

Verkefnaskýrsla Rf
18 - 06



Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins

September 2006

FORVARNIR Í FISKELDI

**B-hluti: Flokkun örvera, tilraunir með
notkun bætibaktería og
próteinmengjarannsóknir**

Rannveig Björnsdóttir
Heiðdís Smáradóttir
Jónína Þ Jóhannsdóttir
Ágústa Guðmundsdóttir
Hólmfríður Sveinsdóttir (PhD nemi)
H. Rut Jónsdóttir (MS verkefni)
Særún Ósk Sigvaldadóttir (BS verkefni)
Viktor Mar Bonilla
Eyjólfur Reynisson
María Pétursdóttir



Titill / Title	Forvarnir í fiskeldi - Flokkun örvera og tilraunir með notkun bætibaktería		
Höfundar / Authors	Rannveig Björnsdóttir, Heiðdís Smáradóttir, Jónína Þ Jóhannsdóttir, Ágústa Guðmundsdóttir, Hólmfríður Sveinsdóttir (PhD nemi), H. Rut Jónsdóttir (MS verkefni), Særún Ósk Sigvaldadóttir (BS verkefni), Viktor Mar Bonilla, Eyjólfur Reynisson, María Pétursdóttir		
Skýrsla Rf / IFL report	18 - 06	Útgáfudagur / Date:	September 2006
Verknr. / project no.	1622		
Styrktaraðilar / funding:	AVS rannsóknasjóður í sjávarútvegi (Forvarnir í fiskeldi, B-hluti) Nora – Nordisk Atlantsamarbeide (Oppdrett av marine larver)		
Ágrip á íslensku:	<p>Megin markmið verkefnisins var að stuðla að aukinni afkomu lúðulirfa og þorsklirfa í eldi og nota til þess umhverfisvænari aðferðir. Notuð var blanda bætibaktería (<i>probiotic bacteria</i>) í því markmiði að breyta samsetningu bakteríuflóru á fyrstu stigum eldisins og auka með því stöðugleika í eldisumhverfi sem rannsóknir sýna að bætir afkomu lirfa. Forkannanir á notkun blöndunnar bentu til að hún stuðlaði að auknu hlutfalli lirfa sem þroskuðust eðlilega og ekki virtist þurfa að meðhöndla lirfur jafn oft í því skyni að ná niður bakteríufjölda og halda afföllum í lágmarki.</p> <p>Í verkefninu var jafnframt þróuð aðferð til að kortleggja mynstur heildarörveruflóru með sameindafræðilegum aðferðum og rannsökuð fylgni á milli vaxtar/afkomu lirfa og þróunar á fjölda og mynstri bakteríuflóru á fyrstu stigum eldisins. Jafnframt voru þekktar aðferðir próteinmengjagreininga aðlagðar til að hægt væri að rannsaka áhrif umhverfisþátta, í þessu tilfalli bætibaktería, á próteintjáníngu í þorsklirfum.</p> <p>Helstu niðurstöður benda til þess að fôðurdýr lirfa (<i>Artemia</i>, hjóldýr) séu afar misjöfn að gæðum með tilliti til fjölda baktería. Niðurstöður benda jafnframt til þess að bakteríuflóra fôðurdýra sé fremur einsleit en fjölbreyttari flóra sé að finna í lúðulirfum ef litið er til ræktanlegrar bakteríuflóru. Mjög sambærilegar niðurstöður fengust með rannsóknum á heildarflóru baktería og bendir það til að bakteríuflóra á fyrstu stigum lúðueldis sé að stórum hluta ræktanleg. Meðhöndlun með bætibakteríum virtist ekki hafa afgerandi áhrif á afkomu lúðulirfa en aftur á móti reyndist meðhöndlun leiða til lækkunar á hlutfalli vanskapaðra lúðulirfa á kviðpokastigi. Niðurstöður rannsókna á fyrstu stigum þorskeldis sýna aftur á móti að auka mátti lifun lirfa talsvert við meðhöndlun bæði lirfa og fôðurdýra þeirra með bætibakteríum. Niðurstöður úr próteinmengjagreiningum sýna að meðhöndlun með bætibakteríum hefur afgerandi áhrif á próteintjáníngu þorsklirfa samanborið við ómeðhöndlaðar lirfur. Í meðhöndluðum þorsklirfum voru 16 próteindeplar tjáðir marktækt ($P \leq 0.05$) í meira magni og 59 próteindeplar í minna magni samanborið við viðmiðunaráhóp.</p> <p>Niðurstöður verkefnisins í heild sinni sýna að meðhöndlun með bætibakteríum virðist hafa meiri áhrif á fyrstu stigum þorskeldis og gæti skýringa á því verið að leita í meira jafnvægi og almennt minni fjölda baktería á fyrstu stigum lúðueldis Fiskey ehf. Margra ára rannsóknir í samstarfi við Fiskey ehf. liggja þarna að baki og hefur reglubundið eftirlit með fjölda og samsetningu ræktanlegrar bakteríuflóru á hinum ýmsu stigum eldisins leitt til aukins jafnvægis og almennt betri gæða í framleiðslunni. Verkefnið hefur því tvímælalaust eflt þekkingu á fyrstu stigum eldis sjávarfiska og stuðlað að aukinni hagkvæmni í eldi sjávartegunda fiska á Íslandi.</p> <p>Verkefnið var styrkt af AVS rannsóknasjóði í sjávarútvegi (2004-2006) svo og Nordisk Atlantsamarbeide (2004-2006).</p>		
Lykilorð á íslensku:	Sjávarfiskaeldi – fyrstu stig eldisins - afkoma – bakteríuflóra – bætibakteríur – flokkun baktería – sameindafræðilegar aðferðir		



Summary in English:

The aim of this project was to increase survival of halibut and cod larvae in aquaculture. Larvae and their live feed were treated with a mixture of probiotic bacteria in order to change the pattern of the bacterial flora during the first processing stages and thereby increasing the stability in the environment, as increased stability has been shown to contribute to increasing growth and survival of larvae. Results from preliminary experiments using the probiotic mixture indicated that treatment contributed to increased percentage of yolk sack larvae that developed in a normal way, and fewer treatments of larvae were needed in order to control bacterial growth and keep larval death to a minimum.

A molecular method was introduced and developed to analyse the pattern of the bacterial flora in environmental samples, as well as comparing the pattern of the total bacterial flora and the cultivable bacterial flora which was grouped with respect to a number of biochemical properties. Furthermore, the correlation between growth/survival of larvae and the numbers and pattern of bacteria during the first stages of the production was examined. Methods for proteomic analysis were furthermore customised and used in order to investigate the effect of treatment with probiotic bacteria on protein expression in cod larvae.

Primary results indicate that the quality of the larval live feed (*Artemia*, rotifers) varies considerably with respect to numbers of culturable bacteria as well as with respect to the pattern combination of the total bacterial flora. The culturable part of the bacterial flora of *Artemia* was shown to be relatively homogenous with respect to species composition, while more heterotrophic bacterial flora was observed in eggs and larvae. Similar results were obtained with the total bacterial flora, which indicates that the bacterial flora during the first production stages of halibut aquaculture is mostly culturable. Treatment with probiotic bacteria did not seem to profoundly affect the survival of halibut larvae, but the percentage of deformed (gaping) larvae turned out to be below average in yolk sack larvae treated with the probiotic mixture.

Furthermore, survival of cod larvae was shown to be considerably increased by treatment of both larvae and the live feed (rotifers). Results from the proteomic analyses reveal that treatment with probiotic bacteria profoundly affects protein expression in larvae, compared to untreated larvae. Sixteen protein spots were expressed in significantly greater magnitude ($P \leq 0.05$) and 59 protein spots in significantly smaller magnitude compared to the protein expression in larvae from the control group.

The overall results indicate that treatment with the probiotic mixture has more profound effects during the first production stages of cod larvae compared to halibut larvae, which could be partly explained by more stability and overall lesser numbers of bacteria during the first production stages of halibut larvae at Fiskey Ltd.

The project was supported by the Icelandic AVS fund (2004-2006) and Nordisk Atlantsamarbeide (2004-2006).

English keywords: *Marine aquaculture – production of larvae – survival – bacteria – probiotic bacteria – grouping of bacteria – molecular methods (T-RFLP)*

Forvarnir í Fiskeldi

**B-hluti: Flokkun örvera, tilraunir með notkun
bætibaktería og próteinmengjagreiningar**

EFNISYFIRLIT

1. INNGANGUR	1
2. AÐFERÐIR OG FRAMKVÆMD.	7
2.1. TILRAUNIR Í LÚÐUELDI FISKEY EHF.	7
2.2. RÆKTUN OG ÁKVÖRDUN Á FJÖLDA RÆKTANLEGRA BAKTERÍA	12
2.3. GREINING OG FLOKKUN RÆKTANLEGRAR BAKTERÍUFLÓRU	13
2.4. MYNSTUR HEILDARFLÓRU GREINT MEÐ SAMEINDAFRÆDILEGUM AÐFERÐUM.	13
2.5. RÆKTUN BAKTERÍA ÚR BÆTIBAKTERÍUBLÖNDU	14
2.6. TILRAUNIR Á FYRSTU STIGUM ÞORSKELDIS.	14
2.6.1. Próteinútdráttur.....	18
2.6.2. Greining próteina með tvívíðum rafdrætti	18
2.6.3. Greining mynda af 2D þorsklirfu próteinprófilum.....	20
2.6.4. Kennigreining próteina.....	20
3. NIÐURSTÖÐUR OG UMFJÖLLUN	22
3.1. UPPSETNING OG ÞRÓUN SAMEINDAFRÆDILEGRA AÐFERÐA.	22
3.2. RANNSÓKNIR Á FYRSTU STIGUM LÚÐUELDIS.	24
3.2.1 Ræktanleg flóra og greining á mynstri heildarflóru við hefðbundna meðhöndlun.....	24
3.2.2. Meðhöndlun með bætibakteríum	30
3.3. MEÐHÖNDLUN MEÐ BÆTIBAKTERÍUM Á FYRSTU STIGUM ÞORSKELDIS.	39
3.3.1. Vöxtur og lifun lirfa	39
3.3.2. Fjöldi ræktanlegra baktería.....	41
3.3.3. Tjáning trypsins í þorsklirfum.....	42
3.3.3.1. Próteinmengjagreining á einangruðu þorskatrypsíni.....	42
3.3.3.2. Próteinmengjagreining á þorsklirfum meðhöndluðum með bætibakteríum	43
4. ÁLYKTANIR OG LOKAORÐ.	48
UPPSETNING OG ÞRÓUN SAMEINDAFRÆDILEGRA AÐFERÐA	48
TILRAUNIR Á FYRSTU STIGUM LÚÐUELDIS:	48
TILRAUNIR Á FYRSTU STIGUM ÞORSKELDIS:	50
5. KOSTNAÐUR	51
6. ÞAKKARORÐ	51
7. HEIMILDIR	52

1. INNGANGUR

Á liðnum árum hefur eldi sjávarfiska færst mikið í vöxt. Lúða er á meðal þeirra stofna sem eru ofnýttir og mikil eftirspurn er eftir en lítið framboð, en með vaxandi eldi er hægt að bjóða upp á stöðugt framboð og vöru sem er jöfn að gæðum. Áhugi fyrir þorskeldi fer einnig mjög vaxandi við norðanvert Atlantshaf og búast má við að eldi á þorski muni aukast mjög á næstu árum (Árnason *et al.* 2004). Mikil afföll verða á fyrstu stigum sjávarfiskeldis og tengjast þau m.a. örverufræðilegu álagi í eldisumhverfi lirfa (Olafsen *et al.* 2001). Það er því samdóma álit þeirra er standa að eldi sjávarfiska að örveruflóra og vandamál tengd örverufræðilegu álagi á fyrstu stigum eldisins sé eitt af helstu áhersluatriðum sem rannsaka þurfi og ráða bót á til að auka hagkvæmni eldisins. Ýmsar leiðir hafa verið reyndar til að koma í veg fyrir mikið bakteríuálag í eldisumhverfinu:

- Umgengni og aðferðir í eldinu þurfa að vera samkvæmt ákveðnu verklagi og með það að markmiði að lágmarka bakteríuvöxt (verkefni á vegum Rf/HA og Fiskey ehf., ”Stýring örveruflóru í startfóðurkerjum lúðulirfa”, sem styrkt var af Rannís 2001-2003).
- Halda bakteríufjölda í skefjum með geislun eldisvökva, meðhöndlun með útfjólubláu ljósi, ozone, efnum eða með öðrum leiðum - t.d. með lífvirkum efnum (bakteríudrepani og/eða hamlandi virkni)
- Efla mótstöðuafli lirfa sem ekki hafa þróað sérhæfða ónæmissvörun á þessu stigi - t.d. með lífvirkum efnum (ónæmisörvandi virkni).
- Styðja við vöxt æskilegrar bakteríuflóru á kostnað óæskilegrar - t.d. með lífvirkum efnum (prebiotik virkni).
- Breyta/stýra samsetningu flóru með því að bæta ”góðum” bakteríum (probiotic bacteria) í umhverfi eða fóðurdyr lirfa á þessum fyrstu stigum eldisins.

Lögð hefur verið áhersla á að fækka bakteríum og mikill áhugi er fyrir að geta stýrt eða breytt samsetningu bakteríuflóru til að auka stöðugleika í eldinu og bæta afkomu lirfa. Fiskey ehf. hefur undanfarin ár verið stærsti einstaki framleiðandi lúðuseiða í heiminum og framleiddi fyrirtækið á síðasta ári um 450 þúsund lúðuseiði. Stefna fyrirtækisins er að framleiða yfir 1 milljón seiða árið 2008. Margra ára rannsóknir í samstarfi Fiskey og Rf/HA liggja að baki og unnt hefur reynst að minnka verulega lífrænt álag (bakteríuvöxt) á fyrstu stigum fóðrunar. Meðaltals afkoma lúðulirfa úr startfóðrun

hefur aukist úr um 60% í um 80% á síðustu árum og mun meiri stöðugleiki er í framleiðslunni samanborið við áður. Megin áhersla hefur verið lögð á fyrstu stig fóðrunar en niðurstöður fyrri rannsókna hafa jafnframt bent til þess að lirfur séu afar misjafnar af gæðum þegar í startfóðrun kemur. Ýmislegt bendir því til að fjöldi baktería og samsetning flórunnar hafi víðtækari áhrif á gæði kviðpokalirfa en áður er þekkt. Fyrri rannsóknir gáfu einnig vísbendingar um að meðhöndlun hrogna og kviðpokalirfa með þeirri blöndu bætibaktería sem notuð var í verkefninu, leiddi til töluverðrar fækkunar gapara (um 10%). Gaparar eru kviðpokalirfur þar sem kjafturinn læsist í opinni stöðu og geta lirfurnar því ekki tekið til sín fóður og drepast fljótlega eftir að næringarinnihald kviðpoka er uppuríð og startfóðrun hefst. Fjöldi gapara hefur því umtalsverð áhrif á heildarframleiðslu lúðuseiða.

Rannsóknir á lirfum sjávarfiska hafa sýnt að fyrstu vikurnar eftir klak einkennast af hárrí dánartíðni og hægum vexti (Blaxter, 1988). Í þorsklirfueldi hérlendis er heildarlifun frá klaki til loka frumfóðrunar einungis í kringum 10% (Steinarsson *et al.* 2004). Margvíslegar ástæður liggja að baki þessum miklu afföllum sem meðal annars má rekja til óhagstæðrar bakteríuflóru í eldiskerfi lirfanna svo og meltingargetu lirfa (Brown *et al.* 2003) en meltingargeta er háð magni og virkni trypsína. Nýlegar rannsóknir sýna að trypsínvirkni er breytileg á fósturstigi þorsks en er í lágmarki við upphaf fæðunáms (Sveinsdóttir *et al.* 2006).

Við upphaf fæðunáms er meltingarvegur lirfa sjávarfiska fremur óþroskaður auk þess sem sérhæfð ónæmissvörun hefur enn ekki náð þroska. Rannsóknir á lirfum sjávarfiska hafa sýnt að unnt er að auðvelda þeim meltingu próteina með fóðri sem örvar seyti og virkni trypsíns í frumfóðrun (Péres *et al.* 1998). Með því að auðvelda lirfunum meltingu fæðu, má því stuðla að aukinni lifun í lirfueldinu (Rojas-García *et al.* 2002). Þekking á fóðri fyrir þorsk er mjög takmörkuð og mikið skortir á um rannsóknir á næringar- og fóðurþörf tegundarinnar (Árnason. 2004). Rannsóknir eins og framkvæmdar voru í þessu verkefni eru því nauðsynlegar bæði hvað þróun fóðurs varðar sem og þróun aðferða við lirfueldið sjálft. Slíkar rannsóknir munu til lengri tíma litið geta átt þátt í að bæta afkomu lirfa í sjávarfiskeldi (Rojas-García *et al.* 2002).

Hjóldýr henta vel sem fyrsta fæða þorsklirfa. Ýmsar tegundur hjóldýra finnast en tvær þeirra hvað mest notaðar í fiskeldi (Steinarsson 2004. Moretti *et al.* 1999. Olsen *et al.* 2004). Dvalaregg hjóldýra er unnt að geyma árum saman í frysti og þola þau vel sóttþreinsun til að forðast örverur sem gætu fylgt þeim (Balompapung *et al.* 1997). Hjóldýr eru fæðusíarar og nærast á ögnum sem eru allt að 30 μm að stærð. Dýrin eru í sjálfu sér tiltölulega næringarsnauð og því eru oft notuð sérstök auðgunarefni til þess að auka næringargildi þeirra. Hjóldýr er auðvelt að auðga með fitusýrum þar sem líkja má eftir samsetningu dýrasvifs. Auðgun með þörungum hefur aðallega verið stunduð í Japan en hefur orðið algengari á síðustu árum í Evrópu með tilkomu þörungabykknis sem sparar mikla vinnu í eldisstöðvunum (Lubzens *et al.* 1995). Með þörungagjöf er hægt að auka magn aminosýra í hjóldýrunum (Aragao *et al.* 2004). Hjóldýrin þarf einnig að auðga með vítamínum eða efnum sem þau geta breytt í vítamín (Rønnestad *et al.* 1998. Merchie *et al.* 1997; Lavens *et al.* 1998). Þörungar eru yfirleitt vítamínríkir en flest tilbúin auðgunarefni innihalda viðbætt vítamín. Til viðbótar má nefna auðgun með lífefnum (ensímum og peptíðum) og bakteríum en þær tilraunir eru enn á byrjunarstigi (Steinarsson, 2004).

Lúðulirfur eru fódraðar á saltvatnsrækju (*Artemia*) fyrstu vikurnar eftir að þær byrja að taka til sín fóður. Þetta eru frumstæð krabbadýr sem bæði geta fætt lifandi lirfur og gotið hrognum (Steinarsson 2004, Dhert *et al.* 2001). Fiskey ehf. kaupir hrogn frá Aquafauna-BioMarine, klekur þeim og notar sem startfóður fyrir lúðulirfur. Til að auka hreinlæti í eldinu eru fóðurdýrin afskurnuð fyrir klak í fersku léttsöltu vatni með klórlausn og síðan klakin við 25-30°C, súrefnismagni ekki undir 2 mg/L, seltu á bilinu 5-35 g/L, sýrustigi á bilinu pH 7,8-8,2 og við stöðuga lýsingu (2000 lux) og tekur klakið um 24 klst. Fóðurdýrin eru ósérvirkar síuætur og er því auðvelt að nota þau til að bera hentug næringarefni handa lirfum. Fisklirfur þurfa á nauðsynlegum næringarefnum að halda sem fóðurdýrin innihalda ekki, eru þetta sérstaklega omega-3 fitusýrur þ.e. eikósapentaensýra (EPA-20:5n=3) og dókósaheksaensýra (DHA-22:6n=3) (Lavens *et al.* 1996). Til að bæta gæði, vöxt og lifun fisklirfa eru fóðurdýrin auðguð með sérstakri fitublöndu í 24 eða 32 klst. og í framhaldi af því skoluð og gefin í startfóðurker. Fóðurdýrunum fylgir mikill fjöldi baktería og getur þetta lífræna álag reynst lirfunum ofviða ef ekkert er að gert (Rf skýrsla #21-03 2003 Stýring örveruflóru í startfóðurkerjum

lúðulirfa). Mikilvægt er að skapa ákjósanlegt umhverfi fyrir lirfur með jákvæðri bakteríuflóru svipað og hægt er að hafa áhrif á aðra þætti eldisins (fitusamsetning fódurdýra, skygging umhverfisins án notkunar þörunga o.s.frv.). Möguleiki á að stýra örveruflóru í umhverfi og meltingarvegi tegunda í eldi, er því tvímælalaust með ákjósanlegri valkostum og er að vonum mikill áhugi fyrir þeirri lausn í eldi sjávarfiska.

Markmið rannsókna á örverum í stríðeldi lúðulirfa er að leita leiða til að stjórna fjölda og samsetningu flórunnar og getur afkoma lirfa í startfóðrun orðið yfir 90% ef vel tekst til. Mögulegt er að stjórna samsetningu bakteríuflóru með því að bæta út í umhverfið bakteríum sem ná þar fótfestu og skapa þannig umhverfi sem er hagstætt fyrir lirfurnar (Macey *et al.* 2005). Leitast er við að halda örverufjölda í skefjum með ýmsum leiðum en notkun bætibaktería (probiotic bacteria) er tvímælalaust með ákjósanlegri valkostum. Bætibakteríur hafa almennt verið skilgreindar sem “lifandi bakteríur sem hafa jákvæð áhrif á einstaklinginn með því að bæta örverufræðilegt jafnvægi í meltingarvegi hans” (Gatesoupe 1999). Við samsetningu blanda bætibaktería fyrir fisk, hefur gjarnan verið stuðst við þá þekkingu sem unnist hefur við rannsóknir á bætibakteríum fyrir menn og dýr. Þannig var megin uppistaða fyrstu blanda bætibaktería sem komu á markaðinn fyrir fisk gjarnan mjólkursýrubakteríur en í framhaldi af því einnig bakteríur sem reyndust hamla vexti ríkjandi baktería í eldinu svo og bakteríur sem eru náttúrulegar í umhverfi sjávar (*Vibrio*, *Bacillus*, *Pseudomonas* o.fl.) (Makridis *et al.* 2000). Bætibakteríur hafa í mörgum tilfellum reynst vel við að auka vöxt og gæði fisklirfa með því að hindra að sjúkdómsvaldandi bakteríur nái yfirhöndinni og jafnvel með því að auka ónæmissvörun lirfa (Ottesen *et al.* 2000). Bætibakteríur fyrir fisk hafa fyrst og fremst verið framleiddar með notkun í eldi hlýsjávartegunda í huga en nokkrar blöndur sem fengist hafa á almennum markaði hafa verið reyndar á fyrstu stigum lúðueldis hjá Fiskey ehf. (Verkefnið: “Stýring örveruflóru í startfóðurkerjum lúðulirfa 2001-2003). Rannsóknir þessar sýndu m.a. að tegundir sem sagðar voru í blöndunum ræktuðust hvorki úr eldisumhverfi né meltingarvegi lirfanna og því ólíklegt að þessar tegundir hafi lifað af eða náð fótfestu í eldinu við umhverfishitastig (4-11°C) og aðstæður þar.

Síðastliðin ár hefur fengist á markaðinum blanda bætibaktería sem hönnuð er fyrir eldi fódurdýra kaldsjávartegunda fiska (REMUS® frá Avecom, Belgíu). Í fyrstu var engar upplýsingar að fá um innihald blöndunnar aðrar en ráðlagður notkunarstyrkur en þegar fram liðu stundir (2005) var gefið upp að um væri að ræða blöndu bætibaktería

fyrir eldiskerfi. Blandan væri samsett úr mismunandi bakteríustofnum sem einangraðir höfðu verið úr eldisvökva við ræktun fæðudýra (*Artemia* and rotifer). Einnig er tekið fram að megin stofnar í blöndunni séu *Aeromonas schubertii*, *Paracoccus denitrificans*, *Phenylobacterium* sp. og *Gluconobacter* sp. svo og að þessir stofnar séu “beneficial symbionts”. Niðurstöður fyrri rannsókna sýndu að meðhöndlun með blöndunni á ákveðnum stigum eldisins gaf aukið hlutfall lirfa sem þroskuðust eðlilega á kviðpokastigi (lækkun á hlutfalli gapara) auk þess sem ekki virtist nauðsynlegt að meðhöndla lirlur jafn oft til að minnka afföll þegar í startfóðrun kom. Áhrif meðhöndlunar kviðpokalirfa og áframhaldandi meðhöndlun lirfa í startfóðrun virtist þó ekki skila árangri þegar í startfóðrun var komið, þar sem vöxtur og myndbreyting lirfa voru jafnvel lakari en í viðmiðunarkerjum. Ýmsir þættir hafa áhrif á myndbreytingu flatfiska og hafa rannsóknir sýnt að í fæðunni eru það m.a. fitusýrur, A vítamín svo og thyroid hormón, og hefur lakari myndbreyting verið sett í samband við skort á þessum efnum (Hamre *et al.* 2005). Niðurstöður fyrri rannsókna á fyrstu stigum lúðueldis gefa því vísbendingar um að meðhöndlun með REMUS® blöndunni geti haft neikvæð áhrif á getu lirfa til að nýta næringarefni úr fæðunni og því valdið lakari myndbreytingu. Jákvæð áhrif meðhöndlunar á hlutfall vanskapaðra lirfa á kviðpokastigi (gapara) þóttu þó áhugaverð og áhugi fyrir því að rannsaka nánar áhrif REMUS® á fyrstu stigum lúðueldis og einnig þorskeldis.

Til þess að fá sem marktækastar niðurstöður voru í verkefninu framkvæmdar endurteknar tilraunir og meðhöndlað í eins miklum fjölda eldiseininga í lúðueldi Fiskey ehf. og mögulegt var, auk þess sem ávallt voru hafðar ómeðhöndlaðar viðmiðunareiningar til samanburðar. Meðhöndlað var með REMUS® í samtals 17 eldiseiningum á hrognastigi, 4 á kviðpokastigi og 4 eldiseiningum lirfa í startfóðrun, og sýni tekin á mismunandi tímapiunktum í hverri eldiseiningu. Til viðmiðunar voru á sömu tímapiunktum tekin sýni úr samtals 16 eldiseiningum á hrognastigi, 4 á kviðpokastigi og 8 eldiseiningum lirfa í startfóðrun þar sem meðhöndlað var með hefðbundnum hætti. Samtals var því safnað um 192 sýnum úr hrognum, lirlum og eldisvökva þeirra, auk 25 sýna af fóðurdýrum sem meðhöndluð voru með bætibakteríum og 189 viðmiðunarsýnum af fóðurdýrum. Alls var því safnað 244 sýnum til rannsókna á bakteríuflóru á mismunandi tímum í eldi lúðulirfa auk sýnatöku úr 10 hrognakerjum og 8 lirlukerjum fyrstu fjórar vikurnar eftir klak þorsklirfa. Ræktanleg bakteríuflóra var flokkuð til ætta

og ættkvísla mtt. lífefnafræðilegra eiginleika auk þess sem þróuð var ný aðferð til greiningar á mynstri heildarflóru baktería. Aðferðin byggir á mögnun á vel varðveittu svæði erfðaefnis baktería, 16S rRNA, og notkun skerðiensíma til aðgreiningar á mismunandi tegundum bakteríustofna (T-RFLP aðferð). Rannsóknir sýna að margar tegundir baktería úr köldu og næringarsnauðu umhverfi reynast oft á tíðum óræktanlegar á næringarætum við kjörhitastig í rannsóknastofunni (“viable but non-culturable”) (Verner-Jeffreys *et al.* 2003) og var því lögð áhersla á að nota sameindafræðilegar aðferðir til samanburðar við ræktanlega bakteríuflóru eldisins.

Markmið verkefnisins í heild sinni var að stuðla að aukinni afkomu lúðu- og þorsklirfa úr startfóðrun með notkun bætibaktería og notuð var blandan REMUS® frá Avecom, Belgíu. Undirmerkið verkefnisins voru eftirfarandi:

- að meðhöndla með valinni blöndu bætibaktería í því markmiði að stýra samsetningu bakteríuflóru í lúðueldi, allt frá upphafi hrognastigs til loka startfóðrunar. Lögð var megin áhersla á að rannsaka hvar í eldisferli lúðu og hve oft nauðsynlegt væri að meðhöndla lifur í gegnum eldisumhverfi þeirra og/eða fóðurdýr til þess að viðhalda jákvæðri flóru í meltingarvegi eða eldisumhverfi lifra. Einnig voru rannsökuð áhrif blöndunnar á fjölda baktería svo og vöxt og lifun lifra á fyrstu stigum þorskeldis.
- að leitast við að skapa nýja þekkingu á áhrifum bætibaktería á tjáningu trypsína sem og almenna próteintjáningu á fyrstu stigum þroskunar þorsklirfa í eldi með hjálp próteinmengjagreiningar (*proteome analysis*). Ekki er vitað til að áður hafi verið framkvæmd próteinmengjagreining á þorsklirfum og er því um að ræða nýja nálgun á rannsóknum á áhrifum umhverfisþátta í þorsklirfueldi. Upplýsingarnar sem fást úr verkefninu verða nýttar við leit að lífmerkjum til að meta meltingargetu sem og almennt ástand lifra í eldi. Einnig verður unnt að leggja þessar upplýsingar til grundvallar við þróun á fóðri sem og almennri eldistækni sem miða að bættu ástandi og aukinni lifun lifra í elda.
- að rannsaka samsetningu og eiginleika tiltekinnar blöndu bætibaktería. Bakteríusamsetning blöndunnar var rannsökuð við mismunandi umhverfisaðstæður (líftími og vöxtur baktería við mismunandi hitastig, pH, seltu,

næringarefni osfrv) og jafnframt hvort og við hvaða aðstæður tegundir úr blöndunni næðu fótfestu í meltingarvegi og/eða eldisumhverfi lirfa.

- að leggja grunn að þróun nýrrar blöndu bætibaktería af þekktri samsetningu og sem hentar sem markviss forvörn í lúðu- eða þorskeldi við íslenskar aðstæður (lágt umhverfishitastig). Byggt verður áfram á þessari þekkingu í nýju verkefni: “Bætibakteríur í lúðueldi” sem styrkt hefur verið af Tækniþróunarsjóði (2006-2008).

Mikilvægi þess að auka afkomu lirfa sjávartegunda í eldi er ótvírætt. Þorskeldi er ört vaxandi atvinnugrein og lúða er í sérstökum verðflokki sem hágæðaafurð og er hvert seiði því afar dýrmætt. Verkefnið hefur skilað margþættum árangri og varpað skýrara ljósi á það vandamál sem bakteríufjöldi og samsetning bakteríuflóru virðist vera á fyrstu stigum eldis sjávartegunda fiska. Verkefnið hefur því stuðlað að aukinni hagkvæmni í eldi sjávarfiska á Íslandi en mikil afföll fylgja iðulega fyrstu stigum þessa eldis. Umhverfishitastig er lágt hér við land og vaxtartími því hlutfallslega lengri samanborið við nágrannaþjóðir okkar og samkeppnisaðila um eldi sjávartegunda fiska. Mikilvægi þess að auka vöxt og afkomu á þessum fyrstu stigum eldisins er því ótvírætt auk. Góðar líkur eru taldar á að unnt verði að yfirfæra þá þekkingu sem þegar hefur aflast á fyrstu stigum lúðueldis yfir í eldi á þorski og öðrum sjávarfiskum á Íslandi og stuðst var við niðurstöður tilrauna í lúðueldi Fiskey ehf. við skipulag og uppsetningu tilrauna á fyrstu stigum þorskeldis. Markmið þessara tilrauna var að rannsaka hvort meðhöndlun með tiltekinni blöndu bætibaktería (REMUS®) leiddi til aukinnar lifunar þorsklirfa á fyrstu stigum eldisins auk þess sem rannsökuð voru áhrif meðhöndlunar á tjáningu trypsíns svo og fjölda ræktanlegra baktería í meltingarvegi og eldisumhverfi þorskhrogna og lirfa fyrstu vikunnar eftir klak.

2. AÐFERÐIR OG FRAMKVÆMD

2.1. Tilraunir í lúðueldi Fiskey ehf.

Meginmarkmið þessara tilrauna var að kortleggja þá bakteríuflóru sem er til staðar á fyrstu stigum lúðueldis, bæði við hefðbundna meðhöndlun í eldinu svo og úr tilraunum til að stýra fjölda og samsetningu bakteríuflórunnar við meðhöndlun með bætibakteríum í því markmiði að gera bakteríuflóru hagkvæmari fyrir lúðulirfur á fyrstu stigum eldisins.

Tilraunir í lúðueldi voru framkvæmdar í seiðaeldisstöð Fiskey ehf. á Hjalteyri við Eyjafjörð. Til að fá sem marktækastar niðurstöður á áhrifum meðhöndlunar í eldinu, var lögð áhersla á að endurtaka tilraunir auk þess sem sýni voru tekin úr fjölda eldiseininga og yfir allt eldistímabilið (hrogn, kviðpokalirfur, lirfur í startfóðrun og fóðurdýr). Tilraunir voru settar upp með hliðsjón af hefðbundnu eldisferli Fiskey ehf. Hrogn eru höfð í hrognakerjum í 14 daga og síðan safnað úr 5-8 kerjum í eitt síló þar sem kviðpokalirfur lifa á innihaldi kviðpokans næstu u.þ.b.50 dagana. Þegar startfóðrun hefst er lirfum úr hverju síló skipt í 1-3 startker þar sem byrjað er að fóðra þær með fóðurdýrum frá fyrsta degi. Fóðurdýr eru klakin og þau síðan ræktuð í eldisrými Fiskeyjar og auðguð með sérstakri fitublöndu í 24 klst. (morgungjöf) eða 32 klst. (seinnipartsgjöf) og í framhaldi af því skoluð og gefin í startfóðurker. Við meðhöndlun er bætibakteríuunum bætt út í eldisumhverfi lirfa 3-10 sinnum á hverju stigi eldisins og sýni tekin til bakteríurannsókna, að lágmarki í upphafi, á miðju og við lok hvers stigs (3-6 sinnum á hverju stigi eldisins). Til samanburðar voru ávallt tekin sýni úr jafn mörgum eða fleiri einingum þar sem meðhöndlað var með hefðbundnum hætti (viðmið). Einnig voru rannsökuð áhrif meðhöndlunar á fóðurdýrum lirfa í startfóðrun (*Artemia*) og lirfur fóðraðar með ómeðhöndluðum fóðurdýrum til samanburðar.

Notuð var blanda bætibaktería sem fæst keypt á almennum markaði (REMUS®) og í tilraunum yfirleitt stuðst við leiðbeiningar frá framleiðanda, þ.e. notað eitt gramm af blöndu (dufti) í hverja 25L af sjó nema annað sé tekið fram (t.d. við meðhöndlun fóðurdýra). Duftið var leyst upp í 5-10L af sjó, hrært vel í og blandan látin standa í lágmark eina klukkustund áður en henni er bætt út í eldiseiningar. Við meðhöndlun lirfa í startfóðrun var meðhöndlað í gegnum eldisvökva auk þess sem fóðurdýr voru notuð til að bera bætibakteríur í lirfur. Ef sýnataka var sama dag og meðhöndlað var með bætibakteríublöndu, voru sýni tekin áður en blandan var sett út í eldiseininguna. Uppsetning og framkvæmd tilrauna var í höndum starfsmanna Fiskey ehf. sem einnig sáu um skráningu affalla, mat á vexti og afkomu hroгна og lirfa svo og á hlutfalli vanskapaðra lirfa.

Tilraunauppsetningar:

Meðhöndlun með bætibakteríum á hrognastigi, kviðpokastigi og í startfóðrun (PPP).

Tilraunir voru framkvæmdar í endurtekningu, þ.e. tilraun A og B (framkvæmdar 2004

og 2005). Í tilraun A var meðhöndlað með bætibakteríum í 5 hrognakerjum með 6 viðmiðunarker, 1 síló með 1 til viðmiðunar og 1 startkeri með 1 til viðmiðunar. Í tilraun B var meðhöndlað með bætibakteríum í 6 hrognakerjum með 4 til viðmiðunar, 1 síló með 1 til viðmiðunar og 1 startkeri með 1 til viðmiðunar. Uppsetning tilrauna A og B var í megindráttum sú sama að því undanskildu að í tilraun A voru lirfur í startfóðrun meðhöndlaðar oftari (10 meðhöndlanir samanborið við 7 meðhöndlanir í tilraun B). Sýni voru tekin úr eldiseiningum á fyrirfram ákveðnum dögum þ.e. á sömu dögum eftir frjóvgun og klak hroga í öllum eldiseiningum. Sýni voru tekin af hrognum og lirfum svo og eldisvökva þeirra (sjá töflu 1). Þessar tilraunir voru hluti af rannsóknatengdu meistaranámi Hildigunnar Rutar Jónsdóttur við Auðlindadeild HA 2006.

Tafla 1. Uppsetning tilrauna A og B (n = fjöldi eldiseininga þar sem meðhöndlað var með bætibakteríum / viðmiðunareiningar).

Tilraun A

Hrognaker (n=5/6)		Kviðpokalirfur (n=1/1)		Startker (n=1/1)	
REMUS meðhöndlun (dagar frá fyrsta degi í ker)	Sýnataka (dagar frá fyrsta degi í ker)	REMUS meðhöndlun (dagar frá fyrsta degi í ker)	Sýnataka (dagar frá fyrsta degi í ker)	REMUS meðhöndlun (dagar frá fyrsta degi í ker)	Sýnataka (dagar frá fyrsta degi í ker)
0	1	0	1	0	1
7	7	3	3	1	7
14	14	15	15	2	14
		30	30	4	21
		50	50	5	28
				7	37
				14	
				21	
				28	
				35	

Tilraun B

Hrognaker (n=6/4)		Kviðpokalirfur (n=1/1)		Startker (n=1/1)	
REMUS meðhöndlun (dagar frá fyrsta degi í ker)	Sýnataka (dagar frá fyrsta degi í ker)	REMUS meðhöndlun (dagar frá fyrsta degi í ker)	Sýnataka (dagar frá fyrsta degi í ker)	REMUS meðhöndlun (dagar frá fyrsta degi í ker)	Sýnataka (dagar frá fyrsta degi í ker)
0	1	0	8	0	1
7	7	3	16	3	7
14	14	15	29	7	22
		30	49	14	27
		49		21	36
				27	44
				35	

Meðhöndlað með bætibakteríum á mismunandi stigum eldisins (2005). Endurtekning fyrri tilrauna þar sem ýmist var meðhöndlað með bætibakteríum á öllum eða ákveðnum stigum eldisins. Hefðbundin meðhöndlun var höfð sem viðmið í öllum meðhöndlunum;

- PPP: Meðhöndlun með REMUS® á öllum stigum eldisins; hrognastigi, kviðpokastigi og í startfóðrun. Meðhöndlað var í 6 hrognakerjum, einu síló og 1 startkeri.
- PPK: Meðhöndlun með REMUS® á hrognastigi og kviðpokastigi. Meðhöndlað var í 6 hrognakerjum og einu síló og lirfur síðan fluttar í 1 ómeðhöndlað startker.
- KPK: Meðhöndlun með REMUS® á kviðpokastigi. Safnað var hrognum úr 7 ómeðhöndluðum hrognakerjum í 1 síló þar sem meðhöndlað var með REMUS® og lirfur síðan fluttar í 1 startker þar sem ekki var meðhöndlað með REMUS®.
- KPP: Meðhöndlun með REMUS® á kviðpokastigi og í startfóðrun. Safnað var hrognum úr 7 ómeðhöndluðum hrognakerjum í 1 síló þar sem meðhöndlað var með REMUS® og lirfur síðan fluttar í 1 startker þar sem einnig var meðhöndlað með REMUS®.
- KKK: Hefðbundin meðhöndlun á öllum stigum eldisins (viðmið). Til viðmiðunar voru höfð samtals 18 hrognaker, 2 síló og 6 startker.

Yfirlit yfir fyrirkomulag þessara tilrauna er sýnt í töflu 2, þar sem sést er á hvaða dögum meðhöndlað var með bætibakteríum og hvenær sýni voru tekin til rannsókna á bakteríuflóru.

Tafla 2. Uppsetning tilrauna á seinna verkefnisári (2005-2006). Tilgreindir eru dagar þar sem meðhöndlað var í eldiseiningum svo og hvenær sýnataka var framkvæmd. Sýni voru ávallt tekin fyrir meðhöndlun ef sýnataka var sama dag og meðhöndlað var með REMUS®.

Hrognaker		Kviðpokalirfur		Startker	
REMUS meðhöndlun (dagar frá fyrsta degi í ker)	Sýnataka (dagar frá fyrsta degi í ker)	REMUS meðhöndlun (dagar frá fyrsta degi í ker)	Sýnataka (dagar frá fyrsta degi í ker)	REMUS meðhöndlun (dagar frá fyrsta degi í ker)	Sýnataka (dagar frá fyrsta degi í ker)
0-2	0-2	0-2	0-2	1	1
6-8	6-8	7-10	7-10	7	7
13-14	13-14	26 -30	26 -30	14	14
		50 - 54	50 - 54	21	21
				28	28
				35	35

Meðhöndlað var með REMUS® í gegnum eldisumhverfi (eldisvökva) hroгна og lirfa svo og í gegnum fóðurdýr lirfa í startfóðrun. Á fyrra verkári (2004-2005) voru framkvæmdar tilraunir með auðgun fóðurdýra, bæði í klaki, 24 tíma ræktun og 32 tíma

ræktun auk þess sem rannsökuð voru áhrif mismunandi styrks bætibaktería (0,5g/25L, 2g/25L, 4g/25L og 8g/25L af REMUS® blöndu). Einnig voru rannsökuð áhrif þess að lengja þann tíma sem fôðurdýr voru auðguð með bætibakteríum en niðurstöður gáfu ekki vísbendingar um að það hefði áhrif á bakteríuflóru eða gæði fôðurdýra og því ekki fjallað nánar um þær niðurstöður hér (sjá meistararitgerð Hildigunnar Rutar Jónsdóttur við Auðlindadeild HA 2006).

Rannsóknir á áhrifum baðana á lúðulirfur í startfóðrun (2004). Lúðulirfur í startfóðrun eru meðhöndlaðar samkvæmt ákveðnu böðunarkerfi Fiskey ehf. sem var í notkun á þeim tíma sem rannsóknin var framkvæmd. Könnuð voru áhrif mismunandi styrks sótthreinsiefna á fjölda baktería og samsetningu flórunnar. Lúðulirfum var skipt í 6 startker og í tveimur þeirra baðað með hefðbundnum hætti (viðmið), í tveimur var baðað með hálfum styrk efna og í tveimur með hefðbundnum styrk en baðað sjaldnar en venja er. Niðurstöður þessa verkþáttar þóttu ekki skila neinum upplýsingum og verður því ekki fjallað nánar um þær niðurstöður hér (sjá meistararitgerð Hildigunnar Rutar Jónsdóttur við Auðlindadeild HA 2006).

Tilraunir á endurnýtingarkerfi á fyrstu stigum lúðueidis (2004). Tilraunir voru gerðar með endurnýtingarkerfi samhliða tilraun A. Hrognahópur úr ómeðhöndluðu hrognakeri var fluttur í síló þar sem eldisvökvi var endurnýttur og áfram í startker sem einnig var með endurnýtingarkerfi. Gerður var samanburður á efnaálagi í þessum eldiseiningum samanborið við í viðmiðunareiningum þar sem eldisvökvi var ekki endurnýttur. Rannsóknir á efnainnihaldi sýna voru framkvæmdar á rannsóknstofu Rf í Reykjavík og á Iðntæknistofnun. Nánari lýsingu á framkvæmd þessum tilraunum er að finna í meistararitgerð Hildigunnar Rutar Jónsdóttur, við Auðlindadeild HA 2006.

Samtals var safnað 92 sýnum úr eldiseiningum þar sem meðhöndlað var með bætibakteríum. Þessi sýni voru af hrognum úr 17 hrognakerjum (sýni tekin í upphafi, um mitt og í lok tímabilsins í hverju ker), 4 kviðpokasílóum (sýni tekin 4-5 sinnum á tímabilinu í hverju síló) og 4 startfóðrunarkerjum (sýni að jafnaði tekin 6 sinnum á tímabilinu í hverju ker), auk þess sem sýni voru tekin af eldisvökva í hverri eldiseiningu í tilraunum A og B. Til viðbótar var safnað samtals 100 sýnum af hrognum og lirfum úr

16 hrognakerjum, 4 sílóum og 8 startkerjum þar sem meðhöndlað var með hefðbundnum hætti (viðmiðunareiningar).

Jafnframt voru tekin sýni af fóðurdýrum sem meðhöndluð voru með bætibakteríum (samtals 25 sýni) svo og af fóðurdýrum sem meðhöndluð voru með hefðbundnum hætti og eldisvökva þeirra (samtals 189 sýni). Vegna mikils fjölda sýna og niðurstaða var valin sú leið í þessari skýrslu að gera samantekt á niðurstöðum bakteríurannsókna í eldiseiningum þar sem meðhöndlað var með bækibakteríum svo og í viðmiðunarsýnum sem við eiga hverju sinni.

2.2. Ræktun og ákvörðun á fjölda ræktanlegra baktería

Við sýnatökur úr eldiseiningum er nauðsynlegt að gæta fyllsta hreinlætis og að allur sýnatökubúnaður sé dauðhreinsaður. Sýni voru tekin í dauðhreinsuð ílát sem fyllt voru af eldisvökva og háfur síðan notaður til að veiða upp hrogn og lirfur. Sýni úr fóðurdýraræktum voru tekin eftir 24 og 32 tíma ræktanir, sýnin skoluð undir rennandi ferskvatni og vökvi látinn síga af áður en þau voru sett í dauðhreinsuð ílát. Sýni eru því næst sett í ísskáp eða á ís og þau flutt sem fyrst á rannsóknastofu Rf á Akureyri til ræktunar og ákvörðunar á fjölda og mynstri bakteríuflóru. Meðhöndla þarf sýni sem fyrst þar sem fyrri rannsóknir sýna að of langur tími frá sýnatöku getur haft áhrif á niðurstöður örverutalninga. Úrvinnsla sýna fór fram á rannsóknastofum Rf og HA að Borgum á Akureyri. Fjöldi lirfa í sýnum var ákvarðaður og yfirborð hroгна og lirfa síðan sótthreinsað (0,1% benzalkonium klóríð). Hrogn, lirfur og fóðurdýr eru því næst vegin yfir í dauðhreinsuð ílát, sýni þynnt tífalt í dauðhreinsuðu peptone-sjóvatni (0,1% peptone leyst í 70% sjóvatni) og lausnin því næst gerð einsleit í ULTRA THURAX tætara við blöndun í 3*10 sek með 10 sek hvíld á milli (8000 rpm). Útbúnar eru frekari þynningar sýnis í peptone-sjóvatni og sáð úr þeim á yfirborð MA (Marine Agar 2216, Difco) og TCBS (Thiosulphate Citrate Bile Sucrose agar, Difco) agarskála. Eldisvökva er safnað í dauðhreinsuð ílát, blandað kröftuglega fyrir sýnatöku og vökvinn síðan síaður í gegnum Whatman GF/A filtra (1,6 µm) til að fjarlægja allar agnir úr vökvanum en bakteríur fylgja með vökvanum í gegnum síuna. Tífoldar þynningar eru síðan gerðar á sýnum og sáð úr þynningum á agarskálar eins og áður er lýst. Allar skálar voru ræktaðar við 15°C í 7 daga og heildarfjöldi baktería ásamt áætluðum fjölda *Vibrio* baktería því næst ákvarðaður.

2.3. Greining og flokkun ræktanlegrar bakteríuflóru

Úr hverju sýni voru valdar MA skálar með 100-250 kólóníum/skál, tólf stofnar valdir af handahófi og umsáð yfir á nýjar MA skálar og ræktað áfram við 15°C þar til greinilegur vöxtur er kominn á skálar (2-7 dagar). Stofnar voru því næst flokkaðir til ætta, ættkvísla og/eða tegunda m.t.t. svörunar í KOH prófi, Gram litun, Cytochrome oxidasa, Katalasa, MOF prófi (oxun/gerjun), næmi fyrir O/129 Vibriostatic compound, vöxtur með og án NaCl svo og vöxtur með og án Novobiosine. Ræktanleg flóra var flokkuð í hópa m.t.t. svörunar í mismunandi prófum og um 12 stofnar úr hverjum hóp síðan flokkaðir nánar með API 50E staðfestingarprófi sem aðlagð er stofnum úr umhverfinu (próf framkvæmt við ræktun í 2-3 daga við stofuhita) og að lokum lesið af samkvæmt leiðbeiningum frá framleiðanda.

2.4. Mynstur heildarflóru greint með sameindafræðilegum aðferðum.

Sýni sem safnað var úr eldinu voru greind með sameindafræðilegum aðferðum og var það í höndum starfsmanns á Náttúrufræðistofnun Íslands – Akureyrarseturs, Viktors Mar Bonilla.

Í samvinnu við sérfræðinga hjá Rf var þróuð og sett upp aðferðin T-RFLP (terminal-restriction length polymorphismi). Sýni úr eldinu (1/10 þynning sýna) og hreinræktir af stofnum eru fryst við -80°C þar til greining er framkvæmd. DNA er einangrað úr sýnum með tveimur mismundandi aðferðum; phenol/chloroform aðferð sem tekur 2-3 daga eða með því að nota einangrunarpakka frá Qiagen (QIAprep Spin) og tekur sú aðferð einungis um einn til tvo tíma. Phenol/chloroform aðferðin var notuð til að byrja með en m.t.t. vinnusparnaðar var í framhaldinu ákveðið að nota einangrunarpakkann frá Qiagen. Hreinleiki sýnisins er metinn með því að rafdraga afurð á agarose geli í u.þ.b. 30 mín og lita síðan með „ethidium bromide“ til að gera böndin sýnileg. Rafdráttur á agarosa geli er framkvæmdur eftir hvert skref hreinsunarinnar, mögnunar og klippingar til að hægt sé að fylgjast með hreinleika sýna skref fyrir skref. Eftir einangrun DNA úr sýnum er það magnað upp með PCR þar sem notaðir eru þekktir flúrmerktir alhliða vísar (universal primers) sem eru hannaðir út frá geni sem rannsóknir sýna að varðveittst hefur í erfðamengi baktería (16S rRNA) (Aakra *et al.* 1999, Bernard *et al.* 2000). Í þessari rannsókn voru notaðir prímerar sem reynst hafa vel í öðrum

sambærilegum rannsóknum (9F (GAGTTTGATCCTGGCTCAG) og 1512R (TGCCGATGGAACAATGCTGAA)). PCR afurðin er því næst klippt með skerðiensími (HaeIII) og að lokum er sýnið greint í ABI310 örgreini. Hver tegund baktería gefur mislanga búta af DNA sem greinast í tækinu og koma þar fram sem mismunandi stórir toppar á grafi. Topparnir eru síðan greindir og bornir saman við staðal með sérstöku örgreiningarforriti.

Við þróun aðferðarinnar voru með þessari aðferð samtals greindir um 700 bakteríustofnar (phenol/chloroform aðferðin). Í framhaldi af því voru greindir um 400 hreinræktaðir bakteríustofnar úr eldinu (Quiagen aðferðin) auk 147 sýna af hrognum, kviðpokalirfum, liffum í startfóðrun og fódurdýrum þeirra. Þar af voru greind með aðferðinni 56 sýni af hrognum/lirfum/fódurdýrum sem meðhöndluð höfðu verið með REMUS® auk 91 sýnis úr einingum þar sem meðhöndlað var með hefðbundnum hætti (viðmið).

2.5. Ræktun baktería úr bætibakteríublöndu

Í rannsókninni var notuð blanda bætibaktería sem fæst keypt á almennum markaði en ekki reyndist unnt að fá upplýsingar um innihald hennar og því framkvæmdar tilraunir til að rækta upp bakteríustofna úr blöndunni á rannsóknastofunni. Framkvæmd tilraunanna fór fram á rannsóknastofu Rf á Akureyri. Mismunandi magn af blöndunni var leyst í dauðhreinsuðum sjó samkvæmt lýsingu frá framleiðanda og lausnirnar síðan ræktaðar við mismunandi hitastig (6 °C, 15 °C og 30°C). Sýni voru tekin á mismunandi tímupunktum og sáð á næringaræti (Marine Agar, Brain Heart Infusion agar) svo og á valin séræti til ræktunar á *Vibrio* bakteríum (Thiosulphate Citrate Bile Salts Sucrose agar (TCBS)), mjólkursýrubakteríum (nitrite actidione polymyxin agar (NAP)) (Halami *et al.* 1999) og gersveppum (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol) (DRBC)) (Difco Laboratories. 1998). Ræktað var á skálum við mismunandi hitastig (6 °C, 15 °C og 30°C) í allt að tvær vikur áður en fjöldi ræktanlegra baktería var ákvarðaður.

2.6. Tilraunir á fyrstu stigum þorskeldis.

Tilraunir voru framkvæmdar í eldisaðstöðu Hólaskóla á Sauðárkróki og í tilraunaaðstöðu Hafró að Stað við Grindavík á árunum 2004-2005, sem hluti af rannsóknatengdum verkefnum nemenda við Auðlindadeild HA. Í tilraunauppsætningu á

Sauðárkróki (haust 2004) var safni hrogna skipt í tvo hópa og deilt í 3 eldiseiningar hverjum. Annar hópurinn var meðhöndlaður með bætibakteríum í gegnum eldisvökva (0, 5, 8 og 12 dögum eftir frjóvgun) og niðurstöður bakteríutalninga og greininga bornar saman við ómeðhöndlaðan hóp (kontról). Sýni voru tekin af hrognum og eldisvökva þeirra á mismunandi tímapiptum (5, 8, 12 og 15 dögum eftir frjóvgun) auk þess sem afföll og vöxtur voru skráð. Nákvæmari lýsing á framkvæmd þessara tilrauna er að finna í meistarařitgerð Hildigunnar Rutar Jónsdóttur, við Auðlindadeild HA, 2006.

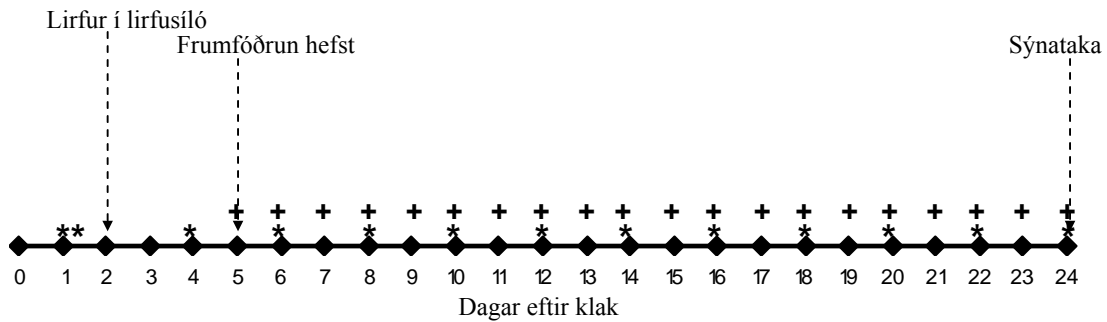
Í tilraunauppsetningu í tilraunaeldisstöð Hafró að Stað við Grindavík (vor 2005) var ýmist meðhöndlað með bætibakteríum frá upphafi hrognastigs (strax eftir fjóvgun hrogna), meðhöndlun hafin við klak hrogna og/eða meðhöndlað í gegnum fóðurdyr. Eldissjór hrogna var auðgaður með bætibakteríum (hópur B1), þ.e. við frjóvgun og á degi 7 og 11 eftir frjóvgun hrogna. Uppsetning hroгнаeldis er sýnt á mynd 1. Á Stað voru jafnframt rannsókuð áhrif meðhöndlunar með bætibakteríum á tjáningu trypsíns í þorsklirfum og eru þær tilraunir hluti af doktorsnámi Hólmfríðar Sveinsdóttur við Háskóla Íslands (sjá 3.4.).



Mynd 1. Uppsetning hroгнаeldis. Eldisvökvi (hópur B1) var auðgaður með bætibakteríum í styrkleikanum 0.1 g/l (**) og 0.04 g/l (*). Á hrognastigi var einungis meðhöndlað með bætibakteríum í hóp B1. Klak hófst í báðum hópunum (K og B1) á 11. degi eftir frjóvgun hrogna.

Þéttleiki var 4000 hrogn/l eldissjó, hitastigi var haldið um 7 °C, rennsli í ½ l/mín, væg loftun og ljósstyrkur 10 lux 16 klst á sólarhring. Dauð hrogn voru fjarlægð daglega úr silóum. Tveimur dögum eftir klak voru lirfur fluttar yfir í 150 l lirfusiló og viðmiðunarhóp (K-hóp) skipt í 3 hópa; K, B2 og B3 á meðan B1-hópnum var áfram haldið sér. Eldisvökvi var auðgaður með bætibakteríum daginn áður en lirfurnar voru færðar (hópar B2 og B3) og síðan annan hvern dag fram að lokum tilraunarinnar (24 degi

eftir klak). Þar fyrir utan fékk B3-hópur daglega hjóldýr í fyrstu fóðurgjöf dagsins sem auðguð höfðu verið með bætibakteríum. Mynd 2 sýnir uppsetningu lirfueldisins.



Mynd 2. Uppsetning lirfueldis. Eldisvökvi var auðgaður með bætibakteríum í styrkleikanum 0.1 g/l (**) og 0.04 g/l (*) auk þess sem í hópi B3 var í aðra hvora gjöf fóðrað með hjóldýrum sem auðguð höfðu verið með bætibakteríum (+). Á lirfustigi var einungis meðhöndlað með bætibakteríum í hópum B2 og B3. Frumfóðrun hófst í öllum hópum á fimmta degi eftir klak.

Eftir að frumfóðrun hófst voru lirfuhóparnir fóðraðir 3svar á dag með hjóldýrum (*Brachinous plicatilis*), sem auðguð voru með Protein Selco Plus auðgunarefni (Inve, Belgía) og 2svar á dag með þörungum. Þéttleiki var 7500 lirfur/150 l, hitastig 9 °C, væg loftun, vatnsrennsli 750 ml/mín og stöðug lýsing (300 lux) í 24 klst. á dag. Dauðar lirfur voru fjarlægðar úr sílóum daglega og fjöldi þeirra ákvarðaður. Í lok tilraunarinnar voru eftirlifandi lirfur taldar upp úr sílóum til að meta lifunina. Um 20 lirfur voru teknar úr hverju síló til ákvörðunar á þurrvigt (lirfur þurrkaðar við 75°C í þurrkofni í 48 klst og síðan vigtaðar). Sýni til próteinmengjagreininga voru tekin á degi 24 eftir klak og snöggfryst í fljótandi köfnunarefni. Sýnin voru geymd við –80°C fram að próteinútdrætti. Sýnataka fór fram 5 klst. eftir fyrstu fóðurgjöf dagsins.

Yfirlit yfir meðhöndlunir hópanna eru sýnt í töflu 3. Tvær endurtekingar voru fyrir hverja meðhöndlun.

Tafla 3. Meðhöndlun lirfuhópa með bætibakteríum (REMUS®).

Hópur	Hrognastig	Lirfustig
B1	Bætibakteríur	0
B2	0	Bætibakteríur
B3	0	Bætibakteríur og hjóldýr meðhöndluð með bætibakteríum ¹
K	0	0

(0) Ekki auðgað með bætibakteríum

(¹): Auk auðgunar eldisvökva með bætibakteríum voru lirfur í B3-hóp fóraðar í aðra (morgungjöf) af tveimur gjöfum dagsins með hjóldýrum sem auðguð höfðu verið með bætibakteríum.

Bætibakteríuauðgun á hrognastigi. Sama dag og hrognin komu í stöðina var rennsli tekið af og bætibakteríum bætt í eldisvökva hrognasílóa (0.1 g/l). Tveimur klst. síðar var hitastig stillt á 7 °C og hrognum bætt í sílóin og rennsli og loftun því næst sett á. Eftir að hrognin voru komin út í sílóin fór auðgunin þannig fram að fyrir fyrstu fódurgjöf dagsins var rennsli tekið af og 1.0 g af bætibakteríunum bætt út í sílóid (0.04 g/l). Þrjátíu mínútum síðar var rennsli sett aftur á og lirfurnar fódraðar.

Bætibakteríuauðgun á lirfustigi. Einum degi áður en kviðpokalirfur voru færðar í lirfusílóin var rennsli tekið af og bætibakteríum bætt í eldisvökva sílóa (0.1 g/l). Rennsli ekki sett aftur á fyrr en næsta dag. Sama dag og kviðpokalirfur voru færðar í lirfusílóin var hitastig stillt á 8 °C með því að hleypa 40% af eldisvökva úr síló og fylla aftur upp með 1 °C heitum sjó. Rennsli var tekið af og bætibakteríum bætt út í sílóid þannig að styrkleiki yrði aftur 0.1 g/l. Einni klst. síðar voru kviðpokalirfur færðar í sílóid og rennsli sett aftur á. Á lirfustiginu var rennsli tekið af og 6 g af bætibakteríum bætt í eldisvökva í sílóum annan hvern dag (0.04 g/l). Einni klst. síðar var rennsli sett aftur á. Auðgun hjóldýra fór þannig fram að eldisvökva var skolað af hjóldýrunum, 12 g bætibaktería blandað út í 1 l af hjóldýrum ($\frac{1}{2}$ milljón hjóldýr) og látið standa í 30 mín við herbergishita. Hjóldýrum ásamt bætibakteríunum var bætt í síló og rennsli tekið af í 1 klst.

2.6.1. Próteinútdráttur

Próteinútdráttur fyrir 2D (tvívíðan, *two dimensional*) rafdrátt var framkvæmdur með því að jafna lírfusýni (samsett sýni, ca 10 lírfur) í fjórföldu magni af frumurofsböffer (7M urea, 2M thiourea, 4% (w/v) CHAPS, 0.3% (w/v) DTT, 1% 4–7 IPG Buffer, 1% protease inhibitor cocktail (Sigma, St. Louis, MO, USA)). Við jöfnunina var notast við “*sample grinding kit*” frá GE Healthcare. Jafningurinn var spunnin við 11 500g í 10 mín og flotið (próteinextrakt) hirt. Próteinextraktið var geymt við -20 °C þar til frekari greiningar á því fóru fram.

2.6.2. Greining próteina með tvívíðum rafdrætti

Próteinin voru greind með 2D rafdrætti á annað hvort svokölluðum “small- (7 cm IPG gels)” eða “medium- (11 cm IPG gels) format” 2D geljum. Til ákvörðunar á próteinmagni sem hlaða skyldi á IPG (immobilised pH Gradient) ræmu var próteinlausn (einangrað þorskatrypsín eða þorsklirfu próteinextrakt) keyrt á 1D SDS-polyacrýlamíð geli og próteinin lituð með Colloidal Coomassie Blue G250 litun (Anderson *et al.* 1991). Magn próteinlausnar sem pípetterað var yfir á IPG ræmuna fór eftir magni litarins á 1D-prófilnum. Þorsklirfu prótein voru greind á “*medium-format*” 2D geljum og þurfti á bilinu 30 – 40 µL (samsvarar ca. 500 µg af próteini¹), en einangrað þorskatrypsín (11.25 U/mL) á “small-format” 2D geljum og þurfti 10 µL af því.

Einangrað þorskatrypsín í glýceróli (11.25 U/mL) var fengið frá Ensímtækni ehf. og greint með 2D rafdrætti á “small-format” 2D geli (Uwins *et al.* 2006). Tíu µL af trypsínblöndunni var blandað saman við 120 µL af IPG bólgunarböffer (reswell buffer) (7M urea, 2M thiourea, 4% (w/v) CHAPS, 0.3% (w/v) DTT, 1% 4–7 IPG Buffer (GE Healthcare)), látið standa við herbergishita í 10 mín og svo spunnið við 11 500g í 5 mín; 125 µL af flotinu var pípetterað á 7 cm IPG gel ræmu (GE Healthcare). IPG ræmurnar voru látnar draga í sig sýnið við herbergishita yfir nótt. Jafnhleðslustilling próteina (fyrsta vídd) var framkvæmd í Multiphor II rafdráttartæki frá GE Healthcare í þremur þrepum

¹ 13.50 ± 3.98 mg prótein/mL þorsklirfuextrakt. Meðalpróteinmagn ± staðalfrávik sem fengið var úr mælingum sem gerðar voru með Bradford aðferð (Bradford, 1976) á þorsklirfum 21 d.e.k. (n=3) og 28 d.e.k. (n=3).

með aflíðandi (ramped) spennubreytingu milli þrepa: 200 V í 1 mín, 3500 V í 90 mín, 3500 V í 65 mín (2 mA og 5 W var viðhaldið í öllum þrepunum). Áður en síðari vídd var framkvæmd voru ræmurnar með próteinunum jafnvægisstilltar (equilibrated), fyrst með 1% w/v DTT í 30 mín (afoxa súlfíðtengi) og síðan með 2.5% w/v joðacetamíði í 30 mín (til að losna við auka DTT). Lausnirnar voru báðar blandaðar með equilibration buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M urea, 30% v/v glycerol, 2% w/v SDS). Síðari vídd var gerð í 12% polyacrýlamíð geli (8×7 cm) og rafdregin við 75 V í 75 Vklst og síðan við 150 V í samtals 450 Vklst.

Þorsklirfu-próteinextraktið var greint með 2D rafdrætti á “medium-format” 2D geli (Uwins ofl. 2006). Þrjátíu - 40 µL af próteinextrakti var blandað saman við 170 - 180 µL af IPG bólgunarböffer, látið standa við herbergishita í 10 mín og svo spunnið við 11 500g í 5 mín; 200 µL af flotinu var píppetarað á 11 cm IPG gel ræmu (BioRad, Hemel Hempstead, UK). IPG ræmurnar voru látnar draga í sig sýnið við herbergishita yfir nótt. Jafnhleðslustilling próteinanna var framkvæmd í Multiphor II rafdráttartækinu í eftirfarandi þrepum með aflíðandi spennubreytingu milli þrepa: 200 V í 1 mín, 3500 V í 90 mín, 3500 V í 7 klst (2 mA og 5 W var viðhaldið í öllum þrepunum). Ræmurnar með próteinunum voru jafnvægisstilltar eins og lýst er að ofan og lagðar á 12% polyacrýlamíð geli (16×15 cm) og komið fyrir í BioRad Protean II tæki. Próteinin voru rafdregin við 100 V í 100 Vklst og síðan við 200 V í samtals 1300 Vklst. Colloidal Coomassie Blue G250 litun var notuð til að gera próteindeplana á geljunum sýnilega.

Jafnhleðslupunktur voru fundnir út frá pH hallandanum í IPG gelinu með hjálp upplýsinga frá framleiðenda. Mólþungi var ákvarðaður með því að rafdraga prótein með þekktum mólmössum með próteinsýnunum. Próteinin sem notuð voru eru: myosin (250000), phosphorylase B (148000), glutamic dehydrogenase (60000), carbonic anhydrase (42000), myoglobin-blue (30000), myoglobin-red (22000), lysozyme 17000), aprotinin (6000) og insulin (4000) (MultiMark® Multi-Colored Standard, Invitrogen).

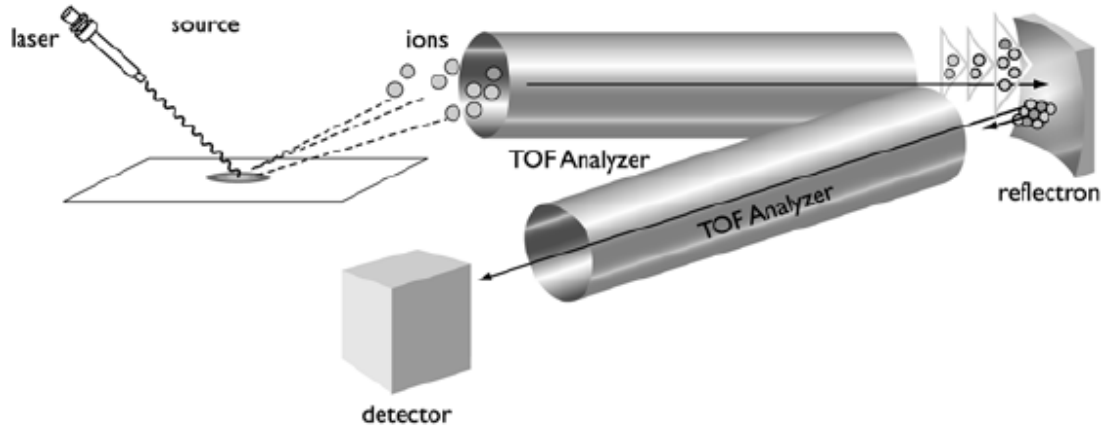
2.6.3. Greining mynda af 2D þorsklirfu próteinprófilum

2D gel með próteinprófilum af þorsklirfu próteinextröktum voru skönnuð með “*molecular dynamics personal densitometer*” (GE Healthcare) sem 12-bit myndir í upplausninni 50 μm . Greining myndanna var framkvæmd með Prognosis 2006 tölvuhugbúnaði (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK). Við greiningu próteindeplanna var notast við verkferla sem eru innbyggðir í hugbúnaðinn (*in-built software routines*) í bland við minniháttar handvirkar leiðréttingar (*minimal manual editing*). 2D próteinprófill frá sýni K_b var valin til að gera samanburðargel (*reference gel*) sem notað var til að staðsetja (*match*) próteindepla á restinni af geljunum í tilrauninni (B3a-d og Ka-c). Depilmagn var staðlað m.t.t. heildarprótín magns á geli “*normal volume*” og samanburður á depilmagni einstakra prótína milli gelja framkvæmdur m.t.t. þess. Meðal gel (*average gel*) voru gerð fyrir hvorn hóp úr fjórum geljum ($n = 4$) í B3-hóp og 3 geljum ($n = 3$) í K-hóp. Hvort gel innihélt próteindepla sem komu fyrir í öllum geljum nema einu. Marktækni í próteintjáningu var metin með *student's t-test* ($n = 4$; $P \leq 0.05$ fyrir B3-hóp og $n = 3$; $P \leq 0.05$ fyrir K-hóp). Allir próteindeplar sem sýndu marktækan mun í próteintjáningu samkvæmt þessari aðferð voru skoðaðir vandlega og handvirk leiðrétting framkvæmd ef villur voru í deplagreiningu eða staðsetningu depla.

2.6.4. Kennigreining próteina

Próteindeplar af 2D geli af einangruðu þorskatrypsíni sem og áhugaverðir próteindeplar af 2D geljum af þorsklirfuextröktum voru sneiddir út úr lituðu geli og meltir með trypsíni í gelinu (*in-gel trypsin digestion*) (Shevchenko *et al.* 1996; Wilm *et al.* 1996; Uwins *et al.* 2006). Próteinmeltingin, peptíða útdráttur og undirbúningur fyrir MALDI marktillingar “*targets*” var framkvæmt af ProPic, ProGEST og ProMS “*robots*” (Genomic Solutions, Huntingdon, UK). Gelbúturinn með próteindeplinum var þvegin, afoxaður (*reduced*), S-alkýlaður (*S-alkylated*) og meltur í gelinu með trypsíni (sequencing grade modified trypsin; Promega). Peptíðextraktið var sett í gegnum GELoader pípettu sem innihélt POROS R2 bindiefni (*sorbent*) (PerSeptive BioSystems, USA). Peptíðin voru þvegin og losuð með 0.5 μL af mettaðri α -cyanol-4-hydroxycinnamic sýru í 50% v/v ACN, 5% v/v maurasýru (*formic acid*) lausn. Róf peptíðmassanna, einnig kallað “peptíðmassafingrafar” var fengið með Applied

Biosystems Voyager-DE STR MALDI-TOF massagreini. Massagreiningin var framkvæmd með eftirfarandi aðferð “*reflection delayed extration mode*” (sjá mynd 1).



Mynd 3. MALDI-TOF “*reflection delayed extration mode*” massagreining. Mynd fengin í Liebler, 2002.

Endurvörpunin (*reflection*) auðveldarar nemanum að greina jónir með sama m/z^2 gildi. Töf í útdrætti (*delayed extration*) felur í sér seinkun milli jónunar og stefnu jónanna inn í rör TOF-greinisins. (*TOF-analyzer*). Þessi tækni gefur jónunum kost á að fá “*fair start*” þannig að jónir af sömu tegund með sama m/z -gildi lenda á nemanum á sama tíma (Liebler, 2002). Við innbyrðis stillingu á peptíðmassarófum var notast við sjálfmeltu afurðir trypsíns (*trypsin auto-digestion products*).

Peptíðmassarófin sem fengust úr massagreiningunni voru notuð til að leita í NCBIInr (National Centre for Biotechnology Information non-redundant) kjarnsýruraða gagnabankanum með hjálp MS-FIT (<http://prospector.ucsf.edu/>) og Mascot (<http://www.matrixscience.com/>). Eftirfarandi atriði voru leyfð við leitina: hámarks skekkja í peptípmassa ± 150 ppm, oxað metíónín og systeín væri sem S-carbamíðómetyl afleiða (*S-carbamidomethyl-derivate*).

² m/z gildið stendur fyrir massi/hleðsla. Hraðinn sem jónirnar fara í gegnum TOF-greinin er í réttu hlutfalli m/z gildi þeirra. Eftir því sem m/z gildið er hærra þeim mun hraðar fljúga jónirnar.

3. NIÐURSTÖÐUR OG UMFJÖLLUN

Í þessari skýrslu er gerð grein fyrir helstu niðurstöðum verkefnisins í heild sinni. Niðurstöður einstaka tilrauna er að finna í verkefnaskýrslu Rf # 01-06 svo og í verkefnum Hildigunnar Rutar Jónsdóttur til meistaraþrófs við Auðlindadeild Háskólans á Akureyri vorið 2006 og Særúnar Óskar Sigvaldadóttur til BSc prófs við Auðlindadeild HA vorið 2006. Yfirlit yfir verkþætti verkefnisins á fyrstu stigum lúðu- og þorskeldis er sýnt í töflu 4. Öllum verkþáttum hefur verið lokið.

Tafla 4. Yfirlit yfir verkþætti verkefnisins. Tilraunir voru framkvæmdar á fyrstu stigum lúðu- og þorskeldis á tímabilinu 2004-2006.

	Verkþættir
2004-2005	Þróun/uppsetning sameindafræðilegra aðferða til flokkunar umhverfisflóru
	Notkun bætibaktería í lúðueldi (tilraun A)
	Notkun bætibaktería í lúðueldi (tilraun B)
	Rannsóknir á áhrifum baðana á lúðulirfur í startfóðrun
	Auðgun fóðurdýra með bætibakteríum
	Ræktun bakteríustofna úr bætibakteríublöndu
	Tilraunir í endurnýtingarkerfi á fyrstu stigum lúðueldis
	Meðhöndlun með bætibakteríum á fyrstu stigum þorskeldis – meðhöndlun í gegnum eldisvökva
	Meðhöndlun með bætibakteríum á fyrstu stigum þorskeldis – meðhöndlun í gegnum eldisvökva og fóðurdýr lirfa
2005-2006	Þróun/uppsetning sameindafræðilegra aðferða til flokkunar umhverfisflóru
	Kortlagning örveruflóru á fyrstu stigum lúðueldis með tveimur mismunandi aðferðum: sameindafræðilegum svo og hefðbundinni ræktun og greiningu ræktanlegrar flóru
	Ræktanleg örveruflóra greind með sameindafræðilegum aðferðum
	Meðhöndlun með probiotika
	Samantekt og úrvinnsla

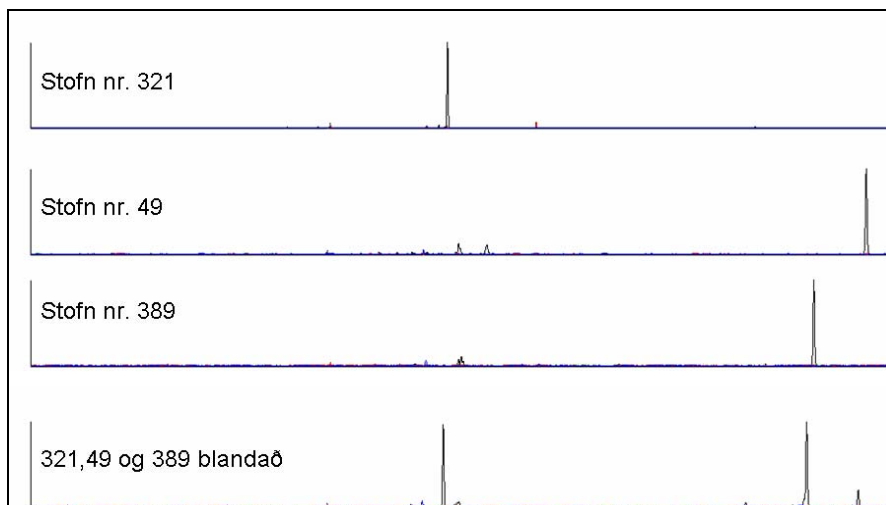
3.1. Uppsetning og þróun sameindafræðilegra aðferða.

Eitt af markmiðum þessa verkefnis var að þróa aðferð til greiningar umhverfisflóru (heildarflóra baktería) og gera samanburð á mynstri ræktanlegrar flóru og heildarflóru baktería. Þróun aðferðarinnar og greining sýna í verkefninu, var í höndum Viktors Mar Bonilla, starfsmanns Náttúrufræðistofnunar Íslands að Borgum Akureyri, með aðstoð Eyjólfis Reynissonar, sérfræðings á Rf.

Þessi verkþáttur tók lengri tíma en áætlað var en lokið var við að setja upp og aðlaga aðferð að efnivið þessa verkefnis. Í umsókn var gert ráð fyrir að greind yrðu samtals um 184 sýni úr eldinu með sameindafræðilegum aðferðum auk greininga á 1000 ræktanlegum bakteríustofnum sem einangraðir voru úr eldinu (samanburður á ræktanlegri flóru og heildarflóru baktería í eldinu). Til þess að unnt væri að greina þann fjölda sýna

úr eldinu sem gert hafði verið ráð fyrir í umsókn, var því tekin ákvörðun um að leggja í aukakostnað við kaup á einangrunarpakka til einangrunar á erfðaeftni bakteríanna (Quiagen, QIAprep Spin) en þar tekur einangrun einungis 1-2 klst í stað 2-3 daga með hefðbundinni aðferð (phenol/chloroform aðferð). Alls voru um 700 sýni af hreinræktum baktería greind á meðan þróun og aðlögun aðferðarinnar stóð yfir. Í framhaldi af þróun aðferðarinnar voru samtals greind um 150 sýni úr eldinu með þessari aðferð (hrogn/lirfur/fóðurdýr) auk um 400 sýna af ræktanlegri flóru úr eldinu. Mynstur heildarflóru baktería var einungis greint í hluta endurtekinnna tilraunauppsetninga í eldinu.

Sú aðferðafræði sem var valin kallast *terminal-restriction length polymorphism* (T-RFLP) og hefur sú aðferð verið notuð til að fá mynd af fjölbreytileika bakteríuflóru í umhverfissýnum (Liu *et al.* 1997, Moeseneder *et al.* 1999, Giuliano *et al.* 1999, Osborn *et al.* 2000, Jensen *et al.* 2002). Aðferðin felur í sér allmörg skref, þ.e. einangrun erfðaeftnis, mögnun erfðaeftnis (PCR), klippingu með skerðiensímum og loks örgreiningu. Greiningartæknin liggur í því að bakteríutegundir má greina í sundur á því hve langt frá 5'enda erfðaeftnis mismunandi bakteríutegunda tiltekið skerðiensím klippir. Búturinn sem er merktur myndar þannig mislanga DNA búta eftir því hvaða tegund á í hlut og eru þeir sýndir sem toppar á grafi. Við úrlestur niðurstaðna eru toppar skoðaðir með hliðsjón af stöðlum sem keyrðir eru með hverju sinni. Þeir toppar sem ná sömu hæð og staðlarnir og eru svipaðir að lögun, eru metnir sem raunverulegir toppar. Fjöldi þeirra toppa í grafinu gefur því til kynna fjölda bakteríutegunda og hæð þeirra hlutfallslegt magn hvers tegundar í sýninu, stærð toppa gefur til kynna lengd DNA búta sem skerðiensímið hefur myndað og er það mismunandi eftir bakteríutegundum. Mynd 4 sýnir dæmi um niðurstöður úr T-RFLP keyrslu við þróun aðferðarinnar, þar sem mismunandi stofnar voru greindir einir sér eða blandað saman fyrir PCR mögnun og raðgreiningu.



Mynd 4. Dæmigert mynstur í T-RFLP. Hér voru 3 stofnar keyrðir í sitt hvoru lagi og einnig blandað saman. Við blöndun má sjá að allir topparnir koma fyrir en þó með mismikilli flúrljómun. Notað var skerðiensímið HaeIII.

Í öðrum verkþáttum var þessari aðferð, þ.e. T-RFLP með notkun HaeIII skerðiensíms, beitt til greiningar á mynstri heildarflóru baktería í sýnum og gerður samanburður við greiningu ræktanlegrar bakteríuflóru í sömu sýnum.

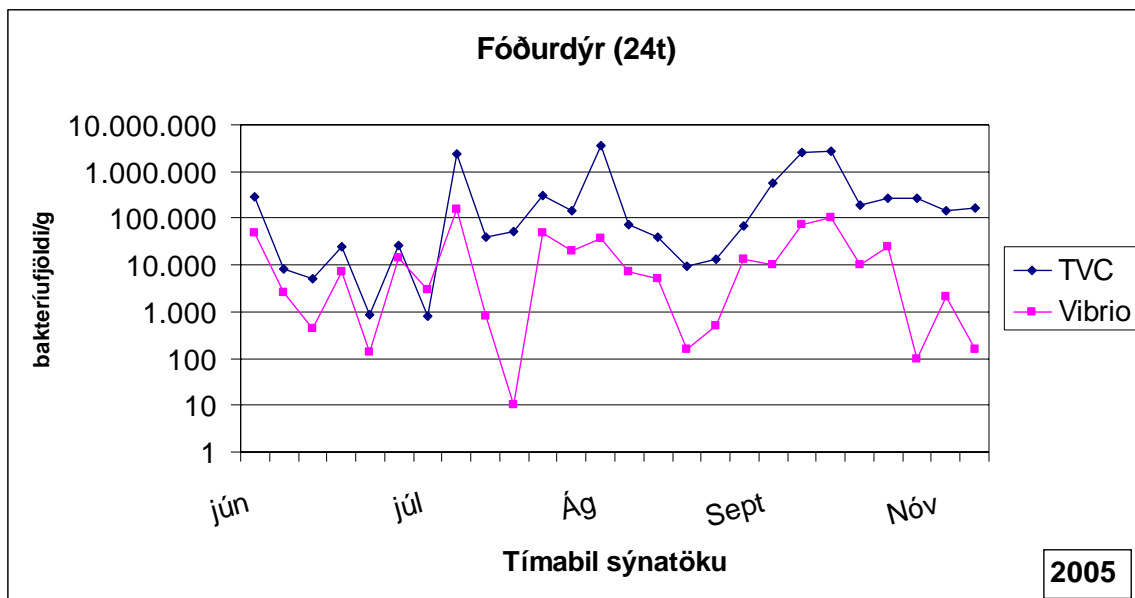
3.2. Rannsóknir á fyrstu stigum lúðueidis

3.2.1 Ræktanleg flóra og greining á mynstri heildarflóru við hefðbundna meðhöndlun.

Við kortlagningu bakteríuflóru voru tekin sýni á mismunandi tímapunntum á fyrstu stigum eldisins, þ.e. úr hrognum, kviðpokalirfum, lirfum í startfóðrun og fódurdýrum þeirra, og gerður samanburður á ræktanlegri flóru baktería og mynstri heildarflóru. Heildarflóra baktería var greind með fyrnefndri T-RFLP aðferð og tólf bakteríustofnar valdir af handahófi úr ræktanlegri flóru í sömu sýnum og þeir flokkaðir til átta, ættkvísla og/eða tegunda m.t.t. lífefnafræðilegra eiginleika. Notuð voru átta mismunandi próf og í hverri tilraunauppsetningu valdir um 100 stofnar sem flokkaðir voru nánar með API 50E staðfestingarprófi. Fyrri rannsóknir sýndu að til að fá marktækar niðurstöður við samanburð á bakteríuflóru, er nauðsynlegt að hafa sýnafjölda fjölbreyttan, þ.e. endurtekin sýnataka yfir lengra tímabil og úr fleiri eldiseiningum. Ákvörðun á bakteríuflóru fódurdýra er sérstaklega mikilvæg þar sem fódurdýr eru gefin tvisvar á sólarhring í allar eldiseiningar lirfa í startfóðrun (24t og 32t fódurdýr) þar sem oft á tíðum verða skyndileg afföll á lirfum. Fjölda sýna var því safnað úr fódurdýrum auk

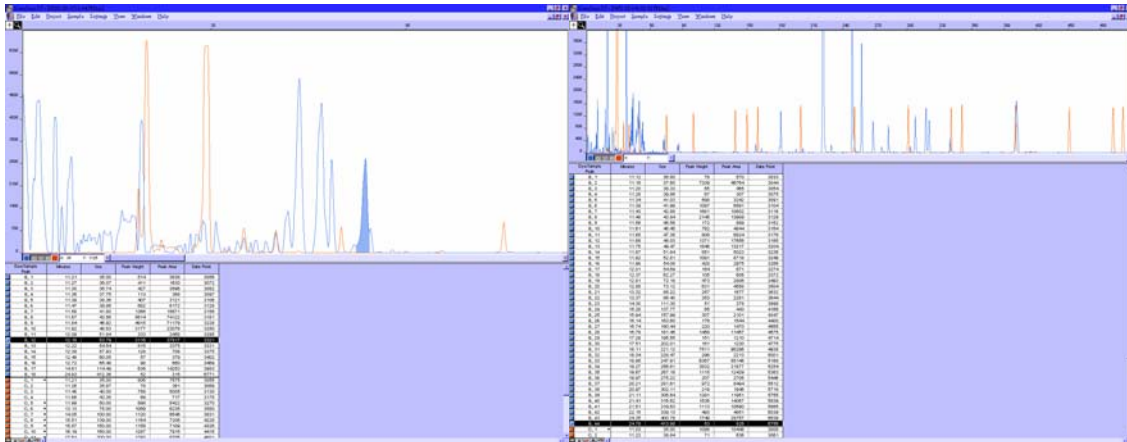
Þess sem í hverri tilraunauppsetningu voru tekin amk. vikulega sýni úr mismunandi eldiseiningum (hrogn, kviðpokalirfur og lirfur í startfóðrun) yfir um 120 daga tímabil, með það að markmiði að kortleggja örveruflóru á fyrstu stigum eldisins. Samtals var safnað um 160 sýnum af fóðurdýrum og hrognum/lirfum á mismunandi stigum eldisins. Samhliða voru tekin sýni af hrognum, lirfum og fóðurdýrum þar sem meðhöndlað var með bætibakteríum (sjá 3.2.2.), alls um 244 sýni.

Niðurstöður greininga á ræktanlegri örveruflóru sýna m.a. að fóðurdýrin (*Artemia*) eru mjög misjöfn að gæðum m.t.t. heildarfjölda ræktanlegra baktería (TVC) svo og fjölda áætlaðra *Vibrio* baktería (sjá mynd 5).



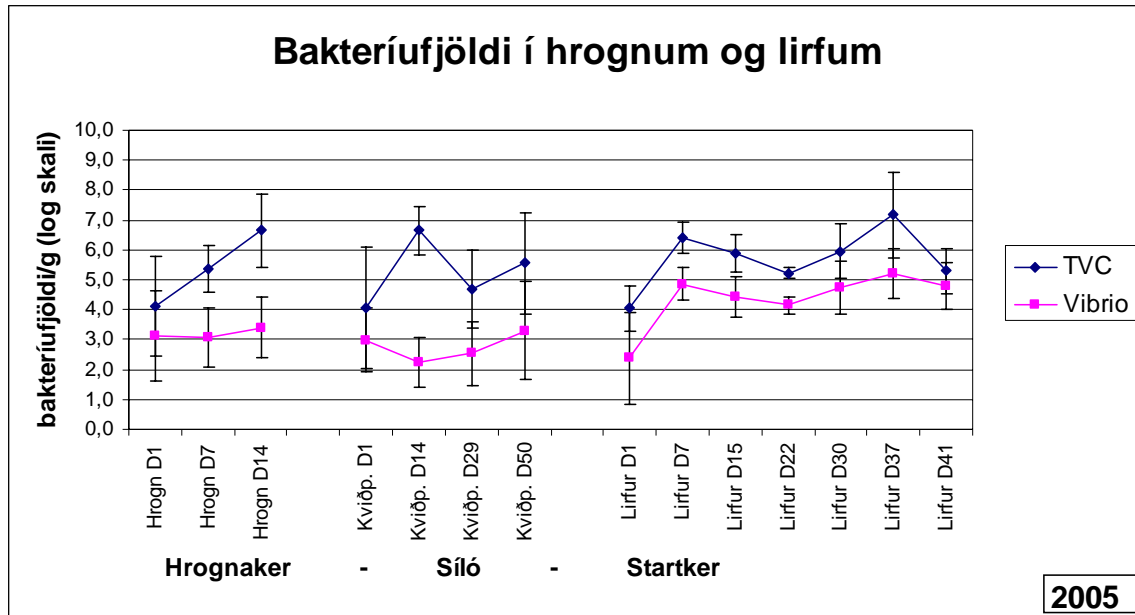
Mynd 5. Niðurstöður bakteríutalninga úr sýnum af fóðurdýrum (*Artemia*). Myndins sýnir fjölda ræktanlegra baktería í hverju grammi fóðurdýra (votvikt).

Svipaðar niðurstöður fengust úr rannsóknum á mynstri heildarflóru baktería í fóðurdýrum (T-RFLP aðferð) en þær sýna að fjöldi toppa (bakteríutegunda) í fóðurdýrum getur verið afar mismunandi (mynd 6).



Mynd 6. Mynstur heildarflóru baktería í fódurdýrum úr fódurdýraræktun Fiskey ehf (hefðbundin meðhöndlun fódurdýra). Niðurstöður fengnar með T-RFLP aðferð þar sem fjöldi toppa á grafi gefur til kynna mismunandi samsetningu bakteríuflóru í sýnum. Rauðir toppar eru viðmiðun (staðlar) og einungis þeir bláu toppar sem ná sömu hæð eða meira, eru taldir sem raunverulegir toppar og endurspeglar hver þeirra eina tegund baktería. Ath ekki er hafður sami kvarði milli mynda þannig einungus hægt að bera saman staðal og toppa á sama grafi.

Við rannsóknir á bakteríuflóru hrogna og lirfa var sýnum safnað á mismunandi tímamörktum frá upphafi hrognastigs (strax eftir frjóvgun hrogna) og fram undir lok startfóðrunar. Niðurstöður talninga á ræktanlegri bakteríuflóru í einni þessara tilrauna eru sýndar á mynd 7 en alls voru á tilraunátímanum framkvæmdar þrjár slíkar tilraunir. Í hverri tilraun voru að meðaltali tekin sýni af hrognum í 5-7 eldiseiningum, kviðpokalirfum í einu síló og lirfum í startfóðrun í 1-2 eldiseiningum, auk vikulegra sýna af fódurdýrum lúðulirfa í startfóðrun.

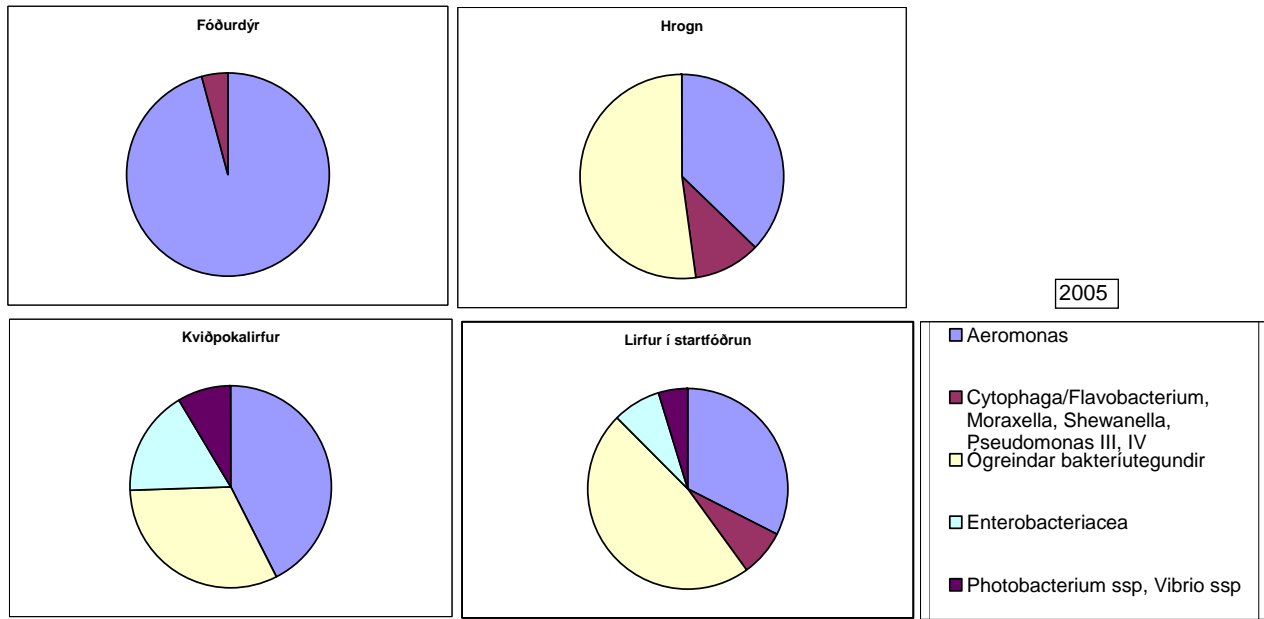


Mynd 7. Heildarfjöldi ræktanlegra baktería og *Vibrio* baktería á mismunandi dögum í eldiseiningum lúðulirfa (hrogn, kviðpokalirfur og lirfur í startfóðrun). Meðaltal og staðalskekkingja meðaltala (“error bar”) er einnig sýnt.

Eins og sést á mynd 7 fer fjöldi ræktanlegra baktería ört vaxandi í upphafi hrognatímabils svo og í lirfum í startfóðrun en minni sveiflur virtust í fjölda baktería á kviðpokastigi eldisins. Í lok hrognatímabils (14 dagar) eru kviðpokalirfur fluttar í nýjan eldisvökva í silóum og veldur það greinilega fækkun baktería (um ein log-eining/g). Fjöldi ræktanlegra *Vibrio* baktería er að jafnaði um einni log-einingu lægri en heildarfjöldi ræktanlegra baktería í lirfum í startfóðrun, en hlutfall *Vibrio* baktería virðist minna í hrognum og kviðpokalirfum. Líklegt er talið að ástæðu þessa megi rekja til fóðurdýra lirfa í startfóðrun en niðurstöður sýna að stór hluti bakteríuflóru fóðurdýra tilheyrir ættkvísl *Enterobacteriaceae* (Björnsdóttir og Smáradóttir 2003).

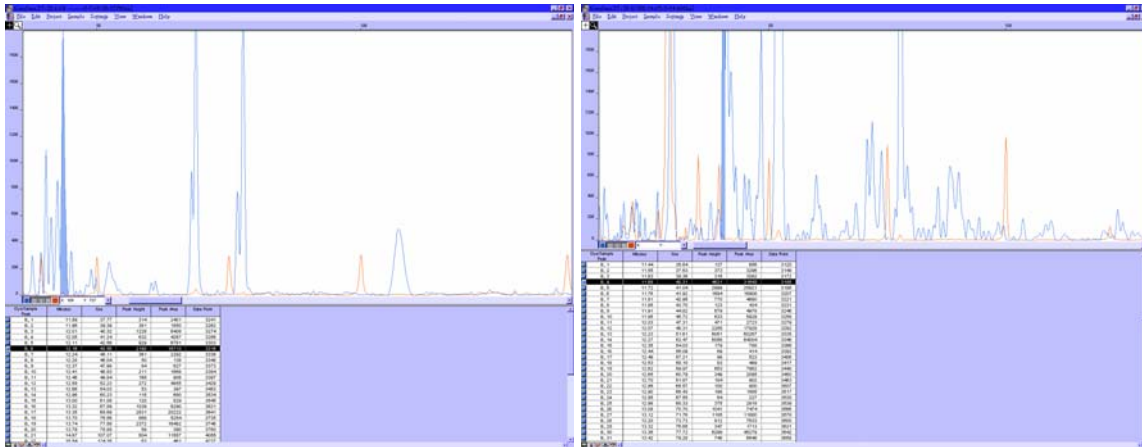
Niðurstöður greininga á ræktanlegri flóru benda til að bakteríuflóra fóðurdýra sé fremur einsleit og *Enterobacteriaceae* bakteríur ríkjandi (mynd 8). Ræktanleg flóra virðist nokkuð fjölbreyttari í hrognum og lirfum en þar ræktaðist einnig nokkuð af *Vibrio/Aeromonas* bakteríum. Búast hefði mátt við að fjöldi þessara baktería reyndist vaxandi í lirfum eftir að startfóðrun hófst (fóðurdýrum bætt í eldiseiningar lirfa) en niðurstöður benda þó ekki til þess. Aftur á móti reyndist bakteríuflóra lirfa í startfóðrun vera fjölbreyttari en hjá hrognun og kviðpokalirfum (mynd 8). Ávallt er eitthvað um bakteríur sem ræktast illa eða svara ófullnægjandi í þeim greiningarprófum sem notuð

voru. Hlutfall þessara baktería reyndist almennt hærra á fyrri stigum eldisins (hrogn) samanborið við á síðari stigum (lirfur í startfóðrun og fóðurdýr þeirra). Þetta gæti bent til þess að undir eðlilegum kringumstæðum eigi einstaka tegundir erfiðara með að ná fótfestu í eldinu og verða ríkjandi á fyrstu stigum eldisins, þ.e. í hrognum og kviðpokalirfum.



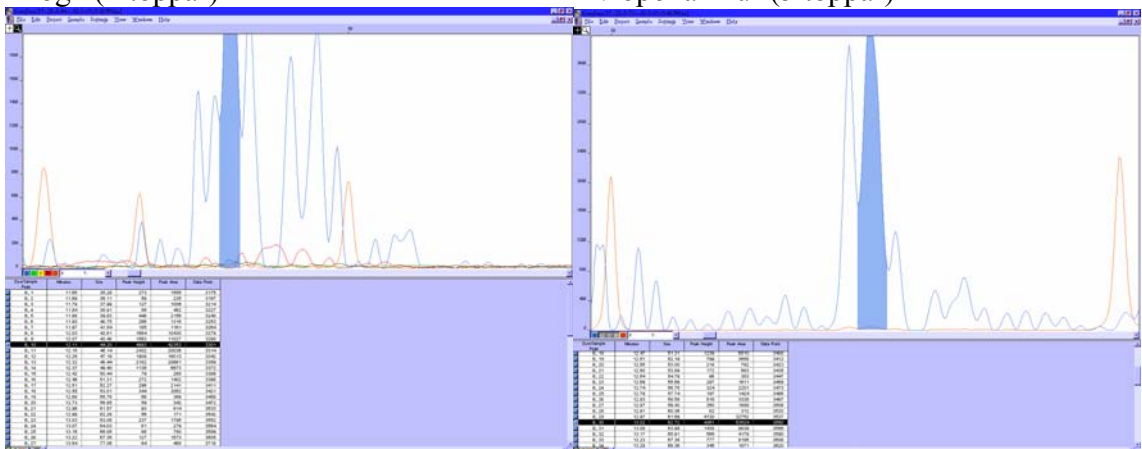
Mynd 8. Greining ræktanlegrar bakteríuflóru í fóðurdýrum, hrognum og lirfum á mismunandi stigum eldisins. Sýni eru tekin á lokadegi hvers tímabils þ.e. í lok hrognastigs, kviðpokastigs og undir lok startfóðrunar. Meðaltal 5 sýna úr jafn mörgum hrognakerjum, 3 sýna úr jafn mörgum sílóum og 7 sýnum úr jafn mörgum startkerjum liggja að baki myndunum.

Niðurstöður greininga á mynstri/samsetningu heildarflóru baktería eru sambærilegar við greiningu ræktanlegrar flóru. Niðurstöður benda til að bakteríuflóra hroгна og kviðpokalirfa sé nokkuð fjölbreytt þar sem þrjár til fjórir toppar fundust í hrognum í þessari tilraunauppsetningu og flóra kviðpokalirfa virtist enn fjölbreyttari (5-8 toppar) (mynd 9). Á hinn bóginn virðist samsetning flóru í lirfum í startfóðrun vera afar breytileg og fram koma ker með mjög einhæfa samsetningu flóru (einn topp) en einnig nokkuð fjölbreytta (6 toppa) og líkist meira mynstri heildarflóru í fóðurdýrum (mynd 9).



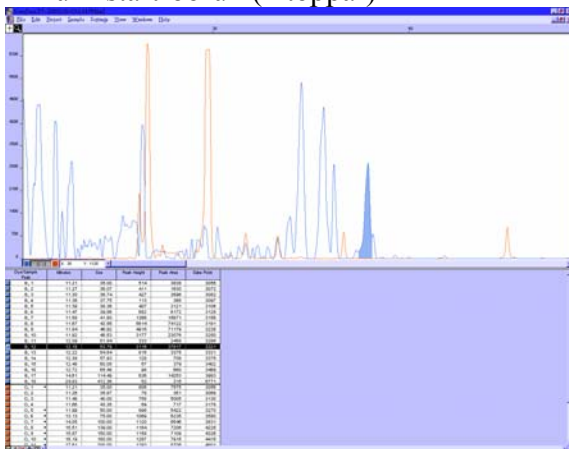
Hrogn (4 toppar)

Kviðpokalirfur (5 toppar)



Lirfur í startfóðrun (2 toppar)

Lirfur í startfóðrun (1 toppur)



Fóðurdýr (2 toppar)

Mynd 9. Dæmi um mynstur heildarflóru á lokadegi í hrognakeri þar sem fram komu 4 toppar, sílói með 5 toppum, startkerjum með 2 og 1 topp og sýni úr fóðurdýrum þar sem fram koma 2 toppar. Sýni úr kerjum og fóðurdýrum þar sem meðhöndlað var á hefðbundinn hátt. Ath. að ekki er hafður sami kvarði milli mynda þannig einungus hægt að bera saman staðal og toppa á sama grafi.

Þessar niðurstöður gætu bent til þess að sú flóra sem fyrir hendi er, sé að stórum hluta ræktanleg þótt heimildir gefi vísbendingar um hið gagnstæða (Verner-Jeffreys *et al.* 2003). Þessar niðurstöður gætu þó einnig stutt þá kenningu að aðferðir sem byggja á PCR mögnun á erfðaeefni baktería (eins og T-RFLP aðferðin) séu ekki nægilega nákvæmar til að greina bakteríur sem ef til vill eru til staðar í litlum fjölda, þar sem með þessum aðferðum séu einungis greindar þær tegundir sem eru mest ríkjandi (Suzuki *et al.* 1996). Ekki er talið líklegt að tegundir sem einungis er að finna í litlum fjölda, hafi víðtæk áhrif á vöxt eða afkomu hrognalirfa. Hinsvegar er þekkt að skapast geta hagstæðar aðstæður fyrir vöxt þessara tegunda og það geti haft víðtæk áhrif á vöxt og afkomu lirfa (Verner-Jeffreys *et al.* 2003).

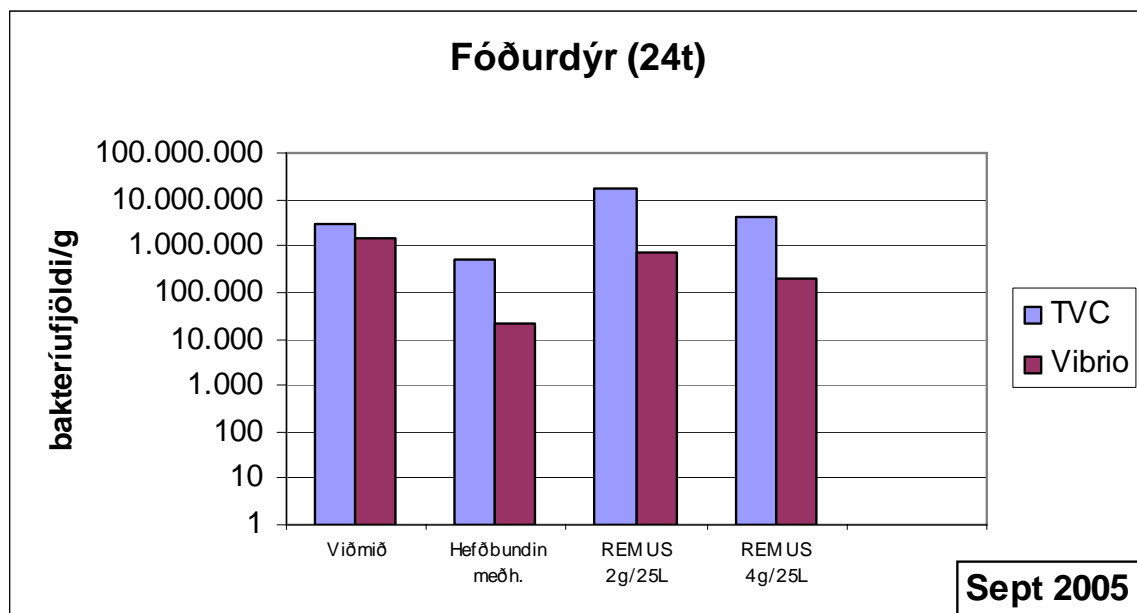
3.2.2. Meðhöndlun með bætibakteríum

Í fyrstu reyndist ekki reyndist unnt að fá upplýsingar um innihald eða samsetningu þeirrar bætibakteríublöndu sem notuð var í verkefninu (REMUS® frá Avecom, Belgíu) og einungis gefnar upp leiðbeiningar um ráðlagðan notkunarstyrk blöndunnar. Þegar fram liðu stundir var þó unnt að fá uppgjöf að um væri að ræða blöndu bætibaktería fyrir eldiskerfi. Blandan er sögð samsett úr mismunandi bakteríustofnum sem einangraðir höfðu verið úr eldisvökva við ræktun fæðudýra (*Artemia* and rotifer). Einnig er tekið fram að megin stofnar í blöndunni séu *Aeromonas schubertii*, *Paracoccus denitrificans*, *Phenylobacterium* sp. og *Gluconobacter* sp. svo og að þessir stofnar séu “beneficial symbionts”. *In vitro* rannsóknir á samsetningu blöndunnar sýndu að afar lítið ræktaðist af bakteríum og þá einungis á/í völdum næringarætum og við fremur hátt hitastig (30°C). Þessar niðurstöður benda til að litlar líkur séu á að þessar bakteríur nái fótfestu í eldisumhverfi lirfanna þar sem hitastig er á bilinu 5-11°C. Niðurstöður fyrri rannsókna bentu hins vegar til aukins hlutfalls lirfa sem þroskuðust eðlilega við meðhöndlun með blöndunni á kviðpokastigi eldisins og gefur það vísbendingar um að blandan sé ekki einungis samsett úr bakteríum, heldur jafnvel verndandi eða ónæmisörvandi efnum (t.d. lektínnum) eða efnasamböndum sem stuðla að auknum stöðugleika í eldinu (ólífræn efni og efnasambönd).

Rannsókuð voru áhrif meðhöndlunar með bætibakteríum á fyrstu stigum lúðueldis m.t.t. fjölda og samsetningar bakteríuflóru svo og áhrifa á vöxt og afkomu lirfa. Gerðar voru endurteknar tilraunir í seiðaeldisstöð Fiskey ehf. þar sem meðhöndlað var á

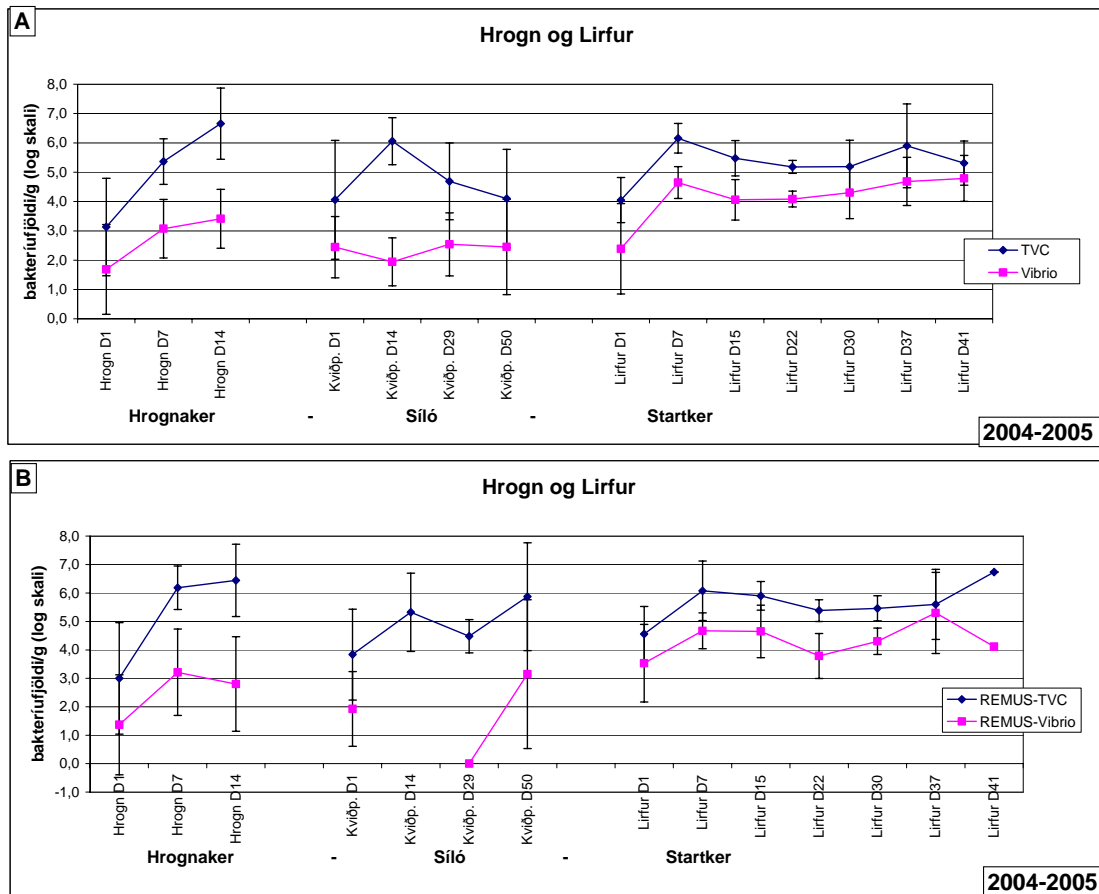
mismunandi stigum eldisins, þ.e. allt frá upphafi hrognastigs til loka startfóðrunar lirfa, auk meðhöndlunar á fóðurdýrum. Alltaf voru hafðar ómeðhöndlaðar einingar með til viðmiðunar og hluti þessara tilrauna framkvæmdar samhliða sýnatökum til kortlagningar bakteríuflóru á fyrstu stigum eldisins (sjá 3.2.1.). Alls var safnað um 244 sýnum af fóðurdýrum, hrognum, kviðpokalirfum og lirfum í startfóðrun auk þess sem sýni voru einnig tekin úr eldisumhverfi lirfa í hluta tilrauna (tilraunir A og B frá fyrra verkári). Þetta er nokkuð meiri fjöldi sýna en gert var ráð fyrir í umsókn en ákvörðun var tekin um að fjölga eldiseiningum í sýnatökum til að fá sem marktækastar niðurstöður (sjá Rf skýrslu 01-06).

Jafnframt voru gerðar tilraunir til að fækka bakteríum í fóðurdýrum með því að meðhöndla þau með mismunandi efnum. Áhrif meðhöndlunar voru metin m.t.t. fjölda ræktanlegra baktería og samsetningu/mynsturs bakteríuflóru samanborið við ómeðhöndluð fóðurdýr og fóðurdýr sem meðhöndluð voru með bætibakteríum. Niðurstöður benda til að meðhöndlun með REMUS® í ákveðnum styrk (4g/25L) skili fóðurdýrum af svipuðum gæðum og engin meðhöndlun. Hefðbundin meðhöndlun fóðurdýra hjá Fiskey ehf. gefur þó nokkuð betri niðurstöður m.t.t. fjölda ræktanlegra baktería (mynd 10).



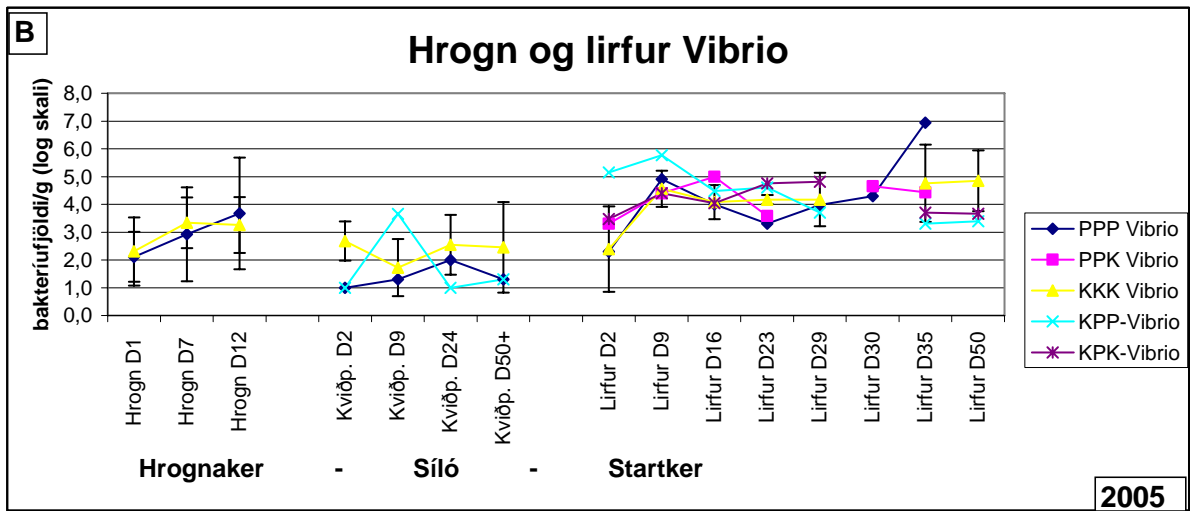
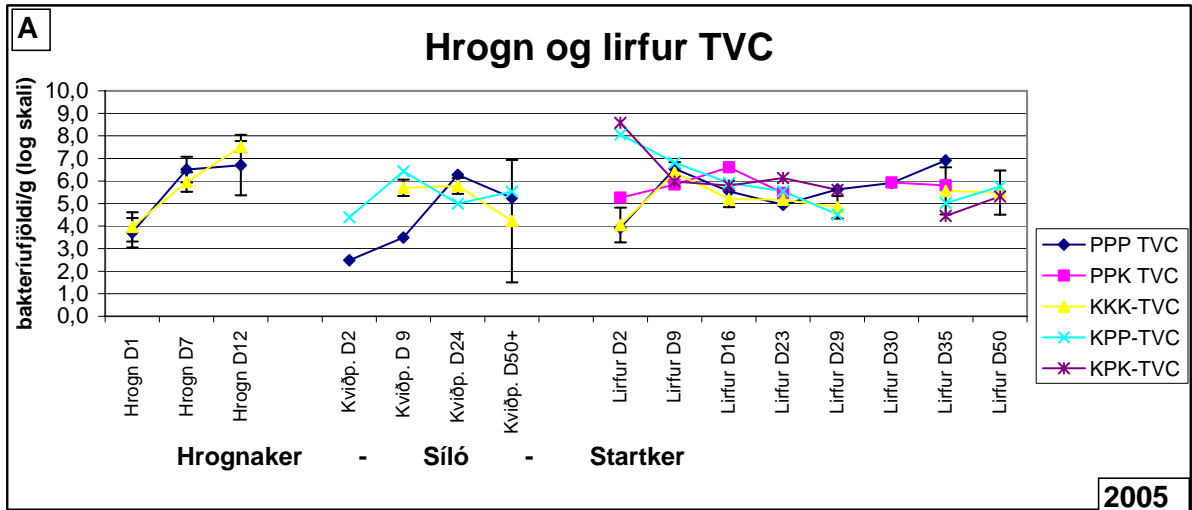
Mynd 10. Niðurstöður talninga á ræktanlegri bakteríuflóru (heildarfjöldi og fjöldi Vibrio baktería) í fóðurdýrum sem meðhöndluð voru með mismunandi styrk bætibaktería (2g/25L og 4g/25L). Til viðmiðunar eru fóðurdýr án allrar meðhöndlunar (viðmið) svo og fóðurdýr sem meðhöndluð voru á hefðbundinn hátt (hefðbundin meðh.).

Rannsóknir á áhrifum meðhöndlunar með bætibakteríum á fjölda ræktanlegra baktería í einni tilraunauppsetningu á fyrstu stigum lúðueldis eru sýndar í mynd 11. Meðhöndlað var með bætibakteríum á mismunandi stigum eldisins, þ.e. allt frá upphafi hrognastigs, á kviðpokastigi og/eða í startfóðrun og rannsökuð áhrif meðhöndlunar á fjölda og mynstur bakteríuflóru eldisins.



Mynd 11. Áhrif meðhöndlunar með bætibakteríum á fjölda ræktanlegra baktería. A: Hefðbundin meðhöndlun á öllum stigum eldisins. B: Meðhöndlað með REMUS® vikulega frá upphafi hrognastigs til loka startfóðrunar. Meðaltal og staðalskekkja meðaltala (“error bar”) er einnig sýnt.

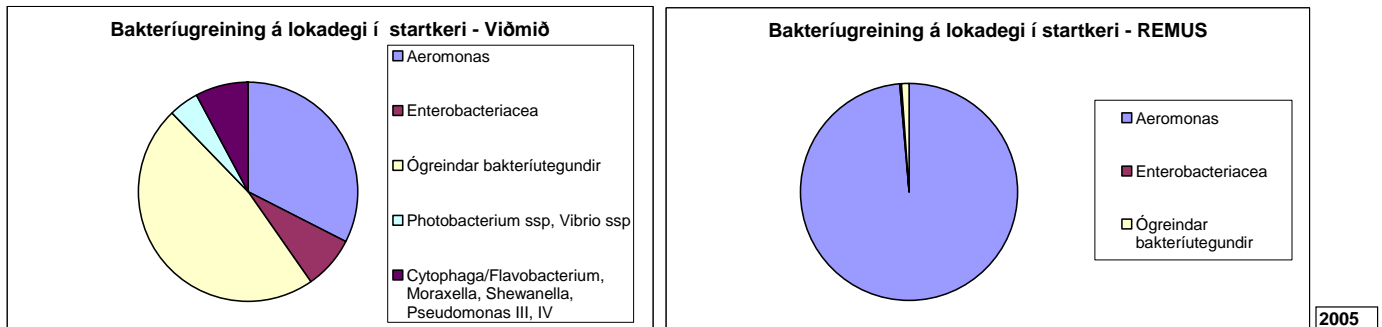
Á mynd 11 sést að meðhöndlun lirfa í startfóðrun hafði lítil áhrif á fjölda ræktanlegra baktería en svo virðist sem meðhöndlun á hrogn- og kviðpokastigi leiði í sumum tilfellum til nokkurrar aukningar á fjölda baktería. Niðurstöður sýna jafnframt að meðhöndlun hrogn virðist leiða til aukins fjölda ræktanlegra *Vibrio* baktería samanborið við ómeðhöndlaðar einingar en þeirra áhrifa gætir ekki á næsta stigi eldisins, kviðpokastigi (sjá mynd 12).



Mynd 12. Heildarfjöldi ræktanlega baktería (A) og ræktanlegra Vibrio baktería (B) í eldiseiningum þar sem ýmist var meðhöndlað með bætibakteríum frá upphafi hrognastigs til loka startfóðrunar (PPP), á hrognastigi og kviðpokastigi (PPK), á kviðpokastigi og í startfóðrun (KPP) og einungis á kviðpokastigi (KPK). Til samanburðar eru viðmiðunareiningar þar sem ekki var meðhöndlað með bætibakteríum (KKK). Meðaltal og staðalskekkja meðaltala ("error bar") er reiknað á þeim tímupunktum þar sem tekin voru fleiri en eitt sýni.

Ekki er að sjá greinilegar breytingar á fjölda ræktanlegrar bakteríuflóru við meðhöndlun með bætibakteríum á kviðpokastigi og fyrstu stigum startfóðrunar (mynd 12). Niðurstöður tegundagreininga á ræktanlegri bakteríuflóru benda til að flóran sé svipuð í hrognum og kviðpokalirfum sem meðhöndluð voru með bætibakteríum samanborið við hrogn og lirfur í ómeðhöndluðum eldiseiningum (niðurstöður ekki sýndar). Hins vegar virðist sem bakteríuflóra lirfa í startfóðrun sé einhæfari þar sem

meðhöndlað var með bætibakteríum samanborið við lirfur úr ómeðhöndluðum einingum (mynd 13).



Mynd 13. Tegundagreining ræktanlegrar bakteríuflóru í lirfum á lokadegi í startfóðrun þar sem meðhöndlað var með REMUS® samanborið við viðmiðunareiningar.

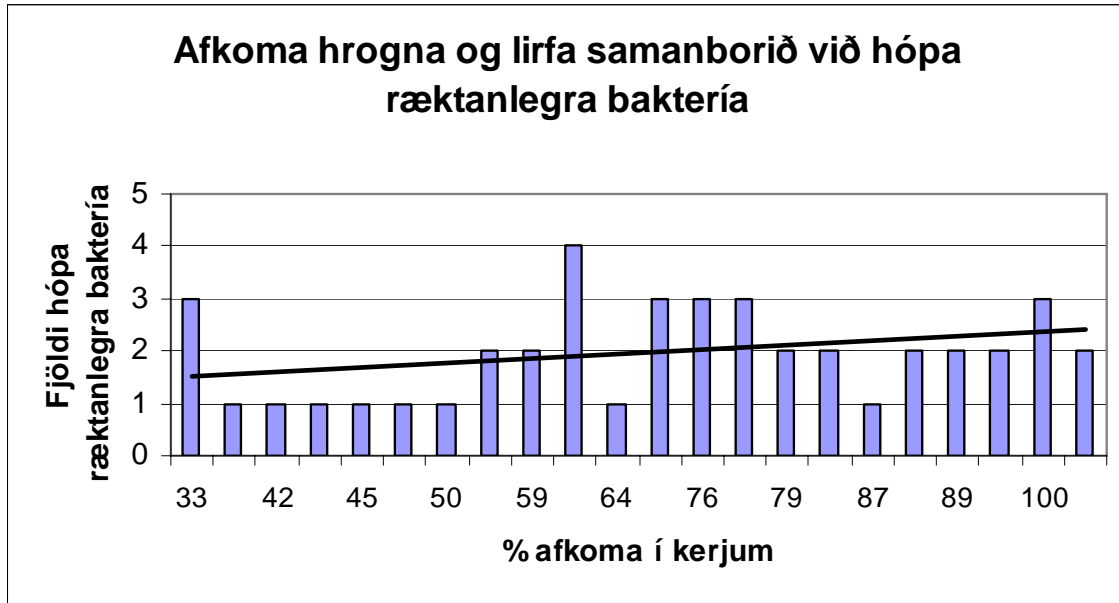
Niðurstöður greininga á mynstri heildarflóru baktería (T-RFLP aðferð) benda til að bakteríuflóra hrogn breytist lítið með tilliti til fjölda bakteríutegunda við meðhöndlun með bætibakteríum. Hins vegar virðist meðhöndlun með bætibakteríum hugsanlega vera að breyta samsetningu bakteríuflórunnar þar sem niðurstöður T-RFLP gefa nokkuð stærri toppa (lengri DNA bútar) þar sem meðhöndlað var með REMUS® (niðurstöður ekki sýndar). Á hinn bóginn virðist sem mynstur bakteríuflóru í kviðpokalirfum verði nokkuð einhæfari við meðhöndlun með bætibakteríum, þ.e. einungis 3 toppar samanborið við 5 toppa í viðmiðunarhóp kviðpokalirfa (niðurstöður ekki sýndar). Samsetning bakteríuflóru lirfa í startfóðrun reyndist breytileg en þó virtist sem flóran væri nokkuð fjölbreyttari þegar meðhöndlað var með bætibakteríum bæði á kviðpokastigi svo og í startfóðrun (7 toppar) samanborið við meðhöndlun með bætibakteríum frá upphafi hrognastigs (3 toppar) eða enga meðhöndlun (3 toppar að meðaltali) (niðurstöður ekki sýndar).

Niðurstöður sýna enn fremur að meðhöndlun með bætibakteríum á mismunandi stigum eldisins virtist ekki hafa marktæk áhrif á afkomu lirfa samanborið við ómeðhöndlaðar eldiseiningar (tafla 5).

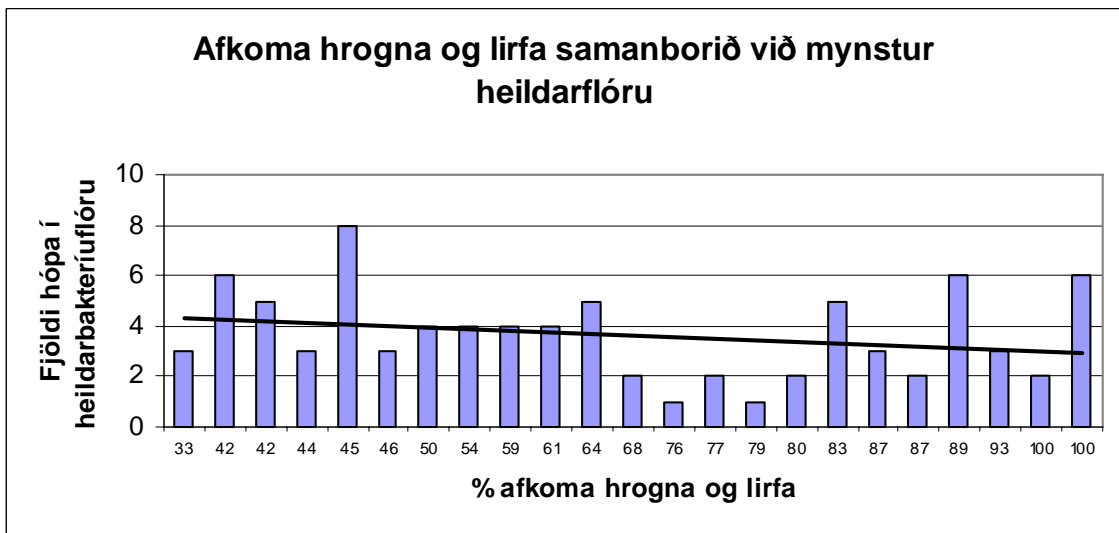
Tafla 5. Afkoma (meðaltal) úr eldiseiningum þar sem meðhöndlað var með bætibakteríum á mismunandi stigum eldisins samborið við viðmiðunareiningar þar sem ekki var meðhöndlað með bætibakteríum (KKK). Ýmist var meðhöndlað á öllum stigum frá upphafi til loka eldisferilsins (PPP), einungis meðhöndlað á hrognastigi (PKK), kviðpokastigi (KPK), á hroгна- og kviðpokastigi (PPK) eða á kviðpokastigi og í startfóðrun (KPP).

	KKK %	PPP %	KP %	PPK %	KPP %	KPK %
Hrognaker	61	65				
Síló	44	33	42			
Startker	87	86		93	89	83

Niðurstöður fyrri tilrauna (A og B) benda til að meðhöndlun með bætibakteríum geti haft áhrif á fjölda gapara en það er vansköpun á kviðpokastigi þar sem kjaftur lurfanna festist í opinni stöðu og drepast þær fljótlega eftir flutning í startfóðurker þar sem þær geta ekki aflað sér fæðu. Í tilraun A var hlutfall gapara aðeins 6% í REMUS® meðhöndluðum sílóum samanborið við 65% hlutfall í viðmiðunareiningum og í tilraun B reyndist gaparaprósenta í meðhöndluðu síló 15% en 50% í viðmiðunarsíló. Í endurteknum tilraunum árið 2005 reyndist fjöldi gapara undir meðaltali í þeim sílóum þar sem meðhöndlað var með bætibakteríum (8% og 10%) sem var svipað og í viðmiðunarsílóum. Ekki reyndist þó unnt að finna tengsl á milli hlutfalls gapara og fjölda eða mynsturs bakteríuflóru þó svo niðurstöður gætu bent til að REMUS® blandan gæti verið að styðja við eðlilegan þroska lirfa á þessu stigi (niðurstöður ekki sýndar). Betri afkoma virðist þó fylgja fjölbreyttari flóru þegar ræktanleg flóra er skoðuð (mynd 14) en þegar skoðað er mynstur heildarflóru virðist aftur á móti sem betri afkoma tengist fremur einhæfari heildarflóru (færri toppum) (mynd 15). Þetta gæti verið að styðja þá vísbendingu um að T-RFLP aðferðin sé hugsanlega ekki að greina allar tegundir baktería sem gætu ef til vill verið til staðar í litlu magni.



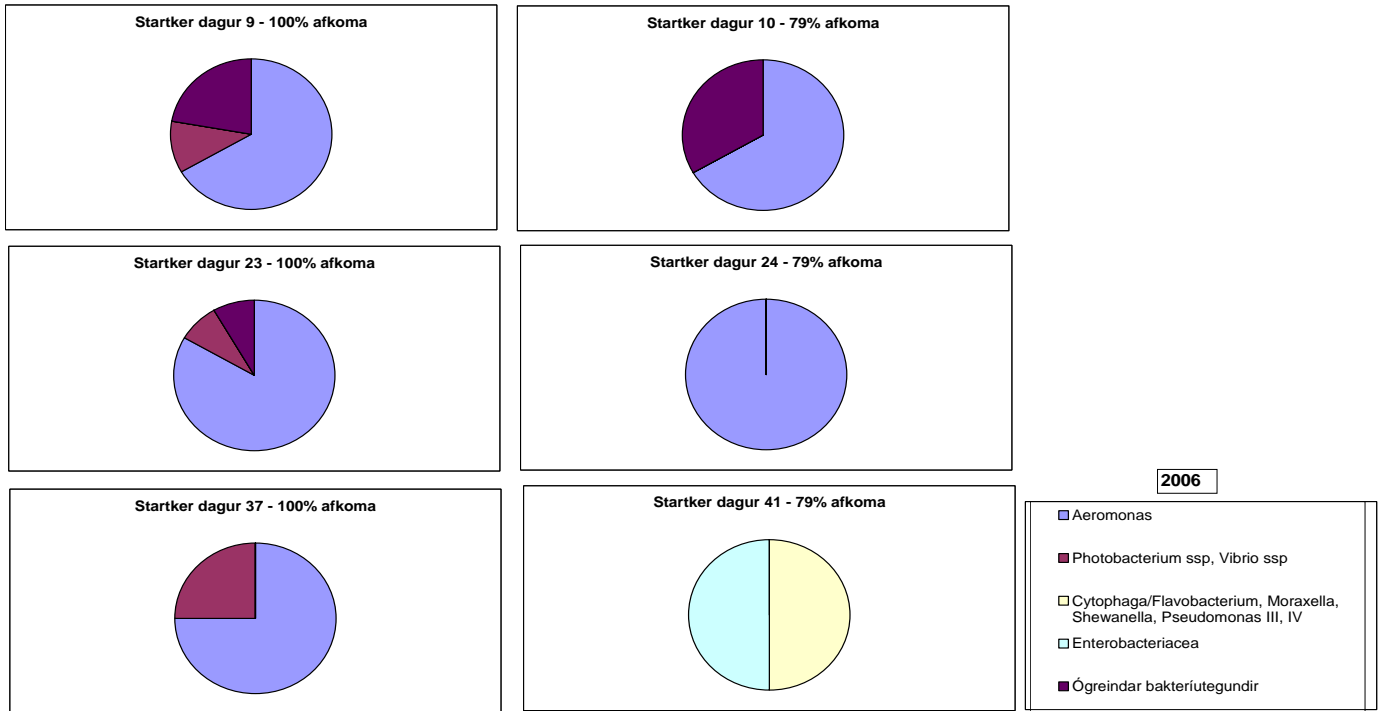
Mynd 14. Afkoma hroгна og lirfa samanborið við fjölda hópa ræktanlegra baktería í sýnum.



Mynd 15. Afkoma hroгна og lirfa samanborið við hópa baktería (fjöldi toppa) við greiningu heildarflóru með T-RFLP aðferð.

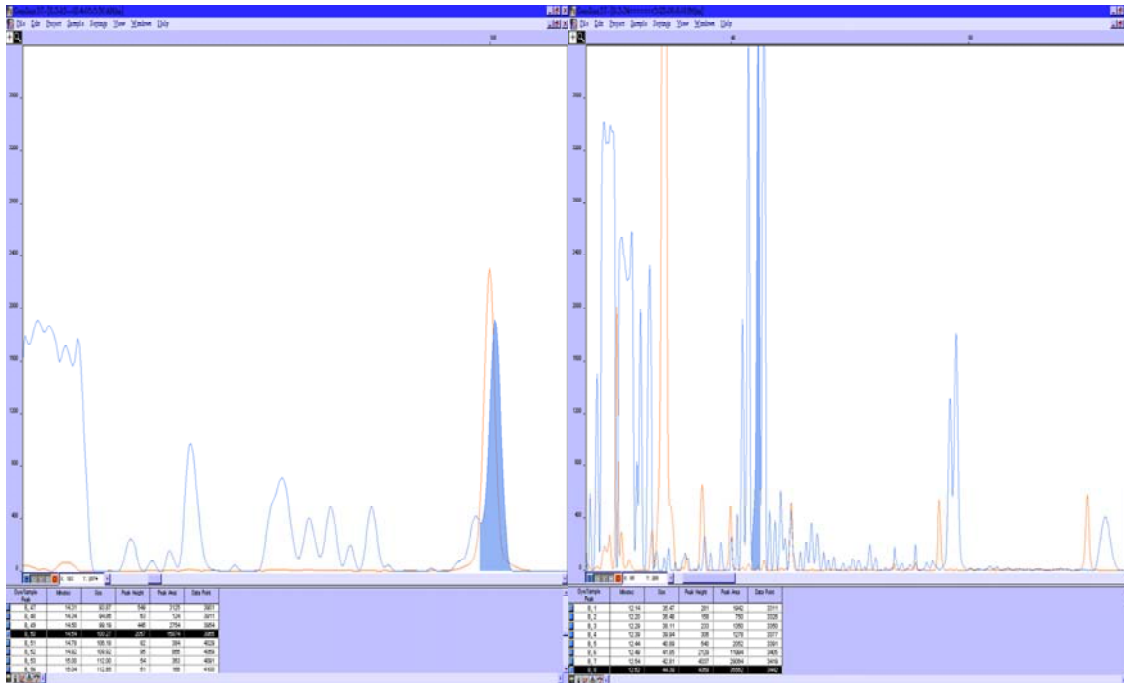
Til þess að rannsaka nánar hvort fjöldi og samsetning bakteríuflóru hafi áhrif á afkomu lirfa úr startfóðrun, voru skoðuð sérstaklega tvö ker með mismunandi afkomu. Valið var ker þar sem afkoma var einstaklega góð (100%) og gerður samanburður á bakteríuflóru í kerri sem sýndi versta afkomu í þessum tilraunum (79%) sem þó er reyndar ekki talin slæm afkoma. Í báðum tilfellum var um að ræða viðmiðunarker sem fengið höfðu hefðbundna meðhöndlun gegnum allan eldisferilinn en taka ber fram að lirfur í viðkomandi kerjum voru ekki af sama upplagi (mismunandi hópar lirfa). Niðurstöður

greininga á ræktanlegri bakteríuflóru benda hugsanlega til að fjölbreyttari flóra baktería sé til staðar í kerri þar sem afkoma lirfa reyndist mjög góð (mynd 16) auk þess sem ekki sjást miklar sveiflur í samsetningu ræktanlegrar flóru yfir tímabilið. Sveiflur í samsetningu flóru reyndust áberandi meiri í kerri þar sem afkoma lirfa úr startfóðrun var slakari (mynd 16).



Mynd 16. Greining ræktanlegrar bakteríuflóru í meltingarvegi lirfa í startfóðrun þar sem afkoma lirfa var annars vegar mjög góð (100%) samanborið við ker þar sem afkoma reyndist slakari (79%).

Svipaðar niðurstöður fengust við greiningu á mynstri heildarflóru baktería, þ.e. heildarflóra baktería virtist fjölbreyttari að samsetningu í kerri þar sem afkoma lirfa var yfir meðallagi (6 toppar) samanborið við mynstur flóru í lirfum þar sem afkoma var slakari (einn toppur) (mynd 14).



Afkoma lirfa 79%

Afkoma lirfa 100%

Mynd 17. Mynstur heildarflóru baktería í eldiseiningum þar sem afkoma lirfa úr startfóðrun var mismunandi (T-RFLP aðferð).

Fyrri niðurstöður gáfu vísbendingar um að meðhöndlun með bætibakteríum leiddi til fækkunar gapara á kviðpokastigi (Björnsdóttir og Smáradóttir 2003). Gæði kviðpokalirfa hafa aukist mikið síðan þessar rannsóknir voru framkvæmdar og niðurstöður þessa verkefnis gefa ekki vísbendingar um að hægt sé að auka gæði kviðpokalirfa frekar við meðhöndlun með REMUS®. Niðurstöður þessa verkefnis benda til að meðhöndlun með REMUS® í stað hefðbundinnar meðhöndlunar lirfa leiði til aukinnar litabrenslunar seiða við lok startfóðrunar. Litabrenslun í seiðum er vandamál sem kemur upp þegar lirfur hætta að þrífast og vöxtur verður lélegur. Niðurstöður benda því til að meðhöndlun með bætibakteríum gefi ekki jafn góðan árangur og hefðbundin meðhöndlun lirfa á þessu stigi eldisins.

Tilraunir voru gerðar með endurnýtingarkerfi samhliða fyrstu tilraunauppsetningu (2005) en niðurstöður þóttu ekki skila neinum upplýsingum. Ekki var talið tímabært að vinna áfram í áhrifum endurnýtingar eldisvökva fyrr en unnt væri að fá betri mynd af eldisumhverfinu almennt og áhrifum meðhöndlunar með t.d. bætibakteríum á bakteríuflóru þess. Ekki verður því fjallað nánar um þennan hluta tilrauna hér en fjallað

er um niðurstöður í meistararitgerð Hildigunnar Rutar Jónsdóttur, við Auðlindadeild HA 2006.

3.3. Meðhöndlun með bætibakteríum á fyrstu stigum þorskeldis

3.3.1. Vöxtur og lifun lirfa

Tafla 2 sýnir lifun (%) og þurrviggt (mg) lirfanna í hverju síló í fyrir sig 24 dögum eftir klak (lirfur í K2-hóp láku út með frárennsli úr síló og náðist því ekki að meta lifun né taka lirfur til þurrkunar til ákvörðunar á þurrviggt í lok tilraunarinnar).

Af niðurstöðunum að dæma gæti meðhöndlun með bætibakteríum á hrognastigi haft neikvæð áhrif á vöxt þorsklirfa fyrstu 24 dagana eftir klak, þar sem þurrviggt lirfa reyndist minni í öllum hópum þar sem meðhöndlað var með bætibakteríum samanborið við viðmiðunarhóp (að undanskildum hóp B3₂) (tafla 6). Niðurstöðpur sýna jafnframt að lifun lirfa (%) er betri þar sem meðhöndlað er með bætibakteríum (tafla 6). Betri lifun í báðum endurtekningum í hóp B2 samanborið við viðmiðunarhóp (K), er vísbending um að auðgun eldisvökva með bætibakteríum á lirlustigi sé árangursrík leið til að auka lifun í þorsklirfueldi. Meðhöndlun hjóldýra með bætibakteríum fyrir fóðrun auk auðgunar eldisvökva (hópur B3) leiddi til 4-5faldar aukningar í lifun lirfa í báðum endurtekningum samanborið við viðmiðunarhóp.

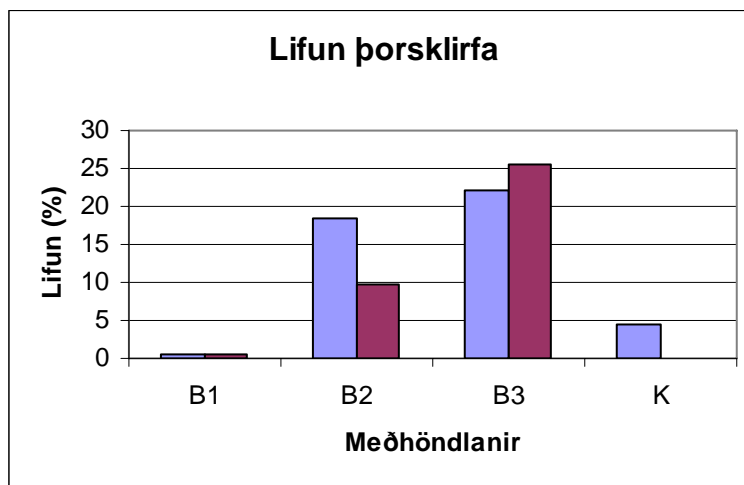
Tafla 6. Lifun (%) og þurrviggt (mg) ± staðalfrávik lirfa sem meðhöndlaðar voru með bætibakteríum (B-hópar) sem og viðmiðunarhóps (K) 24 dögum eftir klak.

Lirfuhópur	T ₀ ^{*1} (lirfur)	Lifun (%)	Þurrviggt ± st.frávik (mg)
B1 ₁	7500	0.50	0.57 ± 0.32
B1 ₂	7500	0.41	0.63 ± 0.31
B2 ₁	7500	18.39	0.69 ± 0.29
B2 ₂	7500	9.78	0.62 ± 0.34
B3 ₁	7500	22.23	0.55 ± 0.22
B3 ₂	7500	25.64	0.93 ± 0.35
K ₁	7500	4.44	0.82 ± 0.40
K ₂ ^{*2}	7500	-	-

*1: Fjöldi lirfa í hverju síló í upphafi tilraunarinnar.

*2: Lirfur láku út með frárennsli og því hvorki hægt að ákvarða lifun né þurrviggt.

Best afkoma lirfa fékkst í báðum endurtekningum í hóp þar sem lirfur voru meðhöndlaðar með bætibakteríum frá klaki, auk þess sem þær voru fóðraðar með hjóldýrum sem auðguð voru með bætibakteríum (hópur B3, Mynd 18). Þessi aðferð við meðhöndlun er því greinilega að skila árangri og gæti ástæðan verið sú að fæðudýrin (hjóldýr) eru almennt talin vera helsta smitleið baktería í lirfueldi þorsks (Sweetman *et al.* 1998; Ringø *et al.* 1999). Þekkt er að bakteríuflóra hjóldýranna einkennist af hraðvaxta tækifærissinnuðum bakteríum sem blómstra í auðgunarferlinu og geta valdið dauða lirfa sjávarfiska (Perez-Benavente *et al.* 1988; Nicolas *et al.* 1989; Skjermo *et al.* 1993). Niðurstöður fyrri rannsókna sýna að unnt er að stýra þessari örveruflóru með bætibakteríum og koma þannig í veg fyrir vöxt sjúkdómsvaldandi baktería í eldinu (Perez-Benavente *et al.* 1988). Niðurstöður tilrauna verkefnisins benda jafnframt til að mögulegt sé að auka afkomu þorsklirfa við meðhöndlun með þessari tilteknu blöndu bætibaktería (Mynd 18).



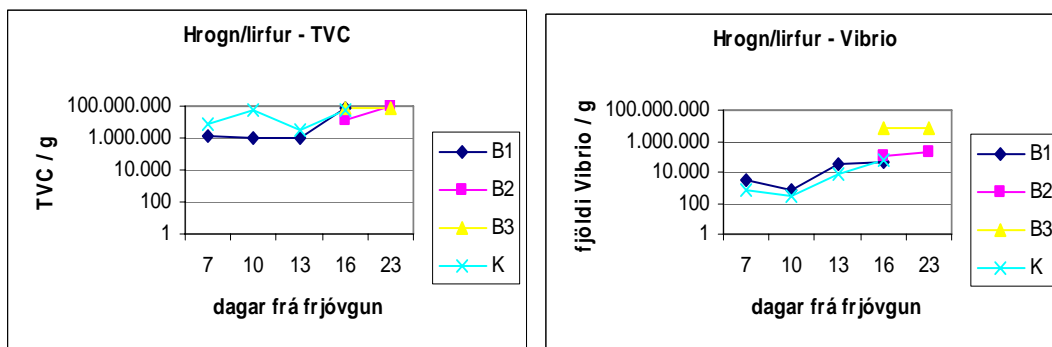
Mynd 18. Lifun þorsklirfa (%) við lok tilraunar. Hrogn voru meðhöndluð frá upphafi hrognastigs (B1) og lirfur frá upphafi lurfustigs (B2) auk þess sem meðhöndlaðar lirfur voru fóðraðar á meðhöndluðum fóðurdýrum (B3). Til samanburðar er sýnd lifun lirfa í ómeðhöndluðum eldiseiningum (K).

Nokkur munur reyndist á lifun lirfa í eldiseiningum í þeim hóp þar sem meðhöndlað var frá upphafi lurfustigs (B2), þar sem lifun í öðru sílóinu var 18,4% og 9,8% í hinu. Reynslan sýnir að aðstæður í sílóum geta verið mismunandi og getur það m.a. skapast af mun á ljósstyrk (mismunandi perur), hitastigi, rennsli eða fleiri þáttum. Einnig geta óhagstæðar aðstæður m.t.t. bakteríuflóru en slíkt er ekki að sjá af niðurstöðum rannsókna á ræktanlegri flóru (mynd 19). Niðurstöður benda jafnframt til að

ekki sé nóg að bæta vatnsgæði við meðhöndlun með bætibakteríum í gegnum eldisvökva, heldur þurfi einnig að koma til meðhöndlun í gegnum fódurdýr, til að hafa jákvæð áhrif á samsetningu flóru í meltingarvegi lirfa. Betri lifun lirfa fékkst við meðhöndlun bæði lirfa og fódurdýra þeirra (hópur B3) samanborið við aðrar eldiseiningar í tilrauninni. Meðhöndlun með þessari blöndu bætibaktería hefur ekki verið reynd áður í eldinu en niðurstöður benda til að meðhöndlun lirfa og fódurdýra þeirra skili árangri og því líkur á að sú aðferð verði notuð í eldinu í nánustu framtíð.

3.3.2. Fjöldi ræktanlegra baktería.

Sýni voru tekin til bakteríurannsókna með jöfnu millibili yfir tilraunatímann og heildarfjöldi ræktanlegra baktería svo og *Vibrio* baktería í hrognum, lirfum og eldisumhverfi þeirra ákvarðaður (Mynd 19).



Mynd 19. Heildarfjöldi ræktanlegra baktería (TVC) og *Vibrio* baktería í hrognum og lirfum á tilraunatímanum. Myndin sýnir meðaltalsfjölda ræktanlegra baktería í hrognum/lirfum í tveimur eldiseiningum hverju sinni.

Mynd 15 sýnir að við meðhöndlun með bætibakteríum allt frá frjóvgun hrogna virðist sem fjöldi ræktanlegra baktería (TVC) haldist stöðugri á hrognastigi samanborið við í hrognum sem ekki voru meðhöndluð með bætibakteríum. Fjöldi baktería eykst síðan nokkuð við klak (um tveimur vikum eftir frjóvgun)

Niðurstöður sýna jafnframt að fjöldi ræktanlegra baktería í þorskhrognum og þorsklirfum ($10^5 - 10^6/g$) er nokkuð hærri en í lúduhrognum og lúdulirfum ($10^5 - 10^6/g$).

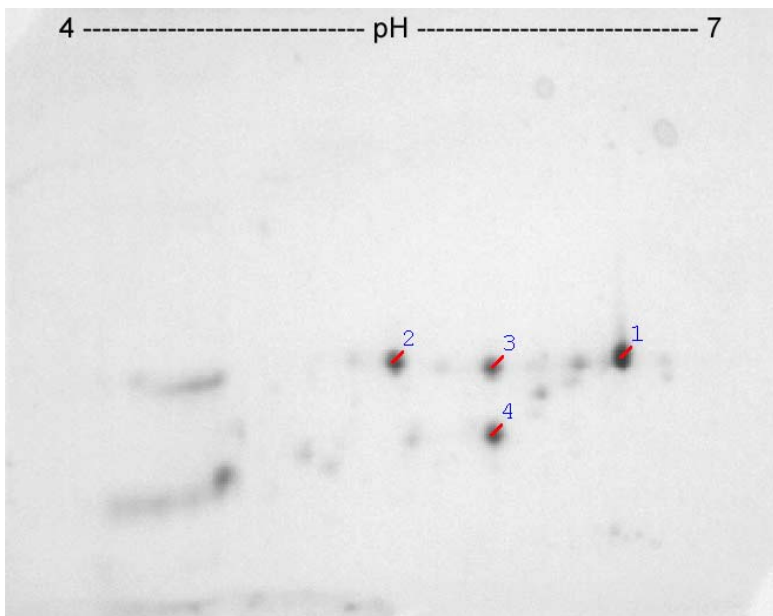
Niðurstöður sýna ennfremur að fjöldi ræktanlegra baktería er mjög mikill í fódurdýrum þorsklirfa (hjöldýrum) samanborið við í fódurdýrum lúdulirfa (*Artemia*). Fjöldi ræktanlegra baktería í fódurdýrum í lúdueldi Fiskey ehf. reyndist vera um $0.1-1,9 \cdot 10^7$ í

hverju grammi af fôðurdýrum meðhöndluðum með bætibakteríum og $0,8 \cdot 10^4$ - $3,5 \cdot 10^6$ í ómeðhöndluðum fôðurdýrum lúðulirfa en $1,6$ - $5,4 \cdot 10^7$ í hverju grammi ómeðhöndlaðra hjóldýra og $0,9$ - $5,1 \cdot 10^7$ í hverju grammi hjóldýra sem meðhöndluð voru með bætibakteríum (niðurstöður ekki sýndar).

3.3.3. Tjáning trypsins í þorsklirfum.

3.3.3.1. Próteinmengjagreining á einangruðu þorskatrypsíni

Mynd 2 sýnir 2D próteinprófil af einangruðu þorskatrypsíni. Fjórir greinilegustu próteindeplarnir (deplar 1-4 á mynd 20) voru sneiddir út úr 2D gelinu og kenngreindir. Kennimörk próteindeplanna sem og niðurstöður úr peptíðmassa greiningunni eru tekin saman í töflu 3.



Mynd 20. 2D prótein prófíll af einangruðu þorskatrypsíni. Prótein-in voru greind á “small-format” 2D geli með pH 4-7 IPG hallanda geli í fyrstu vídd (sjá nánari lýsingu í efni og aðferðakafla).

Tafla 7. Kennimörk próteindepla einangraðs þorskatrypsíns fengin úr peptíðmassa greiningum.

Depilnr.	MM/PI	Prótein	Tegund	MS-Fit	Skráning. númer ^{*3}	Peptíða	Aminós.
				MOWSE		Stig ^{*2}	samsvör. (%samsv)
1		Trypsinogen I ^{*1}	<i>Gadus morhua</i>		P16049		
2	25845/5.5	Trypsinogen X	<i>Gadus morhua</i>	6712	Q91041	8(47)	44
3	25845/5.5	Trypsinogen X	<i>Gadus morhua</i>	1,78E+07	Q91041	7(28)	28
4	25811/6.2	Trypsinogen I	<i>Gadus morhua</i>	4784	P16049	6(42)	22

*1 MM, mólmassi; PI, jafnhleðslupunktur;

: Leit í gagnaböndum skilaði engum niðurstöðum. Samsvörun peptíðmassa við trypsinogen I eftir “*virtual digestion*” á trypsinogen I

*2: MOlecular Weight SEarch – Scoring based on peptide frequency distribution from the OWL non redundant Database.

*3: Swiss-Protein accession number

*4: Sequence coverage.

3.3.3.2. Próteinmengjagreining á þorsklirfum meðhöndluðum með bætibakteríum

Þorsklirfu-próteinextrökt voru greind með 2D rafdrætti á “*medium-format*” 2D geljum eins og lýst er í efna og aðferðakaflanum. Þar sem báðar endurtekningarnar í B3-hóp sýndu ca. 5 falt meiri lifun en samanburðarhópurinn var ákveðið að framkvæma próteinmengjagreiningu á þeim sýnum til að bera saman við niðurstöður úr próteinmengjagreiningu af samanburðarhópi. Þorsklirfu-próteinextrakt frá fjórum sýnum (ca 10 lirfur/sýni) í B3-hóp (B3_a – B3_d) og fjórum sýnum í samanburðarhóp (K_a – K_c) voru borin saman í tilrauninni. Meðalfjöldi greindra próteindepla með pI (jafnhleðslupunkt) á bilinu 4 til 7 og mólmassa frá 6 til 148 kDa var 426.5 ($n = 4$, $SD = 9.95$) á 2D geljum í B3-hóp og 435 ($n = 3$, $SD = 10.00$) í K-hóp. 2D próteinprófill (mynd 20) frá sýni K_b var valin til að gera samanburðargel (*reference gel*) sem notað var til að staðsetja (*matching*) próteindepla á restinni af geljunum í tilrauninni. *Student's t-test* ($n = 4$ fyrir B3-hóp og $n = 3$ fyrir K-hóp) leiddi í ljós að 16 próteindeplar voru tjáðir marktækt ($P \leq 0.05$) í meira magni og 59 próteindeplar í minna magni í meðhöndluðum lirfum (B3-hóp) samanborið við viðmiðunarhóp (K-hóp). Allir þessir deplar voru vandlega skoðaðir á geljunum með það í huga að sneiða þá út úr geli til tegundagreininga með MALDI-TOF massagreiningu. Af þeim 75 deplum sem tjáðir voru í marktækt ($P > 0.05$) minna eða meira magni voru 30 vel greinanlegir á geljunum sem og höfðu jafna dreifni (*equal variance*) (*F-test*). Ákveðið var að sneiða þessa 30 depla út úr geljunum og tegundagreina þá með MALDI-TOF massagreini (Tafla 8).

Tafla 8. Próteindeplar sem bætibakteríumeðhöndlunin hafði marktæk ($P \leq 0.05$) áhrif á. Deplarnir voru sneiddir út til frekari kennigreininga.

Depilnúmer	Útreiknað		Depilmagn		Depilmagn		Margfald.	
	PI	MM (kDa)	B3-hópur		K-hópur		munur	t-test
			Meðaltal	St.frávik	Meðaltal	St.frávik		
Minni tjáning ¹								
219	4,4	79,8	0,036	0,009	0,240	0,010	6,6	0,000
222	4,7	77,6	0,329	0,074	0,556	0,035	1,7	0,005
239	5,6	71,1	0,168	0,031	0,301	0,055	1,8	0,009
284	4,4	69,0	0,090	0,025	0,258	0,032	2,9	0,001
296	5,1	51,6	0,897	0,076	1,151	0,092	1,3	0,010
327	6,2	61,4	0,093	0,010	0,063	0,009	0,7	0,007
420	5,1	52,3	0,685	0,154	0,365	0,128	0,5	0,029
496	5,0	45,3	0,088	0,049	0,241	0,052	2,7	0,010
506	5,8	44,6	0,031	0,009	0,067	0,011	2,1	0,005
558	5,0	39,7	0,144	0,047	0,464	0,223	3,2	0,034
690	5,8	29,2	0,019	0,007	0,058	0,008	3,0	0,001
712	4,5	29,7	0,036	0,013	0,082	0,004	2,3	0,002
774	4,7	24,2	0,440	0,043	0,229	0,052	0,5	0,002
792	6,3	22,8	0,270	0,020	0,178	0,031	0,7	0,007
886	5,0	17,3	2,096	0,251	1,585	0,190	0,8	0,027
965	4,7	14,1	0,071	0,022	0,036	0,011	0,5	0,035
1000	4,7	12,0	0,278	0,008	0,136	0,042	0,5	0,002
1024	4,3	10,9	0,238	0,077	0,066	0,026	0,3	0,008
1059	5,3	9,4	0,419	0,106	0,144	0,069	0,3	0,009
1123	4,4	7,8	0,397	0,038	0,218	0,097	0,5	0,031
1399	4,9	23,8	0,194	0,022	0,146	0,012	0,8	0,004
Aukin tjáning ²								
339	5,5	48,0	23,640	2,218	17,842	2,119	1,3	0,018
466	6,2	48,0	0,764	0,058	0,102	0,048	7,5	0,000
530	5,9	41,5	0,390	0,033	0,656	0,118	0,6	0,014
600	5,1	37,4	0,234	0,090	0,081	0,022	2,9	0,036
746	5,2	23,8	0,190	0,044	0,036	0,006	5,2	0,002
761	4,7	25,6	0,383	0,025	0,284	0,020	1,4	0,002
860	4,7	18,9	0,299	0,055	0,410	0,041	0,7	0,027
1386	5,1	9,7	0,061	0,021	0,168	0,031	0,4	0,013
1404	5,6	6,1	0,094	0,045	0,210	0,012	0,4	0,013

*1: Bætibakteríumeðhöndlun þorsklirfa hafði þau áhrif að tjáning viðkomandi próteindepils minnkaði.

*2: Bætibakteríumeðhöndlun þorsklirfa hafði þau áhrif að tjáning viðkomandi próteindepils jókst.

Þar sem ætlunin er að byggja upp gagnagrunn fyrir próteintjáningu þorsklirfa voru að auki sneiddir út 24 deplar sem innihéldu mesta magn próteina. Númer próteindeplana sem og magn þeirra (*normal volume*) eru sýnd í töflu 9.

Tafla 9. Meðalmagn (n = 7) stærstu próteindeplana á 2D próteinprófil hópanna tveggja.

Depilnúmer	Meðaldepilmagn* ¹		Útreiknað	
	(n = 7)* ¹		PI	MM (kDa)
339* ²	21,16	3,682	5,5	48,0
393* ³	8,37	1,030	5,6	48,0
1396	5,55	0,617	4,8	35,8
821	3,58	0,394	5,3	20,0
979	3,25	0,552	4,7	12,4
1048	2,42	0,327	4,3	10,7
886* ²	1,80	0,337	5,0	17,1
528	1,67	0,738	5,1	41,5
1128	1,46	0,433	5,3	6,8
231	1,11	0,148	5,4	70,0
296* ²	1,01	0,155	5,0	63,3
423	1,00	0,200	5,4	50,1
804	0,99	0,241	5,3	21,9
498	0,89	0,310	5,1	44,6
1227	0,79	0,209	5,3	5,1
299	0,71	0,034	5,3	62,3
234	0,65	0,151	5,3	71,1
805	0,62	0,121	5,8	20,9
309	0,54	0,100	6,1	61,4
530* ²	0,54	0,166	5,9	40,3
253	0,51	0,082	5,2	69,0
420* ²	0,50	0,213	5,1	50,8
258	0,49	0,071	5,1	68,0
1120	0,49	0,094	5,2	7,5

*¹ Meðaldepilmagn og staðalfrávik úr hópunum tveimur, B3 og K.

*² Próteindeplar sem bætibakteríumeðhöndlunin hafði marktæk ($P \leq 0.05$) áhrif á.

*³ Ójöfn dreifing á stærð próteindeplanna ($F \geq 0.05$).

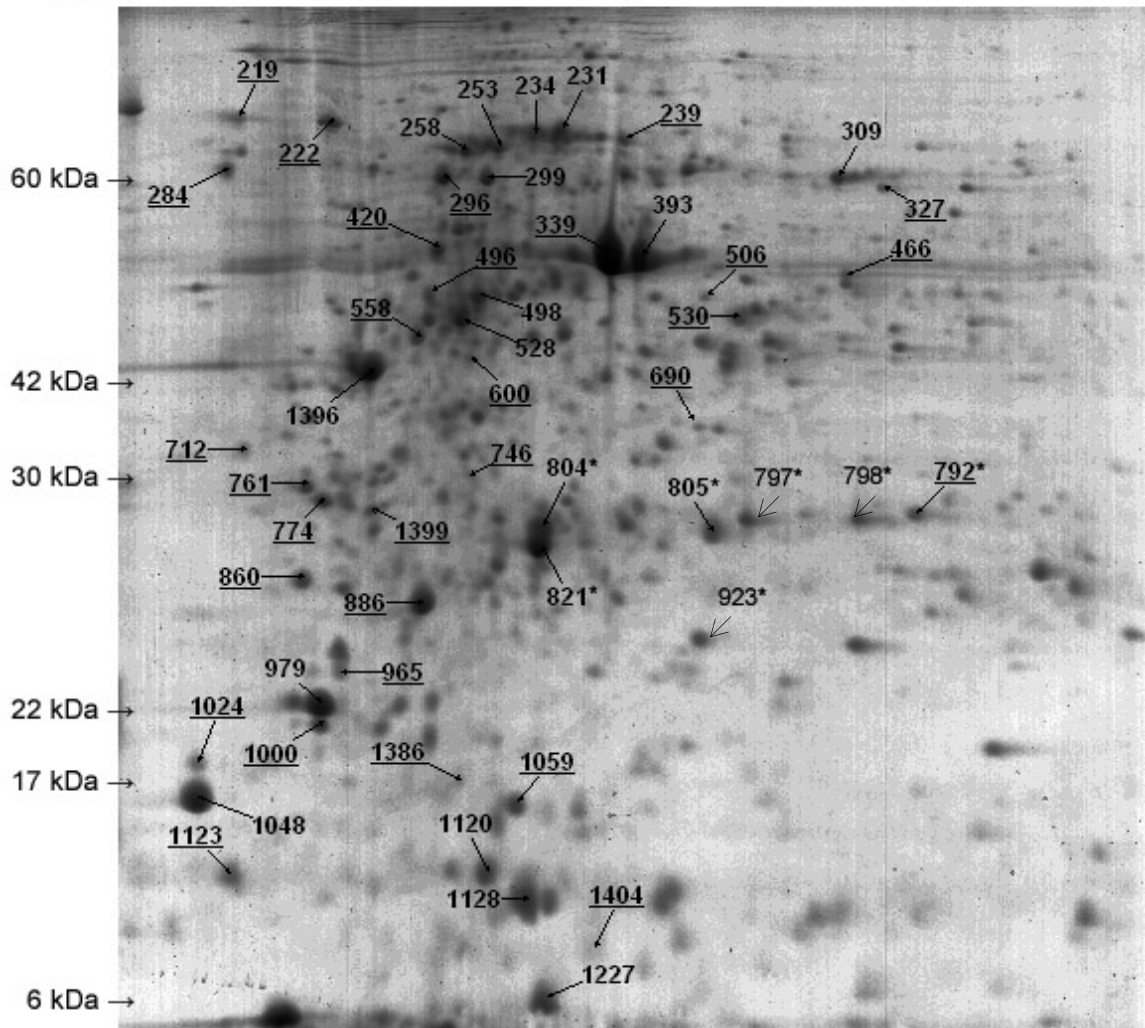
Tafla 10 sýnir númer þeirra próteindepla sem samkvæmt samanburði við 2D próteinprófil af einangruðu þorskatrypsíni (mynd 21) gætu verið trypsindeplar.

Tafla 10. Próteindeplar sem samkvæmt samanburði við staðsetningu próteindepla einangraðs þorskatrypsíns á 2D prófil geli gætu verið trypsín. Deplarnir voru sneiddir út til kennigreiningar.

Depilnúmer	Depilmagn B3-hópur		Depilmagn K-hópur		Margfaldur munur	t-test
	Meðaltal	SD	Meðaltal	SD		
792* ¹	0,178	0,031	0,270	0,020	1,5	0,007
797	0,264	0,065	0,412	0,128	1,6	0,097
798	0,352	0,072	0,352	0,028	1,0	0,991
804	0,872	0,152	1,159	0,262	1,3	0,124
805	0,679	0,129	0,534	0,035	1,3	0,122
821	3,431	0,325	3,786	0,446	1,1	0,273
923	0,258	0,066	0,275	0,044	1,1	0,712

*¹ Próteindeplar sem bætibakteríumeðhöndlunin hafði marktæk ($P \leq 0.05$) áhrif á.

Samkvæmt tölvugreiningu á stærð deplana jókst tjáning einungis í depli 805 við meðhöndlun með bætibakteríum. Deplarnir voru sneiddir út úr geli til kennigreiningar en hún mun staðfesta hvort um trypsín sé að ræða. Mynd 21 sýnir 2D próteinprófil af þorsklirfu-extrakti úr K-hóp (24 d.e.k.). Próteindeplarnir sem ákveðið var að sneiða út úr gelinu eru númeraðir á myndinni.



Mynd 21. 2D próteinprófill af þorsklirfuextrakti, sýni Kb. Próteinin voru dregin út í lausn og greind með 2D rafdrætti eins og lýst er í aðferðakaflanum. Próteinin voru lituð með colloidal Coomassie blue G250 litun. Próteinin voru öll sneidd út úr geli til peptíðmassagreiningar. Númer próteindepla sem bætibakteríumeðhöndlunin hafði marktækt áhrif á eru undirstrikuð. Númer próteindepla með * standa fyrir depla sem samkvæmt samanburði gætu verið trypsín. Önnur númer standa fyrir próteindepla sem höfðu stærstu meðalstærðina í báðum hópunum.

Mesta marktæka breytingin í tjáningu próteindepla við bætibakteríumeðhöndlun lifranna var í depli 466 (mynd 21). Tjáning próteindepils 466 jókst nær áttfalt (tafla 8).

4. ÁLYKTANIR OG LOKAORÐ.

Uppsetning og þróun sameindafræðilegra aðferða

Þessi verkþáttur tók lengri tíma en áætlað var í upphafi en valin var aðferðin T-RFLP (terminal-restriction length polymorphism). Út frá greiningum á hreinræktuðum stofnum og blöndu af þeim þá var hægt að aðlaga aðferðina að þeim sýnum sem vinna átti í þessu verkefni. Í sumum tilvikum koma þó fram aukatoppur sem ekki er auðvelt að útskýra en gæti stafað af ósértækum hliðarhvörfum í PCR hvarfinu eða þá að hreinræktin sem notaðar voru hafi ekki verið fullkomnlega hreinar en þetta eru óvissuþættir sem ekki er hægt að komast algerlega hjá og verður að taka með í reikningin við túlkun niðurstaðna. Hinsvegar er það svo að ríkjandi bakteríutegundir munu sýna margfalt sterkara merki og því er þessi óvissuþáttur ekki talinn hafa afgerandi áhrif á niðurstöður.

Samanburður var gerður á ræktanlegri bakteríuflóru annars vegar og hins vegar niðurstöðum greiningar á mynstri heildarflóru baktería (T-RFLP aðferð) í sýnum úr mismunandi eldiseininum. Í meginráttum voru niðurstöður þessara tveggja aðferða mjög sambærilegar, það er að segja að mynstur ræktanlegrar bakteríuflóru og heildarflóru baktería reyndist svipað. Þetta gæti bent til þess að sú flóra sem fyrir hendi er, sé að stórum hluta ræktanleg þótt heimildir gefi vísbendingar um hið gagnstæða (Verner-Jeffreys *et al.* 2003). Auk þess gætu þessar niðurstöður einnig stutt þá kenningu að aðferðir sem byggja á PCR mögnun á erfðaefni baktería (eins og T-RFLP aðferðin) séu ekki nægilega nákvæmar til að greina bakteríur sem ef til vill eru til staðar í litlum fjölda, þar sem með þessum aðferðum séu einungis greindar þær tegundir sem eru mest ríkjandi (Suzuki *et al.* 1996).

Tilraunir á fyrstu stigum lúðueldis:

Niðurstöður rannsókna á kortlagningu bakteríuflóru á hinum ýmsu stigum lúðueldis eru mjög sambærilegar með notkun beggja greiningaraðferða sem notaðar voru í verkefninu. Megin niðurstöður eru þær að fôðurdýr lúðulirfa reynast vera mjög misjöfn að gæðum með tilliti til heildarfjölda baktería svo og fjölda áætlaðra *Vibrio* baktería. Eins og áður hefur komið fram eru gæði fôðurdýra afar mikilvæg m.t.t. afkomu og gæða lirfa í startfóðrun og nauðsynlegt að halda bakteríufjölda þeirra í lágmarki. Bakteríufjöldi virðist fara vaxandi allt frá upphafi hrognatímabils svo og í lirfum í startfóðrun en helst nokkuð stöðugur á kviðpokastigi og er fjöldi baktería nokkuð lægri á þessu stigi eldisins.

Ræktanleg bakteríuflóra virðist vera frekar einsleit í fóðurdýrum með *Vibrio/Aeromonas* bakteríur ríkjandi en í hrognum og lirfum virðist flóran fjölbreyttari þótt *Aeromonas* bakteríur virðist einnig ná fótfestu þar. Fjöldi ræktanlegra *Vibrio* baktería helst í flestum tilvikum í hendur við heildarfjölda ræktanlegra baktería og er að jafnaði um einni log-einingu lægri. Þó reyndist í einstaka tilfellum um að ræða áberandi lækkun í fjölda ræktanlegra *Vibrio* baktería samanborið við heildarfjölda ræktanlegra baktería og í fóðurdýrum helst það gjarnan í hendur við mjög góð gæði fóðurdýra (góður vöxtur og litur). Niðurstöður benda því til að mikilvægt sé að ná niður fjölda *Vibrio* baktería í fóðurdýrum (10-100 bakt/g fóðurdýr). Í sérstaklega hrognum en einnig kviðpokalirfum er stórt hlutfall flóru sem svarar illa í greiningarprófum og er því ekki mögulegt að flokka til ætta, ættkvísla og/eða tegunda. Þetta er ekki tilfellið með ræktanlega flóru fóðurdýra og gefur það vísbendingar um að tegundir sem ræktast úr fóðurdýrum séu í örum vexti (blómstra) við þær aðstæður sem þar eru (Verner-Jeffreys *et al.* 2003).

Meðhöndlun með REMUS® í ákveðnum styrk (4g/25L) virðist skila fóðurdýrum af svipuðum gæðum og engin meðhöndlun, en meðhöndlun hroga með REMUS® virðist halda bakteríuflóru í hrognum stöðugri þar sem meiri sveiflur virðast vera í viðmiðunareiningum. Ekki er að sjá miklar breytingar á fjölda eða samsetningu bakteríuflóru við meðhöndlun með bætibakteríum á hroga og kviðpokastigi samanborið við í ómeðhöndluðum einingum en vísbendingar eru um að meðhöndlun með REMUS® leiði til einhæfari bakteríuflóru lirfa í startfóðrun. Niðurstöður fyrri rannsókna hafa gefið vísbendingar um að aukin lifun lirfa tengist fremur fjölbreytileika í bakteríuflóru (Björnsdóttir og Smáradóttir 2003). Meðhöndlun með bætibakteríum á mismunandi stigum eldisins virðist ekki hafa marktæk áhrif á afkomu lirfa samanborið við ómeðhöndlaðar eldiseiningar. Niðurstöður fyrri tilrauna í þessu verkefni (A og B) bentu eindregið til þess að REMUS® blandan gæti verið að styðja við eðlilegan þroska lirfa á kviðpokastigi þar sem hlutfall gapara reyndist vera mun lægra í meðhöndluðum einingum samanborið við viðmiðunarker. Ekki reyndist unnt að fá sambærilegar niðurstöður í endurtekningum tilrauna. Athygli vöktu niðurstöður rannsókna á mynstri bakteríuflóru í eldiseiningum með mestu og minnstu afkomu í einni tilraunauppsetninganna (bæði viðmiðunareiningar) en niðurstöður sýndu að litlar sveiflur voru í bakteríuflóru yfir eldistímabilið og að mun fjölbreyttari flóra reyndist í meltingarvegi lirfa þar sem afkoman var betri.

Af framangreindum niðurstöðum mætti draga þær ályktanir að bakteríutegundir sem notaðar eru í REMUS® bætibakteríublönduna, nái illa eða ekki fótfestu í eldisumhverfi á fyrstu stigum lúðueldis og hafi því ekki afgerandi áhrif á afkomu og gæði lirfa í startfóðrun. Endurtekinnar og viðvarandi meðhöndlunar virðist því þörf ef ná á árangri með þessari blöndu bætibaktería.

Tilraunir á fyrstu stigum þorskeldis:

Lifun lirfa reyndist fremur slök í viðmiðunarhóp (K) og benda niðurstöður til að meðhöndlun með bætibakteríum gefi góða raun á fyrstu stigum þorskeldis Lirfur í viðmiðunarhópum reyndust vera í meðallagi þungar og virtist meðhöndlun með bætibakteríum því ekki hafa afgerandi áhrif á þyngd lirfanna (vöxt). Af þessu má draga þá ályktun að meðhöndlun geti bætti lifun en hafi ekki áhrif á vöxt lirfa. Tekið er fram að ekki fékkst jafn mikið magn af hrognum í tilraunirnar og vonast hafði verið til og því einungis tvær eldiseiningar á bak við hverja meðhöndlun. Æskilegt hefði verið að hafa amk. fjóra samskonar hópa innar hvernar meðhöndlunar eða að endurtaka tilraunir til þess að fá betri mynd af mun á milli hópa og betri marktækni á niðurstöður, líkt og gert var í tilraunum í lúðueldi Fiskey ehf. Rannsóknir hafa auk þess sýnt fram á aukinn vöxt fæðudýra sem meðhöndluð eru með bætibakteríum (Rombout *et al.* 2001) en ekki voru gerðar athuganir á því í þessari tilraun.

Meðhöndlun frá upphafi hrognastigs (B1) gaf ekki góða lifun lirfa en betri lifun fékkst við meðhöndlun frá upphafi lirfustigs (B2) og þegar meðhöndlaðar lirfur voru fóðraðar á meðhöndluðum fóðurdýrum (B3). Á lirfustigi eru lirfurnar berskjaldaðar og bakteríur eiga ekki jafn greiðan aðgang inn í hrogn samanborið við inn í lirfur sem byrja að gleypa eldisvökva fljótlega eftir klak. Líklegt er því talið að meiri áhrif hafi að meðhöndla með bætibakteríum á lirfustigi og benda niðurstöður til þess að svo sé.

Rannsóknir hafa sýnt að meltingarensímið trypsín gegnir lykilhlutverki í meltingu fæðu á þessu tímabili. Framboð og virkni trypsíns í lirfunum er því afar mikilvægt fyrir lífvænleika lirfa sjávarfiska. Greining próteinmengja (2D) sýndi að fjöldi próteina voru tjáð í marktækt í meira eða minna magni í lirfum sem meðhöndlaðar voru með bætibakteríum samanborið við viðmiðunarhóp. Fjöldi þessara próteindepla voru sneiddir úr geljunum og tegundagreindir. Samanburður við 2D próteinprófil af einangruðu

Þorskatrypsíni sýndu að hluti þessara depla gætu verið trypsíndeplar og samkvæmt tölvugreiningu á stærð deplanna jókst tjáning á einu þessara próteina við meðhöndlun með bætibakteríum. Mesta marktæka breytingin í tjáningu próteindepla við meðhöndlun með bætibakteríum var nær áttföld aukning í tjáningu ákveðins próteindepils en samkvæmt próteinprófil af einangruðu þorskatrypsíni var það ekki trypsin.

Að lokum má geta þess að æskilegt hefði verið að framkvæma tilraunina yfir lengri tíma og skoða einnig áhrif bætibaktería á artemíu og fóðrun með artemíu. Þá hefði verið hægt að svara því hvort liffur fóðraðar með bætibakteríu meðhöndlaðri artemíu hefðu sýnt betri lifun eins og fóðrun með meðhöndluðum hjóldýrum sýndi. Einnig hefði verið áhugavert að rannsaka hvort liffur meðhöndlaðar með bætibakteríum bæði á hrognastigi og lifrustigi stæðu betur að vígi. Hér var látið nægja að meðhöndla með bætibakteríum einungis á hrognastigi (B1) og eingöngu á lifrustigi (B2) auk fóðrunar með meðhöndluðum fóðurdýrum (B3). Áhugavert hefði verið að rannsaka áhrif þess að meðhöndla með bætibakteríum frá hrognastigi og verður það vafalítið gert í framhaldinu þar sem niðurstöður þessara tilrauna voru lofandi.

5. KOSTNAÐUR

Heildarkostnaður verkefnisins var í umsókn áætlaður kr. 14.777 M króna og var stór hluti kostnaðar framlag Fiskey ehf. Á síðara verkefnisári var jafnframt tekin ákvörðun um að auka fjölda endurtekninga og tilraunauppsættinga í lúðueldi Fiskey ehf. og var sá kostnaður að stærstum hluta framlag fyrirtækis. Auk veglegrar viðbótarfjármögnunar annarra þátttakenda í verkefni, var verkefnið styrkt með 8,9 M króna úr AVS sjóðnum og um 1M króna frá Norrænu Atlantsnefndinni (Nordisk Atlantssamarbeide).

6. ÞAKKARORÐ

Aðstandendur verkefnisins vilja þakka Fiskey ehf. fyrir mjög gott samstarf og umfangsmikla aðkomu að skipulagi og framkvæmd verkefnisins. Starfsmönnum tilraunastöðvar Hafrannsóknarstofnunar að Stað er jafnframt þakkað ómetanleg aðstoð við skipulag og framkvæmd tilrauna þar. Auk þess er AVS sjóðnum þakkað fyrir rausnarlegt framlag sitt sem gerði framkvæmd verkefnisins mögulega. Norræna Atlantssjóðnum (Nordisk Atlantssamarbeide) er einnig þakkað þeirra framlag til verkefnisins.

7. HEIMILDIR

- Aakra, A. JB. Utaker & IF. Nes.** 1999. *RFLP of rRNA genes and sequencing of the 16S-23S rDNA intergenic spacer region of ammonia-oxidizing bacteria: a phylogenetic approach.* Int. J. Syst. Bacteriol. **49**(1):123-130.
- Aragao, C., LE. Conceicao. MT. Dinis. & H. Fyhn.** 2004. *Amino acid pools of rotifers and Artemia under different conditions; nutritional implications for fish larvae.* Aquaculture **234**:429-445
- Árnason J.** 2004. *Fóður og fóðurgerð fyrir þorsk.* Í: Þorseldi á Íslandi. Björn Björnsson og Valdimar Ingi Gunnarsson (ritsjórar). Hafrannsóknarstofnunin. Fjölrit nr. 111.
- Balompapung, MD., N. Munuswamy. A. Hagiwara & K. Hirayama.** 1997. *Effect of disinfectants on the hatching of marine rotifer resting eggs of Brachionus plicatilis Muller.* Aquaculture Res. **28**:559-565.
- Benavente, GP. & F. Gatesoupe.** 1988. *The continuous distribution of rotifers increases the essential fatty-acid reserve of Turbot larvae, Scophthalmus-Maximus.* Aquaculture. **72**(1-2): 109-114.
- Benavente, GP. & F. Gatesoupe.** 1988. *Bacterial associated with cultured rotifers and artemia are detrimental to larval turbot, Scophthalmus-Maximus L.* Aquacultural Engineering **7**(4): 289-293.
- Bernard, L. H. Schaefer, F. Joux, C. Courties, G. Muyzer & P. Lebaron.** 2000. *Genetic diversity of total, active and culturable marine bacteria in coastal seawater.* Aquat. Microb. Ecol. **23**(1):1-11.
- Björnsdóttir, R & H Smáradóttir.** 2003. *Stýring örveruflóru í startfóðrunarkerjum lúðulirfa (Rannís verk.# 010 840 001).* Lokaskýrsla. # 21-03.
- Blaxter, JHS.** 1988. *Pattern and variety in development.* Hoar, W.S. & Randall, D.J. (ritstj.) Fish Physiology, Vol XIA. Academic Press, San Diego: 377-435.
- Brown, J.A., Minkoff, G. & Puvanendran, V.** 2003. *Larviculture of Atlantic cod (Gadus morhua): progress, protocols and problems.* Aquaculture **227**(1-4):357-372.
- Dhert P., G. Rombaut. G. Suantika. & P. Sorgeloos.** 2001. *Use of the brine shrimp, Artemia spp., in marine fish larviculture* Aquaculture. **200**(1-2):147-159
- Difco Laboratories** (1998). *Difco Manual.* 11. útgáfa. Maryland 21152 USA.
- Gatesoupe, F.J.** 1999. *The use of probiotics in aquaculture.* Aquaculture. **180**:147-165.
- Giuliano, L, M DeDomenico, E De Domenico, MG Hoefle & MM Yakimov.** 1999. *Identification of Culturable Oligotrophic Bacteria within Naturally Occurring Bacterioplankton Communities of the Ligurian Sea by 16S rRNA Sequencing and Probing.* Microb.Ecol. **37**(2):77-85.
- Halami, PM, A Chandrashekar & R Josehp.** 1999. *Characterization of bacteriocinogenic strains of lactic acid bacteria in fowl and fish intestines and mushroom.* Food Biotechnol. **13**(2):121-136.
- Jensen, S, O Bergh, O Enger & B Hjeltnes.** 2002. *Use of PCR-RFLP for genotyping 16S rRNA and characterizing bacteria cultured from halibut fry.* Can.J Microbiol. **48**(5):379-386.
- Lavens, P. & Sorgeloos, P.** 1996. *Manual on the Production and use of live food for aquaculture.* Food an Agriculture organization og the United nations. ISBN:92-5-103934-8.
- Lavens, P., G. Merchie. & P. Sorgeloos.** 1998. *Critical review of the larval fish and crustacean feeding methods with ascorbic acid enriched diets: effects on fish and shrimp growth, stress and disease reistance.* Conference of the World Aquaculture Society. Las Vegas. USA: 316
- Liebler, D.C.** 2002. *Introduction to Proteomics.* Humana Press, Totowa, NJ.
- Liu, W.T., T.L. Marsh, H. Cheng & L.J. Forney.** 1997. *Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA.* Appl Environ Microbiol. **63**(11): 4516-22.
- Lubzens E., O. Gibson. O. Zmora. & A. Sukenik.** 1995. *Potential advantages of frozen algae (Nannochloropsis) for rotifer (Branchionus plicatilis) culture.* Aquaculture. **133**:295-309.
- Macey, BM. & VE. Coyne.** 2005. *Improved growth rate and disease resistance in fanned Haliotis midae through probiotic treatment.* Aquaculture. **245**:249-261.
- Makridis, P, & AJ Fjellheim, J Skjermo & O Vadstein.** 2000. *Colonization of the gut in first feeding turbot by bacterial strains added to the water or bioencapsulated in rotifers.* Aquaculture Int. **8**:367-380
- Makridis, P, AJ Fjellheim, J Skjermo & O Vadstein.** 2000. *Control of the bacterial flora of Brachionus plicatilis and Artemia franciscana by incubation in bacterial suspensions.* Aquaculture. **185**:207-218

- Merchie, G., P. Lavens & P. Sorgeloos.** 1997. *Optimization of dietary vitamin C in fish and crustacean larvae.* Aquaculture. **155**:165-181.
- Moeseneder, M.M., J.M. Arrieta, G. Muyzer, C. Winter & G.J. Herndl.** 1999. *Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis.* Appl Environ Microbiol. **65**(8):3518-25.
- Moretti A., M. Pedini Fernandez-Criado, G. Cittolin & R. Cuidastri** 1999. *Manual on hatchery production of seabass and gilthead seabream.* Vol. 1. FAO, Rome :194
- Nicolas IL., E. Robic. & D. Anquer.** 1989. *Bacterial flora associated with a trophic chain consisting of microalgae, rotifers, and tubot larvae: influence of bacteria on larval survival.* Aquaculture. **83**:237-248.
- Olafsen, JA.** 2001. *Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture.* Aquaculture. **200**:223-247.
- Olsen, Y., T. Van der Meeren. & KI. Reitan.** 2004. *First feeding technology.* Culture of Cold-Water Marine Fish. 279-336
- Osborn, A.M., E.R., Moore & K.N., Timmis.** 2000. *An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics.* Environ Microbiol. **2**(1):39-50
- Ottesen, OH & JA Olafsen.** 2000. *Effects on survival and mucous cell proliferation of Atlantic halibut, Hippoglossus hippoglossus L., larvae following microflora manipulation.* Aquaculture. **187**(3-4):225-238
- Péres, A., JL. Zambonino Infante & C.Cahu.** 1998. *Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass (Dicentrarchus labrax) larvae.* Fish Physiology Biochem. **19**:145-152.
- Ringø, E., & TH. Birkbeck.** 1999. *Intestinal microflora of fish larvae and fry.* Aquaculture Res. **30**:73-93.
- Rojas-García CR. & I. Rønnestad.** 2002. *Cholecystokinin and tryptic activity in the gut and body of developing Atlantic halibut larvae: evidence for participation in the regulation of protein digestion.* Fish Phys. Biochem. **61**:973-986.
- Rombout. G.** 2001. *Control of the microbial community in rotifer cultures.* Ghent University : 194.
- Rønnestad I, S. Helland. & Ø. Lie.** 1998. *Feeding Artemia to larvae of Atlantic halibut (Hippoglossus hippoglossus) results in lower larval vitamin A content compared with feeding copepods.* Aquaculture. **165**:159-164.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Worm, O. & Mann, M.** 1996. *Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels.* Anal Chem. **68**: 850-858.
- Skjermo, J. & O. Vadstein.** 1999. *Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae.* Aquaculture. **177**:333-343.
- Skjermo, J. & O. Vadstein,** 1993. *Characterization of the bacterial-flora of mass cultivated Brachionus-Plicatilis.* Hydrobiologia. **255**:185-191
- Steinarsson, A.** 2004. *Porskeiði. Í Þorskeldi á Íslandi.* Björn Björnsson og Valdimar Ingi Gunnarsson (ritstj.). Reykjavík Hafrannsóknarstofnun. Fjölrit 111:41-86.
- Suzuki, M.T., & Giovannoni, S.J.** 1996. *Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA gene-based community analysis.* Appl. Environ. Microbiol. **62**:625-6
- Sveinsdóttir, H., Thorarensen, H. & Gudmundsdóttir, Á.** 2006. *Involvement of trypsin and chymotrypsin activities in Atlantic cod (Gadus morhua) embryogenesis.* Aquaculture. **260**:307-314.
- Sweetman, J.W., C. Aguilera Jimenez. C. Rodoella. JJ. Swing. JG.Ollevier. & F. P. Sorgeloos.** 1998. *Hygiene management and disease prevention in marine fish larviculture, by the adjustment and control of the microbiological environment: Third european marine science and technology conference: 97-100.*
- Verner-Jeffreys, DW, RJ Shields, IR Bricknell & TH Birkbeck.** 2003. *Changes in the gut-associated microflora during the development of Atlantic halibut (Hippoglossus hippoglossus L.) larvae in three British hatcheries.* Aquaculture. **219**:21-42.
- Wilm, M., Shevchenko, A., Houthaeve, T., Breit, S., Schweigerer, L., Fotsis T. & Mann, M.** 1996. *Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry.* Nature. **379**: 466-469.