfrysing og seinere prøvetak. Skjellprøver fra dette materialet tas ut så raskt som mulig og sendes inn fortløpende.

Hvis en gruppe er fordelt på mange kar skal det tas prøver fra inntil 5 kar. Her tas det skjellprøver fra 15 individer fra hvert av de valgte kar.

MATFISKANLEGG - gruppe-definisjonen

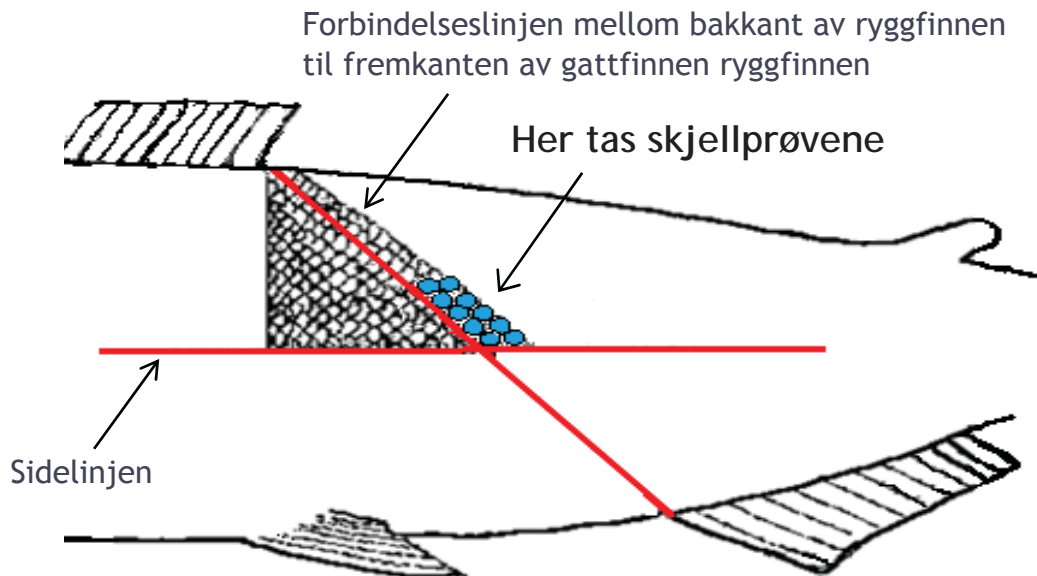
En gruppe er her å forstå som fisk som de første 8 ukene (2- måneder) i sjø har stått i samme merd.

Prøvetak gjennomføres 8 uker etter utsett til sjø. Fra hver merd tas det skjellprøver fra 15 fisk. Fisken må være frisk og rundt normal størrelse når den høves for prøvetak.

UTTAK AV SKJELLPRØVER

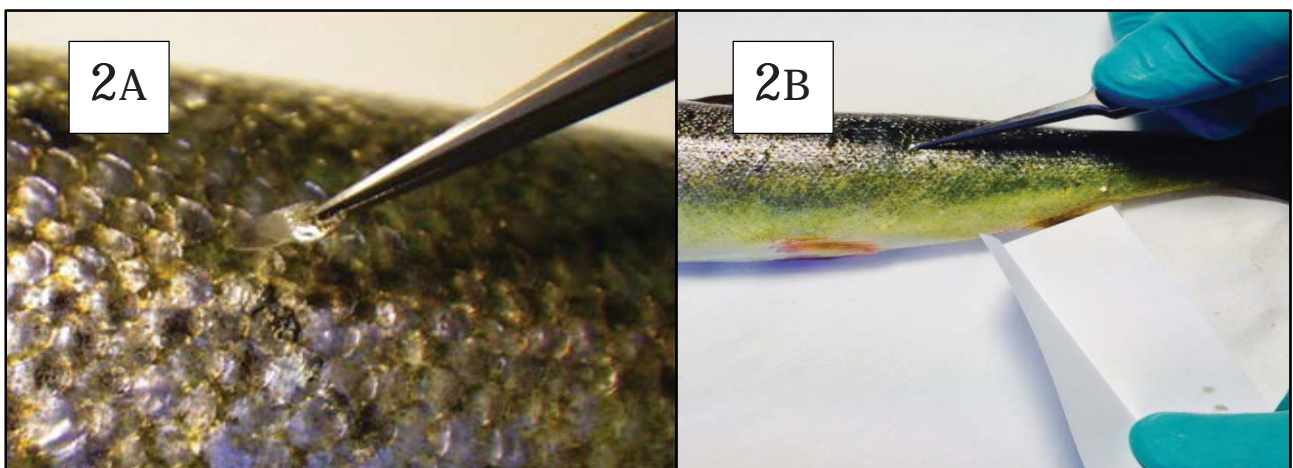
5 skjell plukkes enkeltvis fra hver fisk ved hjelp av en liten spiss pinsett. Skjellene plukkes fra ett bestemt område på fisken - se figur 1.

- Skjellene plasseres enkeltvis i rekke på et hvitt papir som brettes før det legges i skjellkonvolutten.
- Fyll inn opplysningene på skjellkonvolutten. Bruk gjerne blyant. Fiskens lengde angis i mm - (lengde fra snute og til kløften mellom halespissene).



Figur 1. Sted på kroppen hvor skjellprøver tas er markert med blå skjell.

- Skjellene plukkes enkeltvis med en spiss og tynn pinsett
- Pinsetten føres bakfra og fremover inn under skjellet som gripes forsiktig med pinsetten og lirkes ut av skjell-lommen - se figur 2 A
- 5 skjell plasseres enkeltvis etter hverandre på et lite ark som deretter brettes før det puttes i skjellkonvolutten - se figur 2 B



Figur 2 A og B. Prøvetak av enkeltskjell med bruk av pinsett

NB! Skjellkonvoluttene oppbevares tørt og sendes i papirkonvolutter. Plastbelagte poser kan gi fukt- og soppskader på skjellene.



SETTEFISKANLEGG

Skjema for innsendelse av skjellprøver fra EN GRUPPE fisk

- En **GRUPPE** er her å forstå som – fisk som deler en felles vannressurs og som har stått i ro i karene de siste 6 ukene før flytting til sjøanlegg
- **15 fisk fra hvert av inntil 5 tilfeldig valgte kar fra en gruppe prøvetas**
- **Prøvetak skal gjennomføres 1-2 dager før flytting til sjø.** Hvis dette ikke lar seg gjøre tas fisken ut 1-2 dager før flytting for nedfrysing og seinere prøvetak
- **Hvis flytting av en gruppe strekker seg over mer enn 7 dager,** må den splittes og prøvetas som adskilte grupper.
- **I skjemaet nedenfor angis også karnummeret på de øvrige karene i gruppen**
- **SKRIV TYDELIG**

Dato innsendt:	
Navn på lokalitet:	Lokalitetsnummer:
Navn på driftsleder:	Tlf:
Navn på prøvetaker:	Tlf:

DATA FRA SETTEFISKANLEGG				Til matfiskanlegg		
Prøvetak	Kar-nummer	Dato prøvetak	Dato flyttet	Navn sjølokalitet	Lokalitetsnummer	Merdnummer
Kar hvor det tas skjellprøver	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
Andre kar som huser gruppen men som ikke prøvetas						

- Skjemaet returneres sammen med skjellkonvoluttene.
- Skjellene må ikke oppbevares i plast eller lufttette beholdere. Bruk kun papirkonvolutt ved forsendelse.

Returadresse:

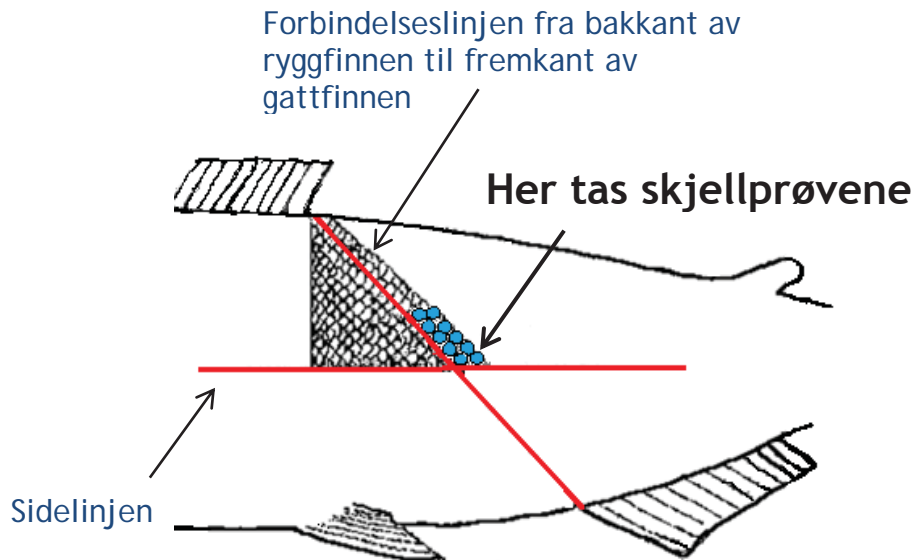
Veterinærinstituttet, Postboks 5695, 7485 Trondheim

Merk konvolutt «Spring»

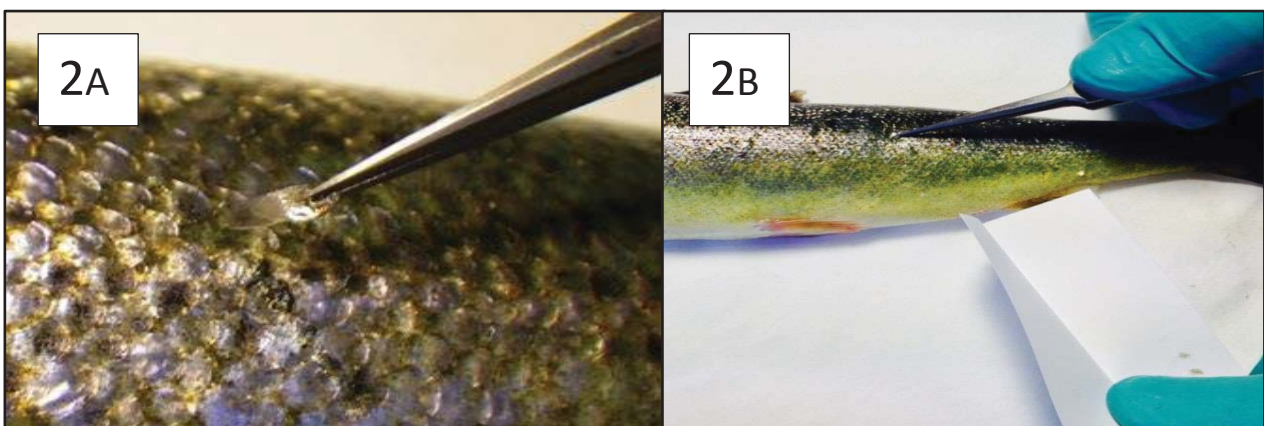
E-post: farmsalmtrack@vetinst.no

Hvis noe er uklart ring tlf. 920 23 691 (Rune Pedersen)

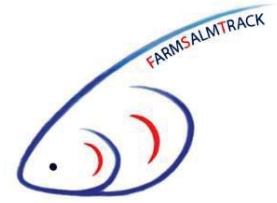
Uttak av skjellprøver



- Skjellprøver tas med en spiss og tynn pinsett
- Pinsetten føres bakfra og fremover inn under skjellet som gripes forsiktig med pinsetten og lirkes ut av skjell-lommen –**2A**
- 5 skjell plasseres enkeltvis etter hverandre på et lite ark som deretter brettes før det puttes i skjellkonvolutten –**2B**



Figur 2 A og B. Prøvetak av enkeltskjell med bruk av pinsett



MATFISKANLEGG

Skjema for innsendelse av skjellprøver

- En **GRUPPE** er her å forstå som fisk som deler samme merd/not de første 8 ukene etter utsett til sjø
- **Viktig** at prøvetaket skjer 8 uker etter utsett og ikke utsettes unødige
- **SKRIV TYDELIG!**

Dato innsendt:	
Navn på lokalitet:	Lokalitetsnummer:
Navn på driftsleder:	Tlf:
Navn på prøvetaker:	Tlf:

DATA FRA MATFISKANLEGG				Fra settefiskanlegg		
Prøvetak	Merd nummer	Dato Utsatt i sjø	Dato prøvetatt	Navn på settefiskanlegg	Lokalitetsnummer	Karnummer
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						

- Skjemaet returneres sammen med skjellkonvoluttene.
- Skjellene må ikke oppbevares i plast eller lufttette beholdere. Bruk kun papirkonvolutt ved forsendelse.

Returadresse:

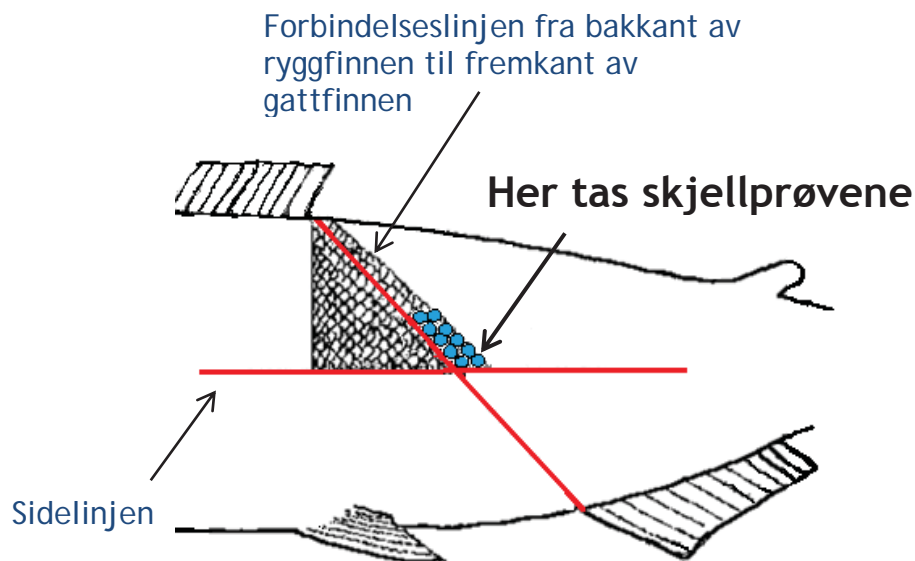
Veterinærinstituttet, Postboks 5695, 7485 Trondheim

Merk konvolutten «Spring»

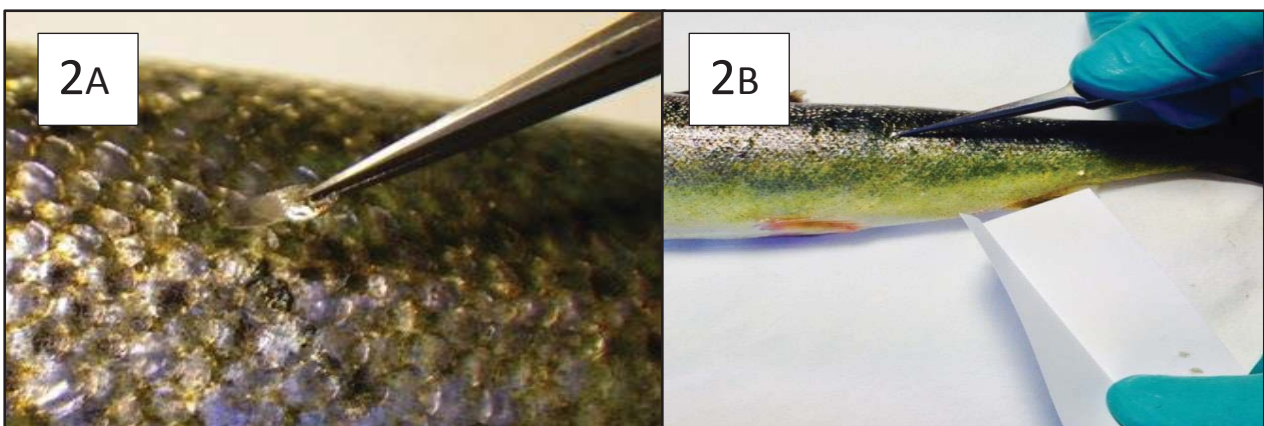
E-post: farmsalmtrack@vetinst.no,

Hvis noe er uklart ring tlf. 920 23 691 (Rune Pedersen)

Uttak av skjellprøver



- Skjellprøver tas med en spiss og tynn pinsett
- Pinsetten føres bakfra og fremover inn under skjellet som gripes forsiktig med pinsetten og lirkes ut av skjell-lommen –**2A**
- 5 skjell plasseres enkeltvis etter hverandre på et lite ark som deretter brettes før det puttes i skjellkonvolutten –**2B**



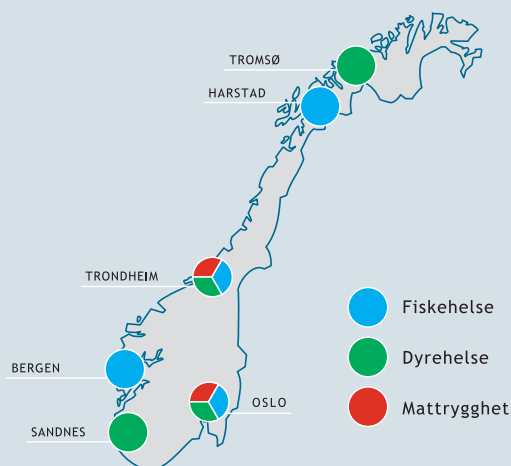
Figur 2 A og B. Prøvetak av enkeltskjell med bruk av pinsett

Faglig ambisiøs, fremtidsrettet og samspillende - for én helse!

Veterinærinstituttet er et nasjonalt forskningsinstitutt innen dyrehelse, fiskehelse, mattrygghet og fôrhygiene med uavhengig kunnskapsutvikling til myndighetene som primæroppgave.

Beredskap, diagnostikk, overvåking, referansefunksjoner, rådgivning og risikovurderinger er de viktigste virksomhetsområdene. Produkter og tjenester er resultater og rapporter fra forskning, analyser og diagnostikk, og utredninger og råd innen virksomhetsområdene. Veterinærinstituttet samarbeider med en rekke institusjoner i inn- og utland.

Veterinærinstituttet har hovedlaboratorium og administrasjon i Oslo, og regionale laboratorier i Sandnes, Bergen, Trondheim, Harstad og Tromsø.



Fiskehelse



Dyrehelse



Mattrygghet



Oslo
postmottak@vetinst.no

Trondheim
vit@vetinst.no

Sandnes
vis@vetinst.no

Bergen
post.vib@vetinst.no

Harstad
vih@vetinst.no

Tromsø
vitr@vetinst.no

www.vetinst.no



Veterinærinstituttet
Norwegian Veterinary Institute