



N I F E S  
NASJONALT INSTITUTT  
FOR ERNÆRINGS- OG  
SJØMATFORSKNING

Rapport  
**2017**

# Algetoksiner i fôr – en undersøkelse av overføring av okadasyre fra fôr til filet og mulige toksiske effekter i laks

Heidi Amlund, Arne Duinker og Marc  
Berntssen

**Nasjonalt institutt for ernærings- og  
sjømatforskning (NIFES)**

31.05.2017



## INNHALDSFORTEGNELSE

<b>Innholdsfortegnelse .....</b>	<b>2</b>
<b>1. Hovedfunn.....</b>	<b>3</b>
<b>2. Bakgrunn .....</b>	<b>3</b>
<b>3. Målsetting .....</b>	<b>3</b>
<b>4. Fremgangsmåte .....</b>	<b>4</b>
Anskaffelse av okadasyre .....	4
Fôrproduksjon .....	4
Fôringforsøk.....	5
<b>5. Resultater.....</b>	<b>6</b>
Vekt og vekst .....	6
Dødelighet og diaré .....	6
Toksiner .....	8
Blodkjemi.....	9
Histologi.....	11
Plasmaenzymer .....	11
EROD aktivitet i lever.....	13
Genuttrykk.....	13
<b>6. Diskusjon.....</b>	<b>14</b>
<b>7. Metoder .....</b>	<b>15</b>
<b>8. Takk til.....</b>	<b>16</b>
<b>Vedlegg A.....</b>	<b>17</b>

## 1. HOVEDFUNN

Okadasyre ble ikke overført fra fôr til filet, hvilket indikerer at tilstedeværelsen av okadasyre i fôr ikke er et problem for mattryggheten. Okadasyre ble akkumulert i lever og eventuelle toksiske effekter i laksen ble undersøkt. Eksponering for okadasyre (opp til 1,0 mg/kg) i seks uker hadde ingen signifikant effekt på vekst og dødelighet, der var ingen utvikling av anemi eller tegn på diaré, og det ble ikke observert skade på lever eller nyre. Resultatene indikerer at okadasyre ikke induiserte kjente biologiske systemer som er aktive i første fase av metabolismen av organiske fremmedstoffer.

## 2. BAKGRUNN

I integrert mulitrofisk akvakultur dyrkes blåskjell i umiddelbar nærhet av merdene. Blåskjell er filtrerende organismer og vil spise mikroalger, som vokser på næringssalter (fosfor og nitrogen) som kommer fra merdene. Blåskjellene kan høstes og bløtdelen brukes som en marin råvare i fiskefôr. Det er for tiden stort fokus på bruken av nye marine råvarer, gjerne fra et lavere trofisk nivå enn fisk, i fôr til fisk.

Det har tidligere vært vist at mel laget av blåskjell inneholder essensielle næringsstoffer, og det egner seg godt som proteinkilde i fiskefôr. Blåskjell kan tidvis inneholde algetoksiner. Det kan høstes blåskjell med lavt innhold av slike toksiner, men det er likevel et behov for å undersøke forekomsten av algetoksiner i blåskjellmel. Det er også nødvendig å undersøke en mulig overføring av algetoksiner fra fôr til filet og eventuelle effekter av algetoksiner i laks for å vurdere mattrygghet og fiskehelse.

Algetoksiner produseres av alger eller fyttoplankton, og akkumuleres i hepatopankreas i filtrerende skjell som blåskjell eller østers. Algetoksiner deles inn i grupper basert på deres kjemiske struktur, men kan også deles etter deres effekter i mennesker. Typiske grupperinger er diarétoksiner (DSP-toksiner) og paralyserende toksiner (PSP-toksiner). Symptomer på forgiftning med DSP-toksiner er diaré, kvalme, oppkast og magesmerter. Diarétoksiner består av okadasyre og dinophysistoksiner (DTX 1-3), som er metabolitter av okadasyre.

## 3. MÅLSETTING

Målsettingene for prosjektet var å

1. Undersøke overføring av algetoksinet okadasyre fra fôr til laksefilet for å vurdere mattrygghet
2. Undersøke mulige toksiske effekter av okadasyre i laks for å vurdere fiskehelse

## 4. FREMGANGSMÅTE

### Anskaffelse av okadasyre

Den opprinnelige plan var å kjøpe ren okadasyre fra en leverandør, men det viste seg å være for dyrt. I stedet ble okadasyre produsert og utvunnet fra en kultur av den bentiske diatoméen *Prorocentrum lima* ved et laboratorium ved University of North Carolina Wilmington, Center for Marine Science, i USA. Fri okadasyre ble levert til forsøket, med 95% renhet på vektbasis, verifisert med LC/MS og NMR.

### Fôrproduksjon

Fôret (basis pellet) ble produsert hos EWOS Innovation, Dirdal, og sendt til NIFES. Hos NIFES ble fôrene top-coated med 6% olje som var tilsatt okadasyre. Etter coatingen ble fôrene sendt tilbake til EWOS Innovation. Før og etter coating, under transport og under forsøket, ble fôrene oppbevart på frys (-20-28 °C). Okadasyre ble tilsatt oljen på følgende måte; okadasyre ble løst i etanol ved bruk av ultralydbad. Avhengig av ønsket konsentrasjon i fôret ble ulike volumene av okadasyre stamløsningen blandet inn i temperert olje. Alle oljeblandinger inneholdt 1% etanol. Blandingen ble ristet ved mekanisk risting i 2 timer før coating av fôrene. Rett før coating ble flaskene med oljeblandinger ristet godt. Fôr ble tilsatt okadasyre (OA) i tre ulike konsentrasjoner nivåer; 0,1, 0,5 og 1,0 mg OA/kg fôr (Tabell 1). De analyserte nivåer OA i fôrene var henholdsvis  $0,04 \pm 0,00$ ,  $0,24 \pm 0,02$  og  $0,64 \pm 0,05$  mg/kg ( $n = 3$ ). De målte konsentrasjoner var noe lavere enn de ønsket konsentrasjoner. Dette kan skyldes at all okadasyre ikke ble ekstrahert, da ekstraksjonsmetoden er ikke tilpasset feite prøver som fôr. Innblandingen av okadasyre var homogen, så vi vurderer at diettene var akseptable for forsøket, på tross av de lavere målte nivåer av okadasyre.

**Tabell 1.** Konsentrasjoner av okadasyre (OA) i diettene (mg/kg).

Diet	Ønsket konsentrasjon mg/kg	Nominell konsentrasjon (Basert på tilsatt mengde OA) mg/kg	Målt konsentrasjon (Gjennomsnitt ± standardavvik, n = 3) mg/kg
1	0	0	Ikke detektert
2	0,1	0,14	0,04 ± 0,00
3	0,5	0,69	0,24 ± 0,02
4	1	1,37	0,64 ± 0,05

### Fôringsforsøk

Fôringsforsøket ble gjennomført hos EWOS Innovation, Dirdal, i perioden juni til august 2016, og var godkjent av Mattilsynet (FOTS id nummer 8294). Laks (rundt 200 g) i sjøvann ble eksponert for okadasyre via fôr i seks uker etter fulgt av en elimineringsperiode på fire uker, hvor alle fisk gikk på kontrolldietten. Per behandling var der tre kar. Opprinnelig plan var å eksponere laks i åtte uker, men på grunn mangel på fôr ble eksponeringsperioden kortet ned med to uker. Dette skyldes at fiskene var litt større enn planlagt ved forsøksstart.

Underveis i forsøket ble det tatt prøver av muskel og blod. I et tidligere forsøk ble laks (20 g) i ferskvann gitt DSP-toksiner i 12 uker. Der var ingen tegn på redusert helse, men var der tegn på anemi i høy dose gruppen (1 mg/kg) ved slutten av forsøket. I dette forsøk ble laks eksponert for okadasyre (opptil 1 mg/kg) i seks uker, og ved planlagte prøvetakinger underveis så vi etter tegn på anemi (måling av hematokritt nivå). Okadasyre kan føre til diaré, men vi vet ikke ved hvilke doser. Vi fulgte derfor nøye med på tegn på eventuell diaré i eksponeringsperioden.

Ved start av forsøket, uke 6 og uke 10 ble det tatt prøver av fisken (blod, plasma, muskel, lever, hodenyre, midtnyre, milt, fortarm og baktarm) for senere analyser. Følgende endepunkter ble vurdert: hematologi, tarmhelse og leverfunksjon.

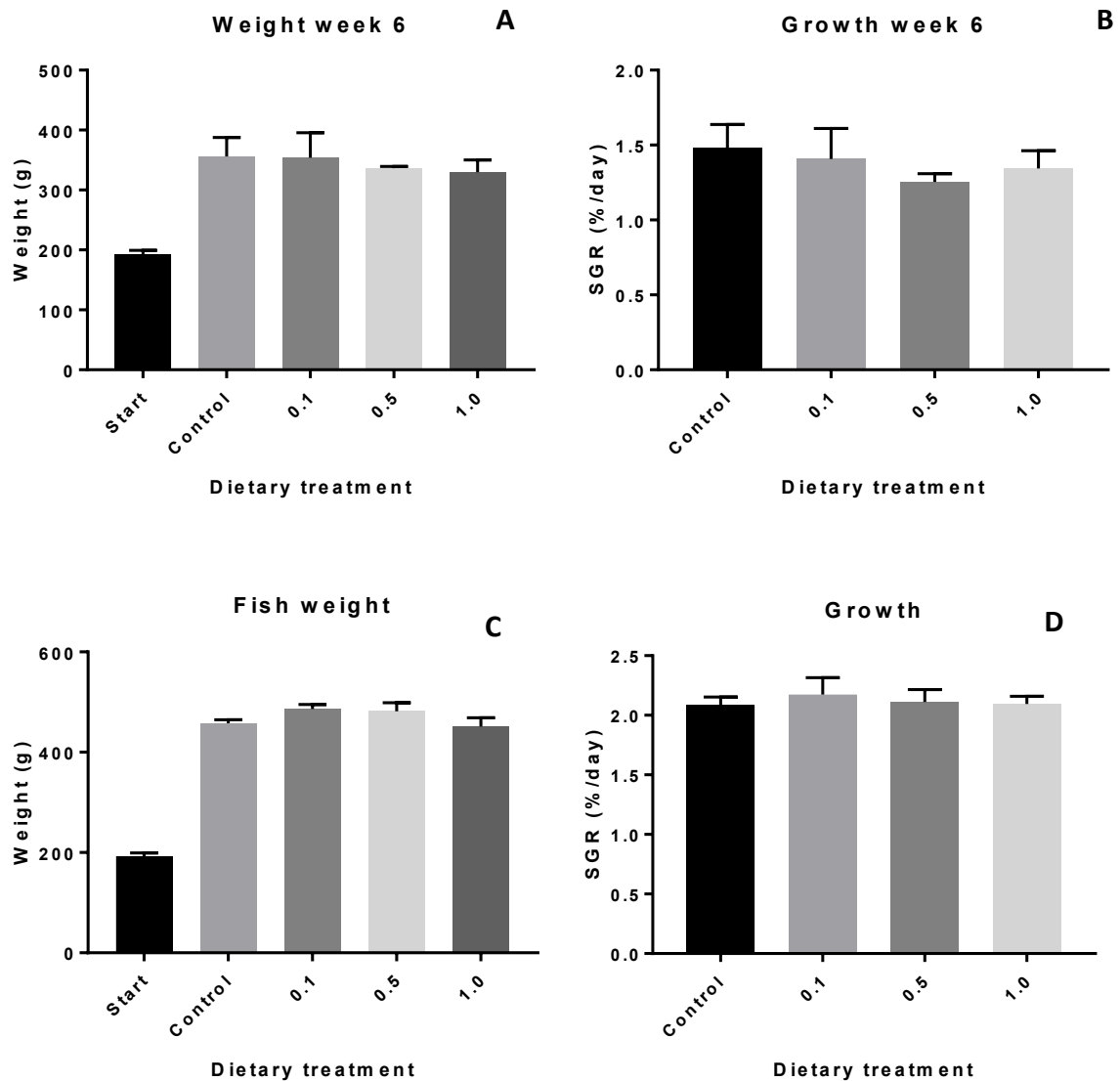
## 5. RESULTATER

### Vekt og vekst

I alle grupper (kontroll, 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg eller 1,0 mg/kg) doblet laksen sin vekt under forsøket (Figur 1C). Ved start var gjennomsnittsvekten  $198 \pm 7$  g ( $n = 12$  kar), mens etter ti uker var vektene  $458 \pm 7$ ,  $486 \pm 9$ ,  $482 \pm 17$  og  $451 \pm 17$  ( $n = 3$ ) for fisk fôret med henholdsvis kontroll, 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg eller 1,0 mg/kg diettene. Eksponering for okadasyre hadde ingen signifikant effekt på vekten til fiskene; etter seks uker eksponering var gjennomsnittsvektene  $356 \pm 32$ ,  $354 \pm 42$ ,  $336 \pm 4$  og  $330 \pm 21$  ( $n = 3$ ) for fisk fôret med henholdsvis kontroll, 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg eller 1,0 mg/kg diettene (Figur 1C). Vektene for laks gitt 0,5 og 1,0 mg/kg diettene var lavere, men ikke signifikant, enn vektene for laks gitt kontroll og 0,1 mg/kg diettene. Samme tendens ses for den spesifikke vekstrate; vekstraten for laks gitt 0,5 og 1,0 mg/kg diettene var lavere, men ikke signifikant, enn vektene for laks gitt kontroll og 0,1 mg/kg diettene. Den spesifikke vekstrate var  $1,48 \pm 0,16$ ,  $1,41 \pm 0,20$ ,  $1,26 \pm 0,05$  og  $1,35 \pm 0,12$  %/dag ( $n = 3$ ) for fisk fôret med henholdsvis kontroll, 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg eller 1,0 mg/kg diettene. For hele forsøket varierte den spesifikke vekstrate fra 2,1 til 2,2 %/dag og ingen signifikante forskjeller ble observert (Figur 1B).

### Dødelighet og diaré

Eksponeringen for okadasyre hadde ingen signifikant effekt på dødeligheten. Under forsøket døde få fisk, og dødeligheten var uavhengig av diettene. Fiskene fikk ikke diaré som følge av eksponering for okadasyre.



**Figur 1.** A. Gjennomsnittsvikt (g)  $\pm$  standardavvik av laks ved start (n = 12) av forsøk og etter seks ukers eksponering (n = 3 for hver diett). B. Vekst (% per dag)  $\pm$  standardavvik i laks etter seks ukers eksponering. C. Gjennomsnittsvikt (g)  $\pm$  standardavvik av laks ved start (n = 12) av forsøk og etter (fire uker med eliminering i tillegg til seks uker med eksponering) (n = 3 for hver diett). D. Vekst (% per dag)  $\pm$  standardavvik i laks etter ti uker. Fisken ble gitt en av fire dietter; kontroll, 0,1 mg OA/kg fôr, 0,5 mg OA/kg fôr eller 1,0 mg OA/kg fôr (n = 3 for hver diett). I elimineringsperioden (uke 7 til 10) ble alle laks gitt kontroldietten.

## Toksiner

Det ble tatt ut prøver av muskel ved start og ti gange i løpet av forsøket, mens lever ble tatt ved start og etter eksponerings- (uke 6) og elimineringsperioden (uke 10). Siden omfanget av prøver er stort og analysene kostnadene store, ble prøver fra uke 6 analysert først. Basert på resultatene ville flere analyser bli vurdert i etterkant.

Nivåene av okadasyre, DTX-1 og DTX-3 ble målt i muskel og lever etter seks ukers eksponering, alle prøver var samleprøver av tre fisk per kar. I alle muskelprøver og fem leverprøver (alle kontrollprøver og to prøver av fisk gitt dietten med laveste konsentrasjon av okadasyre (0,1 mg/kg)) ble okadasyre ble ikke kvantifisert. I lever økte konsentrasjonene<sup>1</sup> av okadasyre med økende konsentrasjoner av okadasyre i diettene (Figur 2). Konsentrasjonene var 4,05 (n = 1), 13,5 ± 0,4 (n = 3) og 31,4 ± 11,2 (n = 3) µg/kg våt vekt i fisk fôret med henholdsvis 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg eller 1,0 mg/kg diettene. Konsentrasjonen i lever fra fisk gitt 1,0 mg/kg dietten var signifikant (p < 0,05) enn konsentrasjonene i lever fra fisk gitt 0,1 og 0,5 mg/kg diettene.

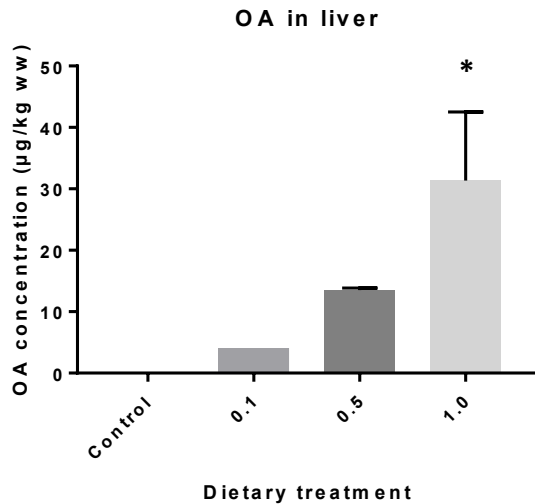
I leverprøver ble det også gjort metodearbeid for analyse av metabolitter av okadasyre, fra fiskens egen metabolisering av toksinet, men det er ikke mulig å si noe om forekomsten av metabolitter. Dette vil kreve større tilpasninger av metoden og mer biologisk materiale.

Da okadasyre ikke ble kvantifisert i muskelprøver ble det bestemt at det ikke skulle analyseres flere prøver.

---

<sup>1</sup>Konsentrasjonene er lavere enn konsentrasjoner angitt i prosjektrapporten sendt februar 2017. Konsentrasjonene ble korrigeret etter en kvalitetssikring av resultatene.





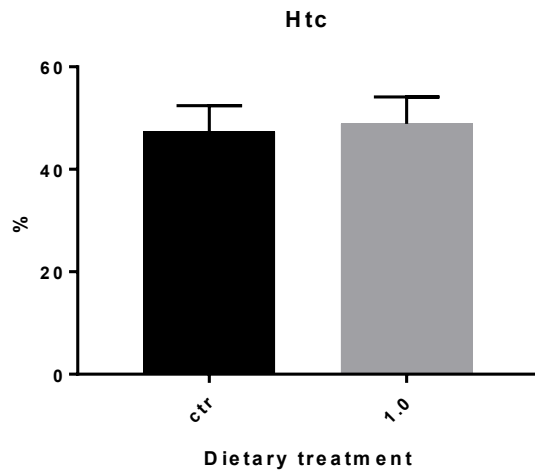
**Figur 2.** Gjennomsnittskonsentrasjon ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  våt vekt,  $n = 3$ , unntatt 0,1 mg/kg dietten  $n = 1$ )  $\pm$  standardavvik av okadasyre i lever fra laks etter seks ukers eksponering. Fisken ble gitt en av fire dietter; kontroll, 0,1 mg OA/kg fôr, 0,5 mg OA/kg fôr eller 1,0 mg OA/kg fôr ( $n = 3$  for hver diett). I alle kontrollprøver og to prøver av fisk gitt 0,1 mg/kg dietten ble okadasyre ikke kvantifisert. Konsentrasjoner markert med \* er signifikant forskjellige fra de øvrige grupper ( $p < 0,05$ , enveis-ANOVA).

### Blodkjemi

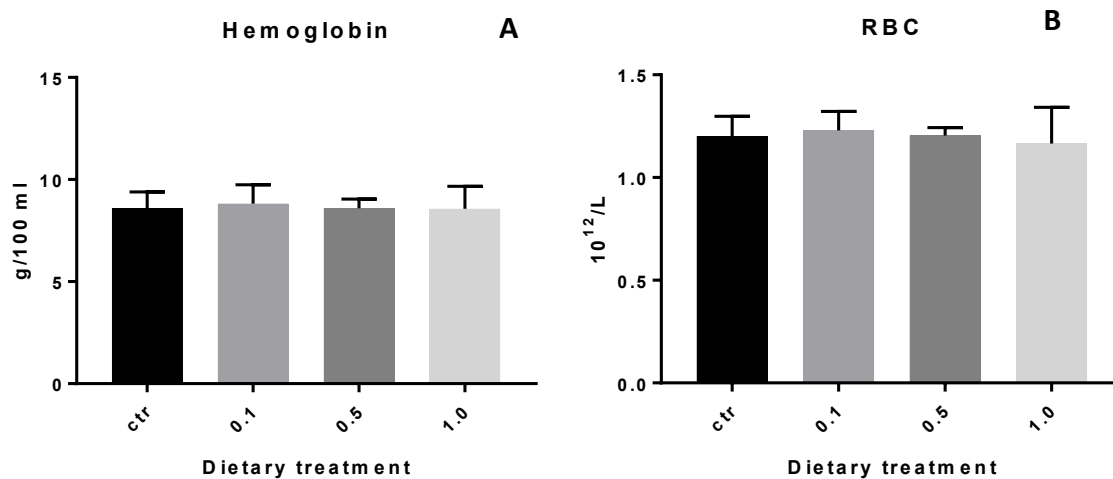
Tidlige forsøk med laks som var eksponert for naturlig forgiftede blåskjell, med påviste nivåer av DSP-toksiner, viste endret hematokritt. Blåskjellene ble kun analysert for DSP-toksiner, så tilstedeværelsen av andre algetoksiner kan ikke utelukkes, og andre toksiner kan ha forårsaket redusert hematokritt. For å følge med på utviklingen av anemi ble hematokritt (prosentandel røde blod celler) bestemt i blod fra laks underveis i hele forsøket. Prøver ble tatt av laks som gikk på kontrolldietten og dietten med høyeste nivå av okadasyre (1,0 mg/kg). Hematokritt-tallene var normale og der var ingen forskjell mellom kontroll og eksponert laks (data ikke vist). Etter seks ukers eksponering var hematokritt tallene  $47 \pm 5$  og  $49 \pm 5$  % ( $n = 9$ ) i blod fra fisk fôret med henholdsvis kontroll eller 1,0 mg/kg diettene (Figur 3).

Etter seks ukers eksponering ble hemoglobin og antall røde blod celler målt i blod fra laks fra alle fire diettgrupper (Figur 4A og B). Gjennomsnittskonsentrasjonen av hemoglobin var  $8,6 \pm 0,8$ ,  $8,8 \pm 0,9$ ,  $8,6 \pm 0,5$  og  $8,6 \pm 1,1$  g/100 ml ( $n = 9$ ) i blod fra fisk fôret med henholdsvis kontroll, 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg eller 1,0 mg/kg diettene (Figur 4A). Der var ingen signifikante forskjeller mellom de ulike gruppene. Antall røde blod celler var  $1,20 \pm 0,10$ ,  $1,23 \pm 0,09$ ,  $1,20 \pm 0,04$  og  $1,17 \pm 0,18$   $\cdot 10^{12}/\text{L}$  ( $n = 9$ ) i blod fra

fisk fôret med henholdsvis kontroll, 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg eller 1,0 mg/kg diettene (Figur 4B). Der var ingen signifikante forskjeller mellom de ulike gruppene.



**Figur 3.** Prosentandel røde blodceller (%; n = 6) ± standardavvik i blod fra laks etter 6 ukers eksponering. Fisken ble gitt kontrolldiett eller en diett tilsatt 1,0 mg OA/kg fôr (n = 3 for hver diett).



**Figur 4.** Gjennomsnittskonsentrasjon (g/100 ml, n = 9) ± standardavvik av hemoglobin (A) og antall røde blodceller (\*10<sup>12</sup>/L, n = 9) (B) i blod fra laks etter seks ukers eksponering. Fisken ble gitt en av fire dietter; kontroll, 0,1 mg OA/kg fôr, 0,5 mg OA/kg fôr eller 1,0 mg OA/kg fôr.

## Histologi

Det ble tatt ut prøver (hodenyre, midtneyre, milt, lever, fortarm og baktarm) til histologiske undersøkelser ved start og etter eksponerings- (uke 6) og elimineringsperioden (uke 10). Siden omfanget av prøver er stort og analysene kostnadene store, ble prøver fra uke 6 analysert først. Basert på resultatene skulle flere analyser vurderes i etterkant.

De ulike organer og mulige forandringer ble undersøkt uten at det var kjent fra hvilken gruppe individet var hentet. Det ble registrert en del forandringer som potensielt kunne ha vært knyttet til en toksisk eksponering, men ved å sammenholde dette med hvilke grupper som var eksponert, var det ikke mulig å påvise noen sikre dose-respons sammenhenger. Endringene ble observert i alle grupper, inklusiv kontroll (Tabell 2).

Siden der ikke var noen sammenheng mellom observerte forandringer og eksponeringen for okadasyre gikk vi ikke videre med de histologiske undersøkelsene.

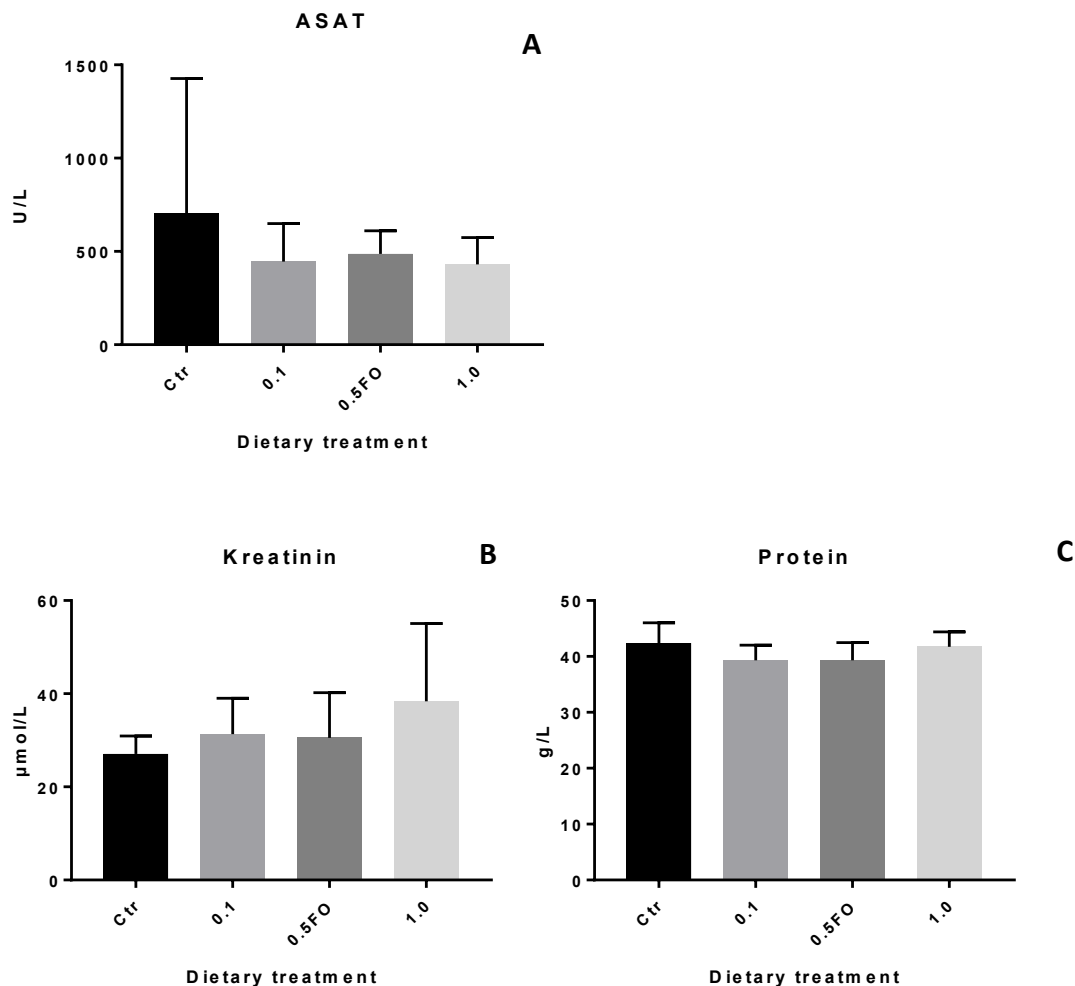
**Tabell 2.** Oversikt over den histologiske undersøkelsen. Prøver (hodenyre, midtneyre, milt, lever, fortarm og baktarm) ved start (W0) og etter eksponerings- (uke 6, W6) og elimineringsperioden (uke 10, W10). Fisken ble gitt en av fire dietter; kontroll, 0,1 mg OA/kg fôr, 0,5 mg OA/kg fôr eller 1,0 mg OA/kg fôr. X angir undersøkte organer, grønn marker at observasjoner er normale, og rød marker forandringer.

Diett	Tidspunkt	Individ	Hodenyre	Lever	Fortarm	Milt pigment	Milt matrix	Midtneyre	Baktarm
	W0	T1F1	x	x	x				
0.5	W6	T1F1				x	x	x	x
0.5	W6	T1F2						x	x
0.1	W6	T2F1		x	x				
1	W6	T5F1	x	x		x	x	x	
1	W6	T7F1	x	x		x	x	x	x
ctr	W6	T10F1	x	x	x	x	x	x	x
ctr	W6	T11F1	x	x	x	x	x	x	x
1	W10	T5F1	x	x	x	x	x	x	x
1	W10	T7F1	x	x	x	x	x	x	x
ctr	W10	T10F1	x	x	x	x	x	x	x
ctr	W10	T11F1	x	x	x	x	x	x	x

## Plasmaenzymer

Aspartat aminotransferase (ASAT), alanin aminotransferase (ALAT), kreatinin og protein ble målt i plasma fra laks etter seks ukers eksponering (Figur 5A-C). Konsentrasjonene av ASAT var  $704 \pm 723$  (n = 8),  $446 \pm 68$  (n = 9),  $487 \pm 124$  (n = 9) og  $431 \pm 143$  (n = 9) U/L i plasma fra fisk fôret med henholdsvis

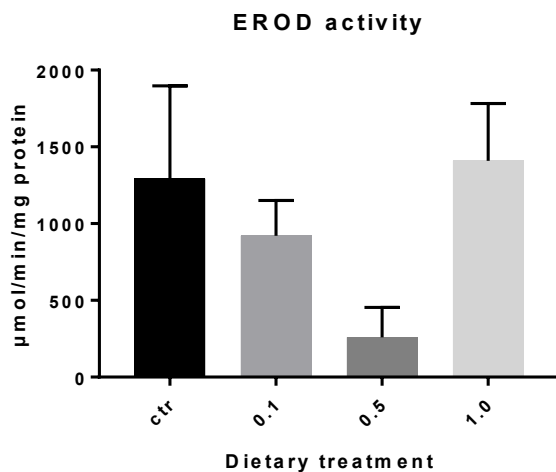
kontroll, 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg eller 1,0 mg/kg diettene (Figur 5A). Det høyere gjennomsnitt og store standardavvik for kontrollgruppen skyldes en høy verdi for en av prøvene. Der var ingen signifikante forskjeller mellom de ulike gruppene. Konsentrasjonene av ALAT var meget lave og i nærheten av metodens bestemmelsesgrense. Der var en del hemolyse i prøvene, noe som analysen av ALAT er følsom for. Konsentrasjonene av kreatinin var  $27,1 \pm 3,8$ ,  $31,3 \pm 7,7$ ,  $30,5 \pm 6,7$  og  $38,4 \pm 16,7$   $\mu\text{mol/L}$  ( $n = 9$ ) i plasma fra fisk fôret med henholdsvis kontroll, 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg eller 1,0 mg/kg diettene (Figur 5B). Der var ingen signifikante forskjeller mellom de ulike gruppene. Proteinkonsentrasjonene var  $42,4 \pm 3,6$ ,  $39,3 \pm 2,7$ ,  $39,3 \pm 3,1$  og  $41,8 \pm 2,6$  g/L ( $n = 9$ ) i plasma fra fisk fôret med henholdsvis kontroll, 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg eller 1,0 mg/kg diettene (Figur 5C). Der var ingen signifikante forskjeller mellom de ulike gruppene.



**Figur 5.** Konsentrasjoner av ASAT (aspartat aminotransferase, U/L,  $n = 9$ , unntatt kontroll  $n = 8$ ) (A), kreatinin ( $\mu\text{mol/L}$ ,  $n = 9$ ) (B) og protein (g/L,  $n = 9$ ) (C) i plasma fra laks etter seks ukers eksponering. Fisken ble gitt en av fire dietter; kontroll, 0,1 mg OA/kg fôr, 0,5 mg OA/kg fôr eller 1,0 mg OA/kg fôr.

### EROD aktivitet i lever

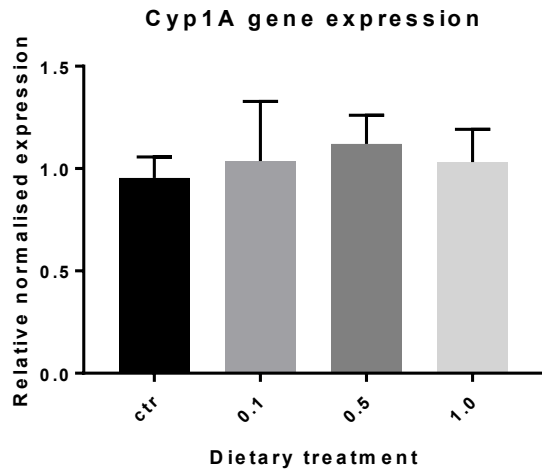
Aktiviteten til ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) ble målt i lever fra laks etter seks ukers eksponering (Figur 6). Aktiviteten var  $1293 \pm 605$  ( $n = 3$ ),  $921 \pm 229$  ( $n = 2$ ),  $260 \pm 195$  ( $n = 3$ ) og  $1410 \pm 373$  ( $n = 3$ )  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein i lever fra fisk fôret med henholdsvis kontroll, 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg eller 1,0 mg/kg diettene (Figur 6). Aktiviteten var signifikant ( $p = 0,0394$ ) lavere i lever fra fisk gitt 0,5 mg/kg dietten sammenlignet med 1,0 mg/kg. EROD aktiviteten var generelt lavere i lever i 0,5 mg/kg gruppen sammenlignet med de andre grupper, og av de tre prøver var den ene prøven meget lav. Siden både gruppene gitt 0,1 og 1,0 mg/kg viste høyere aktivitet enn gruppen gitt 0,5 mg/kg var det ingen klar sammenheng med eksponering.



**Figur 6.** Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) aktivitet ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein,  $n = 3$ ,  $n = 2$  for 0,1 mg/kg) i lever fra laks etter seks ukers eksponering. Fisken ble gitt en av fire dietter; kontroll, 0,1 mg OA/kg fôr, 0,5 mg OA/kg fôr eller 1,0 mg OA/kg fôr.

### Genuttrykk

Genuttrykket et *Cyp1* ble målt i lever fra laks etter seks ukers eksponering (Figur 7). Det relative genuttrykk var  $0,95 \pm 0,10$ ,  $1,04 \pm 0,17$ ,  $1,12 \pm 0,08$  og  $1,03 \pm 0,09$  ( $n = 3$ ) i lever fra fisk fôret med henholdsvis kontroll, 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg eller 1,0 mg/kg diettene (Figur 7).



**Figur 7.** Genuttrykk til *Cyp1A* (relative verdier, n = 3) i lever fra laks etter seks ukers eksponering. Fisken ble gitt en av fire dietter; kontroll, 0,1 mg OA/kg fôr, 0,5 mg OA/kg fôr eller 1,0 mg OA/kg fôr.

## 6. DISKUSJON

Nivåene av okadasyre ble målt i muskel og lever etter seks ukers eksponering. I muskel ble okadasyre ble ikke kvantifisert, mens i lever økte konsentrasjonene av okadasyre med økende konsentrasjoner i diettene. Okadasyre ble ikke overført fra fôr (opp til 1,0 mg OA/kg) til filet, hvilket indikerer at tilstedeværelsen av okadasyre i fôr ikke er et problem for mattryggheten. Okadasyre ble akkumulert i lever og eventuelle toksiske effekter i fisken ble undersøkt.

Eksponering for okadasyre (opp til 1,0 mg/kg) i seks uker hadde ingen signifikant effekt på vekst og dødelighet. Vekt og spesifikk vekstrate var lavere, men ikke signifikant, for laks gitt 0,5 og 1,0 mg/kg diettene sammenlignet med laks gitt kontroll og 0,1 mg/kg diettene. Under forsøket døde få fisk, og dødeligheten var uavhengig av diettene. Fiskene fikk heller ikke diaré i løpet av de seks ukers eksponering. For å følge med på utviklingen av anemi ble hematokritt bestemt i blod fra laks (kontroll og 1,0 mg OA/kg gruppene) underveis i hele forsøket. Hematokritt-verdiene var normale og der var ingen forskjell mellom kontroll og eksponert laks (data ikke vist). Den eksponerte gruppen viste ingen tegn på utvikling av anemi. De øvrige parameter (nivå av hemoglobin og antall røde blodceller) var heller ikke påvirket i noen av de fire gruppene etter seks ukers eksponering.

De histologiske undersøkelsene viste ingen sikre sammenhenger mellom observerte forandringer og eksponeringene. Det ble registrert en del forandringer som potensielt kunne ha vært knyttet til en toksisk eksponering, men ved å sammenholde dette med hvilke grupper som var eksponert, var det ikke mulig å påvise noen sikre sammenhenger.

Okadasyre ble akkumulert i lever, og konsentrasjonene av okadasyre økte signifikant, med økende konsentrasjoner av okadasyre i diettene. Selv om okadasyre akkumuleres i lever var det lite som tyder på at okadasyre har toksiske effekter i lever. Det var ingen signifikante forskjeller i konsentrasjonene av ASAT i plasma fra fisk fra de fire grupper. En økning i konsentrasjonen av ASAT er en indikasjon på leverskade. Aktiviteten til EROD ser ikke ut til å være påvirket; der var ingen signifikante forskjeller på aktiviteten i lever fra fisk som gikk på kontroll, 0,1 mg OA/kg og 1,0 mg OA/kg diettene. Eksponering for okadasyre førte ikke til økt uttrykk av genet *Cyp1A*, der var ingen signifikante forskjeller i genuttrykket i lever fra fisk i de fire diettgrupper. Til sammen indikerer resultatene (EROD aktivitet og uttrykk av *Cyp1A*) at okadasyre ikke induserer Cytokrom P450-systemet, som typisk er aktivt i første fase av metabolismen av organiske fremmedstoffer.

Basert på alle observasjoner er det lite som tyder at eksponering for okadasyre (opp til 1,0 mg/kg i seks uker) fører til toksiske effekter i laks.

## 7. METODER

Analytt/parameter	Metode
Okadasyre	Ekstraksjon i metanol og heksan, analyse med HPLC-MS/MS (QQQ)
Histologi	Fiksering i formalin, farge med HE
Hematokritt	Mikrokapillær sentrifugeringsmetode
Hemoglobin og antall røde blod celler	Målt ved bruk av et Cell-Dun 400 instrument
ALAT, ASAT, kreatinin og protein	Målt ved hjelp av spesifikke kits og en MaxMat PL Multianalyser
Genuttrykk	Kvantitative real-time qPCR analyse etter kontroll av RNA kvalitet og integritet
EROD aktivitet	Målt ved hjelp av spesifikt kit og en Victor X5 2030 Multiple Plate Reader

## **8. TAKK TIL**

Vi vil gjerne takke Terje Utne og Mali Hartviksen (EWOS Innovation) for god gjennomføring av forsøket, Stine Therese Aanrud og John Bunæs (NMBU) for analyse av okadasyre, Arild Espenes og Alf Seljenes Dalum (NMBU) for de histologiske undersøkelser. Ved NIFES takker vi Vidar Fauskanger for hjelp med top-coatingen, Marta Silva og Josef Rasinger for hjelp ved uttak, og Hege Haraldsen og Hui-Shan Tung for hjelp med analyser.



## VEDLEGG A

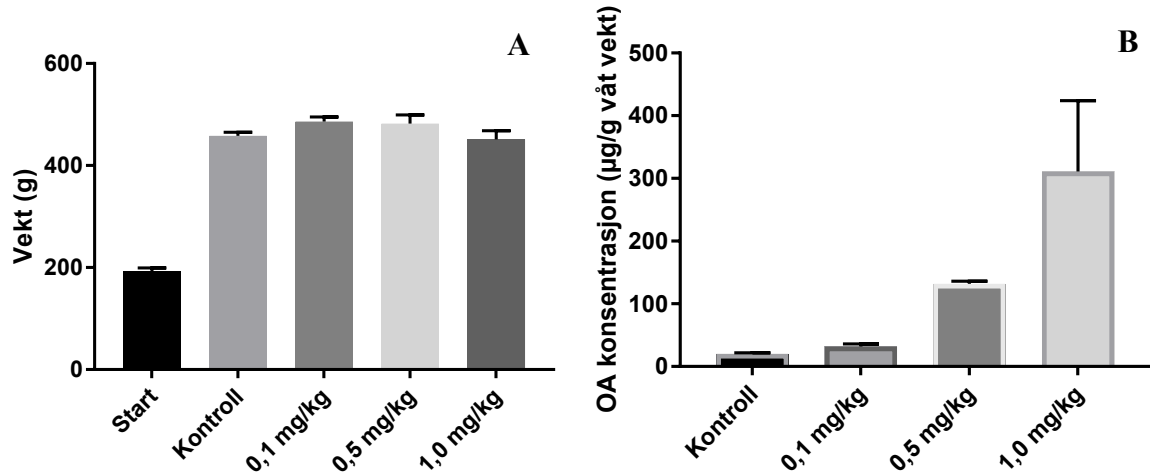
### Rapportering – Algetoksiner i fôr til laks

**Arne Duinker, Marc Berntssen og Heidi Amlund, februar 2017**

I multitrofisk akvakultur dyrkes blåskjell i umiddelbar nærhet av merdene. Blåskjellene kan høstes og brukes som en marin råvare i fiskefôr. Blåskjell kan tidvis inneholde algetoksiner. Typiske toksiner er diarétoksiner (DSP-toksiner) og paralyserende toksiner (PSP-toksiner). Tilstedeværelsen av algetoksiner i mel fra blåskjell kan være en utfordring for fiskehelse og mattrygghet.

Fôr ble tilsatt DPS-toksinet okadasyre (OA) i tre ulike konsentrasjoner nivåer; 0,1, 0,5 og 1,0 mg/kg fôr. Okadasyren ble produsert og utvunnet fra en algekultur ved et laboratorium i USA. Laks i sjøvann ble eksponert for okadasyre via fôr i seks uker etter fulgt av en elimineringsperiode på fire uker. Per behandling var der tre kar.

I alle grupper (kontroll, 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg eller 1,0 mg/kg) doblet Fisken sin vekt under eksponeringen (Figur 1A). Eksponering for okadasyre hadde lite effekt på veksten til Fisken; den spesifikke vekst rate varierte fra 2,1 til 2,2 %/dag og ingen signifikante forskjeller ble observert. Eksponeringen for okadasyre hadde ingen signifikant effekt på dødeligheten. Under forsøket døde få fisk, og dødeligheten var uavhengig av diettene.



Figur 1. A. Gjennomsnittsvekt (g)  $\pm$  standardavvik av laks ved start (n = 12) av forsøk og etter seks ukers eksponering. B. Gjennomsnittskonsentrasjon ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  våt vekt, n = 3)  $\pm$  standardavvik av OA i lever fra laks etter seks ukers eksponering. Fisken ble gitt en av fire dietter; kontroll, 0,1 mg OA/kg fôr, 0,5 mg OA/kg fôr eller 1,0 mg OA/kg fôr (n = 3 for hver diett).

Nivåene av okadasyre ble målt i muskel og lever etter seks ukers eksponering. I muskel ble okadasyre ble ikke detektert, mens i lever økte konsentrasjonene av okadasyre med økende konsentrasjoner i diettene (Figur 1B).

Okadasyre ble ikke overført fra fôr til fisk, hvilket indikerer at tilstedeværelsen av okadasyre i fôr ikke er et problem for mattryggheten. Okadasyre akkumuleres i lever og eventuelle toksiske effekter i laksen bør undersøkes. Eksponering for okadasyre (opp til 1,0 mg/kg) i seks uker hadde lite effekt på vekst og dødelighet.