

Vinnsla og vöruþróun
Processing and Product
Development

Líftækni
Biotechnology



Matvælaöryggi
Food Safety



Forvarnir í fiskeldi. A-hluti – Forvarnir í þorskeldi

Hélène L. Lauzon
Sigríður Guðmundsdóttir
Agnar Steinarsson
Matthías Oddgeirsson
Bergljót Magnadóttir
Ívar Örn Ásgeirsson
Berglind Gísladóttir
Eyjólfur Reynisson
Sólveig K. Pétursdóttir
Þuríður Ragnarsdóttir
Maja Herold Pedersen
Birgitte B. Budde
Bjarnheiður K. Guðmundsdóttir

Vinnsla og vöruþróun

Skýrsla Matís 53-07
Desember 2007

ISSN 1670-7192

Titill / Title	Forvarnir í fiskeldi. A-hluti – Forvarnir í þorskeldi		
Höfundar / Authors	<i>Hélène L. Lauzon, Sigríður Guðmundsdóttir, Agnar Steinarsson, Matthías Oddgeirsson, Bergljót Magnadóttir, Ívar Örn Ásgeirsson, Berglind Gísladóttir, Eyjólfur Reynisson, Sólveig K. Pétursdóttir, Púriður Ragnarsdóttir, Maja Herold Pedersen, Birgitte B. Budde og Bjarnheiður K. Guðmundsdóttir</i>		
Skýrsla / Report no.	53 - 07	Útgáfudagur / Date:	Desember 2007
Verknr. / project no.	1580		
Styrktaraðilar / funding:	AVS sjóður (R 41-04)		
Ágrip á íslensku:	<p>Markmið A-hlutans var að auka hagkvæmni við stríðeldi þorsks með því að auka lifun hrognalirfa og stuðla að auknum vexti lirfa í startfóðrun. Niðurstöður sýna að samsetning örveruflórunnar skýrði betur afföll en heildarörveru- eða <i>Vibrio</i> talningar. Víðtæk greining á örveruflóru eldiskerfa og afkomutölur á lirlustigi leiddu til ákvörðunar á æskilegum og óæskilegum bakteríum. Efnamælingar við þorskeldi á hrogn- og lirlustigi sýndu að lítil uppsöfnun efna átti sér stað í eldisvökvanum, nema við upphaf þurrfóðrunar. Val bætibaktería var ákveðið út frá ákveðnu skimunarferli og væntanlegri notkun við þorskeldi. Notkun bætibaktería við böðun hrognalirfa og/eða lirfa var skoðuð en samfelld böðun frá hrognastigi áfram yfir í lirlustigið leiddi yfirleitt til betri afkomu, meiri vaxtar og lífsþróttar. Einnig hafði notkun bætibaktería áhrif á örveruflórana og þroskun lirfa stuttu eftir klak, sem var m.a. staðfest með mælingum á próteinum úr ónæmiskerfinu. Notkun bætibaktería í seiðaeldi var könnuð og benti hún til aukins vaxtarhraða. Ekki tókst að sanna að aukið sjúkdómsspól næðist með notkun bætibaktería við seiðaeldi, en jákvæðar vísbendingar fengust þar um. Helstu flöskuhálsar við þróun forvarnaraðferða voru lifandi fæðudýrin, sem höfðu í för með sér mikið örveruálag. Þróun probiótískra hjóldýra með öðrum bætiörverum gaf ekki góða raun. Athuganir á sýkingarmætti bætibakteríanna í þorskseiðum sýndu að þær ollu hvorki sjúkdómseinkennum né orsökun dauða.</p>		
Lykilorð á íslensku:	<i>Þorskeldi – fyrstu stig eldisins – forvarnir - bætibaktería – örveruflóra - efnaálag</i>		
Summary in English:	<p>The aim was to increase the competitiveness and success of cod aquaculture by increasing survival and development from hatching through the larval stage. This was achieved by developing preventive methods to control important chemical and biological parameters. The results revealed that differences in microbiota composition between different larval treatments explained the success or lack thereof, better observed than total microbial or <i>Vibrio</i> counts of rearing water or larvae. Microbiota analysis and survival rates have hence led to the definition of desirable and undesirable bacteria, the latter being especially <i>Vibrio</i> sp. Assessment of selected chemical parameters was performed at pre- and post-hatching periods, indicating NH₃ build-up in the rearing water upon dry feeding. The selection of probiotic bacteria was based on a specific screening and their anticipated use in cod farming. Application of selected bacteria was tested for surface treatment of eggs and/or larval bathing, and the continuous use before and after hatching usually led to increased survival, growth and tolerance as well as influencing larval microbiota and immunological development. Application of selected probiotic bacteria was also tested with cod juveniles with increased growth rate. Disease resistance of probiotic-fed juveniles to fish pathogens was not confirmed. Development of probiotic rotifers proved difficult due to their high microbial load. Probiotic strains applied i.p. to cod juveniles were not found to be virulent.</p>		
English keywords:	<i>Cod aquaculture – first developmental stages – preventive measures – probiotic bacteria – microbiota – chemical load</i>		

EFNISYFIRLIT

1. INNGANGUR	1
2. SAMANTEKT: FORVARNIR Í ÞORSKELDI	3
2.1. Kortlagning á örveruflóru þorskeldisins.....	3
2.2. Mat á lífrænu og ólífrænu efnaálagi í fiskeldi.....	8
2.3. Skilgreining á þeim þáttum sem hafa áhrif á afkomu og þroska lirfa.....	11
2.4. Einangrun, greining og val æskilegra baktería (bætibaktería)	12
2.5. Notkun valinna bætiörvera við þróun forvarnaraðferða.....	14
2.5.1. Mögnun/ ræktun bætibaktería	15
2.5.2. Þróun próbótískra lifandi fæðudýra.....	15
2.5.3. Fortilraunir á notkun æskilegra baktería við böðun hrogna/ lirfa	16
2.5.4. Fortilraunir með notkun próbótískra lifandi fæðudýra.....	16
2.5.5. Notkun bætibaktería við seiðaeldi: böðun seiða	17
2.5.6. Val forvarnaraðferða til frekari rannsókna	19
2.6. Prófun forvarnaraðferða - lokatilraunir	19
2.6.1. Sannprófun þróaðra forvarnaraðferða á fyrri stigum þorsklirfueldis	19
2.6.2. Notkun bætibaktería við þurrfóðrun í seiðaeldi	21
2.6.3. Sýkingartilraunir á þorskseiðum eftir þurrfóðrun með bætibakteríum.....	23
3. UMRÆÐA	25
4. LOKAORÐ	28
5. ÞAKKAORÐ	28
6. HEIMILDIR	29
VIÐAUKI A: KYNNINGARSTARFSEMI A-HLUTANS – FORVARNIR Í ÞORSKELDI	33

1. INNGANGUR

Aukið eldi sjávarfiska í löndunum við norðanvert Atlantshaf getur haft mikil áhrif á markaðssetningu og útflutning fisks frá Íslandi. Þar sem búast má við samdrætti í sjávarafli á komandi árum er nauðsynlegt að efla eldi sjávartegunda svo að Íslendingar haldi hlut sínum á erlendum mörkuðum. Því er mikilvægt að efla þróun þorskeldis hér á landi svo það geti orðið arðbært og samkeppnishæft. Eitt margra viðfangsefna er að bæta afkomu á fyrstu eldisstigum en mikil afföll geta verið í lirfuhópum fyrst eftir klak. Umhverfisþættir skipta hér sköpum, jafnt lífrænir sem og eðlis- og efnafræðilegir. Við slæmar aðstæður geta bæði sýklar og svokallaðir tækifærissýklar náð að margfaldast og valda miklum dauða. Eins og sakir standa, er raunhæft að reikna með því að 70-80% hroгна klekist, en 20% þorsklirfa nái að þroskast til smáseiðastigs [1]. Mikilvægt er fyrir afkomu klakstöðva að draga verulega úr þessum dauða með því að leita lausna sem gera eldisstígræði betri og stöðugri.

Hafrannsóknastofnun hefur unnið að þróun þorskeldis á Tilraunaeldistöð sinni á Stað við Grindavík frá því 1994. Stærstu verkefni hafa lotið að þróun klaks og eldi ungvíðis til framleiðslu smáseiða í áframeldi. Væntingar um mikla uppbyggingu þorskeldis hér á landi á næstunni byggja m.a. á því að nægt framboð verði af góðum eldisseiðum. Dánartala fyrstu vikunnar eftir klak hefur farið lækandi í þorsklirfum á Stað undanfarin ár, en er enn of há eða 80-90 % [1]. Aðalástæða þessa er einkum talin vera bakteríuvöxtur í eldisjónum og lengi voru notuð sýklalyf til að minnka þennan vanda, sem er afar óæskilegt. Mjög mikilvægt er rannsaka og meta áhrif þeirra þátta sem hafa áhrif á lífsþrótt lirfanna. Þróa þarf aðferðir sem ýta undir jákvæða þætti og draga úr áhrifum hinna neikvæðu.

Undanfarin 10 ár hafa verið unnin mörg rannsóknarverkefni við **Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum** á sviði sjúkdóma- og ónæmisfræði sjávarfiska, vegna áforma um eldi. Mest áhersla hefur verið á rannsóknir á sjúkdómsvöldum, bólusetningartilraunum og ónæmiskerfi þorsks, lúðu og sandhverfu [2-8]. Sérfræðingar á Keldum, í samvinnu við rannsóknahópa í fjórum löndum, voru m.a. aðilar að Evrópuverkefni, sem nýlega er lokið, um rannsóknir á þroskun ónæmiskerfisins í nokkrum fisktegundum og áhrifum s.k. ónæmisglæða á sjúkdómsvarnir á fyrstu stigum eftir klak. Rannsóknir á þorski komu í hlut rannsóknahópsins á Keldum. Niðurstöður verkefnisins benda til þess að notkun ónæmisglæða geti virkað vel [9-12]. Þá hafa vísindamenn á Keldum ítrekað einangrað bakteríu af *Vibrio* ættinni úr hraustum seiðum á tilraunaeldisstöðinni á Stað og frumrannsóknir benda til þess að hún hafi jákvæð áhrif á lífsþrótt þorsklirfa. Margar *Vibrio* tegundir eru í sjó og sjávarfiski og sumar þeirra eru þekktir sjúkdómsvaldar.

Umhverfisþættir hafa bein áhrif á afkomu ungvíðis á fyrstu eldisstígunum. Í verkefnum **Rannsóknastofnunar fiskiðnaðarins (Rf)** á árunum 1998-2003 var gerð könnun á örveruflóru í eldisjó lúðulirfa sem leiddi í ljós nauðsyn þess að þekkja þá þætti sem hafa áhrif á þróun og samsetningu hennar [13]. Þannig hefur magn lífrænna efna áhrif á blómgun örveruflórunnar sem getur orðið lirfum á frumstigi banvæn. Þá kom í ljós að miklu skipti hvernig örverusamsetning var í fæðudýrum og lifandi þörungum sem notaðir eru á þessu stigi. Breytingar sem hafa verið gerðar á grundvelli þessarar vitneskju hafa leitt til minni örverumengunar og betri lifunar. Frekari rannsókna er þörf til að ná betri tókum á þessum þáttum án notkunar sýklalyfja. Skortur er á aðgengilegum heimildum um rannsóknir á þessum þáttum og er líklegt að hörð samkeppni innan eldisgeirans eigi þátt í

Því. Notkun sýklalyfja í eldi getur skilað miklum árangri þegar bakteríusjúkdómar koma upp, en mikil notkun þeirra getur getið af sér bakteríustofna með lyfjaónæmi. Bóluefni eru fánleg gegn nokkrum sjúkdómsvöldum í sumum fisktegundum. Til dæmis er aðeins til bóluefni gegn einum sjúkdómi í þorski sem er víbríuveiki. En stungubóluefni er ekki hægt að nota gegn sjúkdómum í lirfum og smæstu seiðunum svo þar verður að leita annarra leiða. Rannsóknir á þroskun ónæmiskerfisins í fiski eru fáar, en vitað er að talsverður munur er milli fisktegunda á því hversu hröð þroskunin er og hvenær kerfið er komið til fulls þroska [14].

Notkun baktería/örvera sem veita lífverum vörn, þ.e. **bætibaktería/örvera**, getur væntanlega komið að gagni við að draga úr sýkingum í eldi og stuðla að stöðugleika í umhverfi fisksins. Bætibakteríur eru lifandi bakteríur sem gefnar eru í fóðri manna og dýra. Þær koma hýslinum til góða með því að stuðla að heppilegri samsetningu örvera í meltingarvegi [15]. Sýnt hefur verið fram á hemjandi áhrif örvera úr meltingarvegi lirfa/fisks á sjúkdómsvaldandi bakteríur. Notkun bætibaktería með slíka eiginleika getur dregið úr dauða og aukið vöxt. Æskilegt er að efla rannsóknir á þessu sviði svo unnt verði að beita slíkum aðferðum í auknum mæli. Brýn þörf er á meiri vitneskju um samhengi milli arfgerðar/svipgerðar örverunnar “í tilraunaglösom” og virkni hennar í lífverunni [16]. Bætibakteríur eru mikið notaðar í manneldi sem og húsdýraeldi og hafa gefið góða raun [15, 17-18]. Erlendar rannsóknir hafa sýnt að örverur einangraðar úr fiski geta hamlað vexti sýkla [19-23]. Því er mikilvægt að skima fyrir slíkum örverum. Niðurstöður nokkurra slíkra rannsókna hafa verið birtar en flestar rannsóknanna hafa verið gerðar í fiski af stærðinni 10-500 g.

Vöxtur baktería á hrognum getur valdið miklum vandkvæðum því súrefnisupptaka minnkar og dauði eykst. Þekking á því hvaða bakteríur geta fest sig við hrogn er afar takmörkuð, raunar mest bundin við laxahrogn. Skömmu eftir klak, áður en fóðurdýr eru gefin, er samsetning bakteríuflóru í meltingarvegi lík þeirri sem finnst á hrognunum [24]. Því má ætla, að meðhöndlun hroгна með æskilegri flóru, þ.e. bætibakteríum, stuðli að bættri afkomu bæði hroгна og lirfa. Engin slík rannsókn hefur enn verið birt og því orðið tímabært að gera slíka rannsókn. Sótthreinsun hroгна er nú þegar hluti eldisferils sem dregur úr bakteríuálagi og eykur lifun á lirfustigi.

Meltingarvegurinn er vanþroska á fyrstu lirfustigum og litlu magni meltingarhvata er seytt. Reikna má með að örveruflóran á þessu stigi sé ekki sérhæfð, heldur endurspegli umhverfið og það sem berst í lifandi fæðudýrum. Aukin þekking á örveruflórunni, samsetningu hennar, uppruna og áhrifum hennar á lífsþrótt og þroskun lirfanna hlýtur að vera mikilvæg í því augnamiði að geta stýrt henni til hagstæðrar samsetningar. Sem dæmi má nefna þá er vitað að of mikið framboð sumra næringar- og snefilefna svo sem fitu í fóðurdýrum og járn í þurrfóðri getur ýtt undir vöxt óæskilegra baktería svo sem ýmissa Víbríubaktería.

Þess er vænst, að notkun bætibaktería, eða annarra örvera með hliðstæða verkun, eigi eftir að koma að miklu gagni í eldi fisks og skelja og draga úr óæskilegri notkun sýklalyfja. Vegna þess hve mikill munur er milli eldisstiga, tegunda og eldisgerða er þörf á umfangsmiklum rannsóknum til að greina hvað gagnast best til að bæta ytri skilyrði. Þetta er ekki síst við um frumstig lirfueldis þar sem dánartalan er hæst.

Heildarmarkmið verkefnisins var að auka þekkingu á ýmsum þáttum á fyrstu stigum þorskeldis og auka samkeppnishæfni með því að lækka dánartölu á fyrstu vikunum eftir klak. **Aukin þekking fólst fyrst og fremst í:**

- 1) skilgreiningu á líf- og efnafræðilegum þáttum eldisins, sem hafa neikvæð áhrif á afkomu og þroska lirfa, frá klaki til loka lirfuskeiðs, en á því tímabili eru afföllin hvað mest.
- 2) einangrun og greiningu á æskilegum bakteríum úr eldisumhverfinu.
- 3) grunnrannsóknunum á virkni valdra bætibaktería, m.t.t. fiskeldisaðstæðna, festingareiginleika þeirra á yfirborði hrogna eða í meltingarvegi lirfa/seiða, ónæmisörvandi áhrifa þeirra á lirfur/seiði, og á leiðum til að auka og viðhalda vexti bætibaktería í eldisumhverfinu.
- 4) þróun forvarnaraðferða sem munu hindra vöxt óæskilegra/ sjúkdómsvaldandi baktería og leiða til þess að ásættanlegt efna- og líffræðilegt jafnvægi náist í eldisumhverfi lirfanna.

2. SAMANTEKT: FORVARNIR Í ÞORSKELDI

“**Forvarnir í fiskeldi**” var þriggja ára verkefni (2004-2007) þar sem áhersla var lögð á að finna leiðir og þróa aðferðir til að greina og bæta umhverfisþætti í lúðu- og þorskeldi á frumstigi eldisins, þ.e. frá klaki til loka lirfuskeiðs, en á því tímabili eru afföllin hvað mest. Tímasetning tilraunanna tengdist hrygningartímabilum í eldinu, sem er á vorin hjá þorski en þrisvar sinnum á ári hjá lúðu.

Verkefnið skiptist í tvo meginhluta: A– FORVARNIR Í ÞORSKELDI og B- FLOKKUN ÖRVERA – PROBIOTIKA TILRAUNIR (lúða og þorskur). Verkefnisstjóri A-hlutans var Hélène L. Lauzon á Matís. Aðrir þátttakendur þess hluta verkefnisins voru Tilraunastöð HÍ í meinafræði (Sigríður Guðmundsdóttir og samstarfsfólk á Keldum) og Tilraunaeldisstöð Hafrannsóknastofnunarinnar (Agnar Steinarsson og samstarfsfólk á Stað við Grindavík). Verkefnisstjóri B-hlutans var Arnar F. Jónsson hjá Fiskey ehf og aðrir þátttakendur voru Matís á Akureyri/Háskólinn á Akureyri (Rannveig Björnsdóttir), Náttúrufræðistofnun Íslands Akureyrarsetur (Viktor Mar Bonilla, NÍA), Raunvísindadeild Háskóla Íslands (Ágústa Guðmundsdóttir) og Hólaskóli (Helgi Thorarensen). B-hlutanum lauk 2006 og hefur skýrsla um hann verið gefin út [25].

Í **A-hlutanum** var áherslan lögð á aukna þekkingu á líf- og efnafræðilegum þáttum þorskeldisins í heild sinni, jákvæðum sem neikvæðum; skilgreiningu á þeim þáttum þorskeldisins sem hafa áhrif á afkomu og þroska þorsklirfa; greiningu æskilegra örvera (bætibaktería), þróun og prófun forvarnaraðferða. Þessi skýrsla fjallar um A-hlutann eingöngu, sem skiptist í 6 verkþætti.

2.1. Kortlagning á örveruflóru þorskeldisins

Markmiðið var að kortleggja örveruflóru þorskeldisins í tilraunaeldisstöð Hafrannsóknastofnunarinnar (Staður í Grindavík), í hefðbundnu kerfi í samanburði við ómeðhöndlað kerfi, auk þess að gera skipulega leit að sjúkdómsvaldandi bakteríum á fyrstu stigum eldisins. **Áætlaður afrakstur** var öflun gagna til (i) mats á örveruálagi í þorskeldi, við óæskilegar og hefðbundnar aðstæður, og (ii) skilgreiningar á þáttum sem hafa áhrif á afkomu og þroska lirfa; (iii) einangrunar á bakteríum til frekari rannsókna í öðrum verkþáttum.

Eldistímabilið sem var skoðað spannaði fyrstu tvo mánuði: fyrstu 13 dagar fyrir klak (hrognastig); og lirfustigið (27 dagar í tilraunasilóum með lifandi fôðrun eða 56-60 dagar í

hefðbundum kerum). Vegna erfiðleika við fyrstu tilraun vorið 2004, þar sem lifurnar í tilraunasílóum dóu 23 dögum eftir klak, var ákveðið að skoða einnig örveruflóruna við tilraunina vorið 2005 til þess að gera gagnasöfnunina öflugri og viðtækari. Þessar viðbótarupplýsingar eru mikilvægar til þess að komast betur að því hvaða örverur eru skaðlegar og hvaða áhrif mismunandi meðferð hefur á samsetningu örveruflórunnar.

Leitin af þekktum fisksjúkdómabakteríum fór fram á Stað, Tilraunaeldisstöð Hafrannsóknastofnunar, vorið 2004 bæði á hrogn- og lifrustigi þorskeldisins, m.t.t. *Aeromonas salmonicida* undirtegund *achromogenes*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida*, *Moritella viscosa* og *Yersinia ruckeri*. Rannsókuð sýni voru hrogn, eldisvökvi, liffur, þörungabykkni, Artemíu- og hjóldýrarækt og síðan leir. Engin sjúkdómsvaldanna komu fram í ræktunum, en algengustu bakteríurnar sem einangruðust voru greindar með 16S rRNA hlutaraðgreiningu (n=24). Einn af þessum stofnum, *Vibrio splendidus*, gæti verið sjúkdómsvaldur [26, 27]. Annars voru *Pseudoalteromonas* tegundir mjög algengar, en bakteríur af þessari ætt finnast gjarnan í sjávarvistarkerfum [28]. Þessar niðurstöður samræmdust einnig þeim viðtæku örverugreiningum sem gerðar voru árin 2004 og 2005.

Við rannsóknir á örveruflóru þorskeldisins kom í ljós að hrognin, sem voru fengin út á sjó, frjóvguð og flutt til tilraunaeldisstöðvarinnar, voru nokkuð menguð ($10^{3-4}/g$) aðallega af ýmsum gamma-Proteobacterium. Sótthreinsun (300 ppm glutaraldehyde, 5 mín) og skolun hrogn leiddi til lækkunar á örverufjöldanum (100-1000 falt), en hröð fjölgun örvera átti sér stað fyrsta viku tímabilsins. Heildarfjöldi örvera og *Vibrio* var sambærilegur í ósótthreinsuðum og sótthreinsuðum hrognum um miðju tímabilsins (7 daga eftir frjóvgun). En rétt fyrir klak var *Vibrio* fjöldinn tífalt hærri í ósótthreinsuðum hrognum og eldisvökvanum. Þetta undirstrikar nauðsyn þess að sótthreinsa hrogn til að fyrirbyggja vöxt óæskilegra baktería. Hámarksörverufjöldi sem mældist á hrognum var um $10^{6-7}/g$ [29]. Bakteriútegundirnar *Pseudoalteromonas* og *Colwellia* fundust á ósótthreinsuðum hrognum, voru ríkjandi rétt fyrir klak og fundust einnig í miklu mæli á lifrunum tveimur dögum eftir klak. Þetta bendir til þess að þrátt fyrir sótthreinsun ná þessar tegundir að fjölga sér og ná bólfestu á yfirborði hrogn auk þess að færast yfir á lifurnar fyrstu dögum eftir klak. Þetta styður rökin fyrir því að mikilvægt sé, við uppsetningu á bætibakteríutilraunum, að kanna áhrif samfelldrar böðunar frá hrognastigi til þess að ná nógu snemma að stýra örveruflórunni í eldiskerfunum.

Aðrir mikilvægir eldisþættir (lifandi fæðudýr fyrir og eftir auðgun, þörungabykkni, leir og þurrfóður) voru rannsakaðir á fyrsta árið verkefnisins m.t.t. örveruálags. Heildarörverufjöldi hjóldýra var mikill ($10^{6-7}/ml$) fyrir auðgun og fyrrséð að erfitt yrði að lækka eða stýra örveruflórunni með mildum (náttúrulegum) aðferðum. Hjóldýraræktinni er viðhaldið allt árið um kring við 25-26°C og þess vegna getur verið erfitt að hafa áhrif á bakteríur sem hafa náð bólfestu í ræktunarkerfunum. Hins vegar er líklegra að ná árangri með Artemíu rækt þar sem mögulegt er að sótthreinsa egginn áður en ræktunarferlið hefst. Einnig er heildarferlið styttra, um 48 klst samanborið við ca 80 klst fyrir hjóldýrarækt. Til að rökstyðja þetta enn frekar má nefna að *Vibrio* fjöldinn fyrir auðgun hefur verið ómælanlegur (< 20/ml) í Artemíurækt en um $10^{5-6}/ml$ í hjóldýrarækt. En við auðgun getur vibríuflóran í Artemíuræktinni tekið við sér og náð um $10^{4-5}/ml$. Það má því segja að þessi lifandi fæðudýr séu flöskuhálsinn í velgengni þorskeldisins því þau geta borið með sér mikið af óæskilegum örverum auk þess að geta leitt til alvarlegrar örverumengunar innan eldisstöðvarinnar með samgangi og krossmengun milli áhalda og herbergja. Dæmi um hugsanlega krossmengun kom í ljós við örverumælingar á þörungabykkni sem var í notkun og geymt í kæli. Slíku þykkni er dreift í öll ker og tilraunasíló fyrstu 3-4 vikur eftir klak, en á miðju tímabilinu fannst *Vibrio proteolyticus* sem nam um 10% af ræktanlegri flóru

(10^7 /ml) í vörunni. Við athugun á nýrri flösku fundust engar *Vibrio* tegundir. Annars inniheldur þetta þörungabykkni mikið magn af Gram-jákvæðum bakteríum, sérstaklega mjólkursýrubakteríum.

Sýnatökur og örverumælingar á lirfustigi í tilraunasílóum og kerum árið 2004 var mikilvægur samanburður á þessum eldiskerfum og góður grunnur fyrir frekari rannsóknir árið 2005. Heildarörveru- og *Vibrio* fjöldi í meltingarvegi lirfa hækkaði eftir að fôðrun lifandi fæðudýra hófst. Fjöldi mjólkursýrubaktería var mælanlegur í lirfunum, þörungabykkni og þurrfôðrinu. Í fyrstu var haldið að lélegri skilyrði yrðu í tilraunasílóum heldur en í kerum. Örverumælingar eldisvökvans sýndu að 28 dögum eftir klak var hærri heildarörverufjöldi í kerum (10^5 /ml) en í sílóum (10^4 /ml) á degi 15. Þegar þurrfôðrun var hafin jókst heildarörverufjöldi í eldisvökvanum tífalt í kerum (35 dagar eftir klak). *Vibrio* fjöldinn var alltaf 10-100 falt lægri en heildarfjöldinn, en fylgdi sama mynstri. Örverufjöldinn í lirfunum á 15. degi var um 10^7 /g og breyttist lítið næstu 6 vikurnar, en *Vibrio* fjöldinn var um hundraðfalt lægri. Hefðbundnar örverurannsóknir árið 2004 gáfu tækifæri til þess að einangra stóran hóp af bakteríum (n=447 stofnar) sem voru notaðar við frekari rannsóknir, þ.e. við skoðun/greiningu örveruflórunnar með hefðbundnum prófum og hlutaraðgreiningu 16S rRNA gensins (n=158 stofnar) og leit að bætibakteríum (n=192 stofnar).

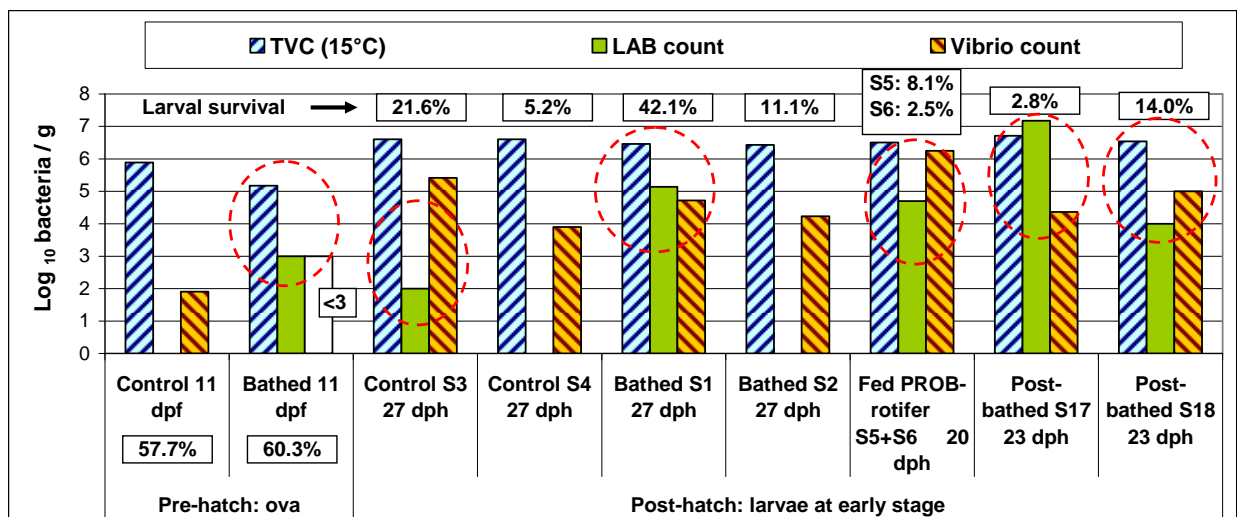
Vorið 2005 var stærri tilraun hleypt af stað til að meta örveruflórana, einnig til þess að kanna þrjár leiðir með notkun bætibaktería (sjá einnig undir 2.5.3 og 2.5.4):

- (i) regluleg böðun frá hrognastigi (1. degi eftir frjóvgun) til lirfustigs (27 dagar eftir klak) með þremur bætibakteríum, alls 8 skipti. Hér voru 3 bakteríustofnar notaðir saman í blöndu við böðun hrogna og lirfa. Tveir stofnar voru einangraðir úr þorskeldi vorið 2004 (**04-279** úr eldisvökva og **04-394** úr þörungabykkni). Þriðji stofninn (**LAB1**) hafði verið einangraður úr laxi nokkrum árum áður.
- (ii) regluleg böðun með sömu blöndu þriggja baktería, eingöngu á lirfustigi, í 23 daga, alls 4 sinnum.
- (iii) notkun auðgaðra hjóldýra sem vektor til að bera bætiorverur í lirfurnar. Við auðgun var notað Levucell SB20, probíotískur gersveppur frá Lallemand, auk tveggja bakteríustofna, einangraðra úr þörungabykkni (**04-342**) og þurrfôðri (**04-683**).

Þessi tilraunauppsetning var notuð til að skoða áhrif meðhöndlunar á þróun örveruflórunnar í eldiskerfum í samanburði við ómeðhöndlaðan hóp (kontról), en engin lyfjameðferð var notuð þetta ár. Velgengni (lifun) og vöxtur lirfanna voru mikilvægir mæliþættir til að styðja ákvarðanir við greiningu á æskilegum og óæskilegum bakteríum. Samaburður á böðuðum og óböðuðum (kontról) hrognum rétt fyrir klak sýndi að örlítið lægri örverufjöldi fékkst í böðuðum hrognum auk þess að fjöldi mjólkursýrubaktería var mælanlegur (um 1% TVC), líklega bætibakteríurnar. Fjölbreytt og sambærileg örveruflóra var í báðum hópunum m.t.t. tegundar, en *Pseudoalteromonas* tegundir voru ríkjandi í böðuðum hrognum. En með greiningu baktería sem voru ræktaðar á sérhæfðu æti (TCBS fyrir víbríur) fannst *Vibrio splendidus* á kontról-hrognum en einungis í eldisvökva böðuðu hrognanna. Tveimur dögum eftir klak var heildarörveru- og *Vibrio* fjöldinn hærri í kontról-lirfum en þeim böðuðu. *V. splendidus* fannst utan um lirfurnar og í eldisvökvanum hjá báðum hópunum. *Vibrio logei* fannst eingöngu í eldisvökva kontról-hópsins. Þessar víbríutegundir hafa mikla blóðrofsvirkni og geta því verið óæskilegar. Bætibakterían 04-394 fannst þá í litlu magni á böðuðu lirfunum, 7 dögum eftir síðastu meðferð hrogna. *Tenacibaculum ovolyticum*, sem hefur verið tengd við sýkt lúðuhrogn og lirfur, fannst á böðuðum lirfum [30]. Við lok tilraunar var heildarörverufjöldinn í meltingarvegi lirfa svipaður milli hópanna, en munur var á fjölda *Vibrio* og mjólkursýrubaktería. Í ljós hefur komið að heildarörverumælingar í

lirfum og eldisvökva, og einnig fjöldinn *Vibrio* og mjólkursýrubaktería, endurspeglar ekki velgengni (lifun) í eldiskerfunum eins og mynd 1 sýnir.

Betri skilningur á ástandi eldiskerfanna fékkst með skoðun á samsetningu örveruflórunnar auk annarra þátta (mynd 2). Besta afkoma (42,1%) reyndist meðal baðaðra lirfa í síló S1 á 27. degi, þurrvigt þeirra var marktækt ($p=0.0003$) hærri og þær sýndu meira þol þegar streitupróf í saltvatni var framkvæmt. Viku eftir síðustu böðun fundust tvær af bætibakteríunum (04-279 og 04-394) í meltingarvegi lirfanna í miklu magni. Þessar niðurstöður staðfesta viðloðunarhæfni þeirra sem er mikilvægur eiginleiki hjá bætibakteríum. Einsleit flóra var til staðar, þ.e. fáar ríkjandi bakteríutegundir. Þetta sýnir að þessar bætibakteríur náðu að stýra örveruflóru í meltingarvegi lirfanna. Lægri afkomutölur fengust þegar einungis ein af bætibakteríunum fannst í lirfum úr sílóum S2 (04-279), S17 (LAB1) og S18 (04-279). Enda var mjög slæm afkoma í sílóinu S17 og hugsanlegt er að tilvist LAB1 í miklu magni í þorsklirfum sé óæskileg. **Kontról-lirfurnar** voru með lægri lifun, minni og með minna streitupól auk fjölbreytari örveruflóru og tilvistar *Vibrio splendidus*. Reyndar var lifun í sílóinu S3 góð (21,6%) en þá kom í ljós að bætibakterían 04-279 hafði náð bólfestu í meltingarvegi lirfanna. Ekki er vitað hvort þetta stafir af krossmengun milli eldiskerfa (baðað S2 og kontról S3 voru samliggjandi) eða af náttúrulegri þróun bakteríunnar, því þessi stofn einangraðist úr eldisvökva á lirfustigi árið 2004 og getur þess vegna verið hluti af örveruflóru eldisstöðvarinnar. Lifun í sílóinu S4 var lág (5,2%) og væntalega óæskilegar bakteríur, t.d. *Vibrio gallicus*, fundust í miklu magni. Þessi víbríutegund einangraðist einnig í svokölluðum **probiotískum hjóldýrum** sem voru gefin í síló S5 og S6, en þar var versta afkoman. Það er hugsanlegt að *Vibrio gallicus* hafi borist, t.d. við hitastigsmælingar á eldisvökvanum, milli kera S4 og S5 sem voru einnig samliggjandi. Talið er að notkun gersveppsins við auðgun probiotískra hjóldýra hafi ýtt undir vöxt *Vibrio* tegunda sem nam um 70% af heildar ræktanlegri flóru. Út frá afkomutölum var hægt að benda á þær bakteríutegundir sem líklega eru eðlilegur hluti örveruflórunnar og hinar óæskilegu, aðallega *Vibrio* tegundir.



Mynd 1. Örveruálag (\log_{10} örverufjöldi/g) og lifun (%) fyrir og eftir klak (TVC: heildarörverufjöldi; LAB: mjólkursýrubakteríur; dpf: dagar eftir frjóvgun hrogn; dph: dagar eftir klak; control: ómeðhöndlað; bathed: samfelld böðun með bætibakteríum frá hrognastigi; fed PROB-rotifer: fengu hjóldýr auðguð með bætiörverum; post-bathed: bætibakteríuböðun eingöngu eftir klak).

Einnig hefur komið í ljós að *Vibrio* talningar á TCBS ætinu í sumum sýnum, sem voru greind m.t.t. samsetningar á örveruflórunni, samræmst ekki þeim niðurstöðum þar sem

sumar *Vibrio* tegundir fundust í meira magni á heildarörverutalningarætinu. Þetta bendir til þess að þessar *Vibrio* tegundir hafi ekki vaxið á sérhæfða ætinu TCBS þegar víðtækari flóra óx þar. Þetta á við *Vibrio gallicus*, *Vibrio proteolyticus* og óþekktu tegund *Vibrio*, sem uxu á TCBS ætinu við hreinstrikun á einangruðum stofnum. Þessar niðurstöður eru athyglisverðar þar sem talið er að *Vibrio* talningin geti gefið upplýsingar um örverufræðilega stöðu eldiskerfa í ljósi þess að margar *Vibrio* tegundir eru óæskilegar við stríðeldi. Þetta skýrir af hverju mælingar á *Vibrio* fjöldanum í ofangreindum tilraunum gáfu ekki til kynna hvernig ástandið var að þróast í eldiskerfunum.

Tafla 1. Samanburður á lifun, þyngd, lengd og tilvist sumra bakteríutegunda í mismunandi meðhöndluðum lirlfum við lok tilraunar (27 eða 23 dagar eftir klak)

Meðhöndlun	Baðað fyrir og eftir klak		Kontról (ómeðhöndlað)		PROB-hjóldýr		Baðað eftir klak (23 dagar)	
	<u>S1</u>	<u>S2</u>	<u>S3</u>	<u>S4</u>	<u>S5</u>	<u>S6</u>	<u>S17</u>	<u>S18</u>
Síló #								
Purrvigt (µg ± stfrávik)	656 ± 41***	562 ± 30	550 ± 17	nd	nd	nd	nd	424 ± 91
Lengd (mm±stfrávik)	9.29 ± 0.95	9.05 ± 0.68	9.24 ± 0.42	nd	nd	nd	nd	8.04 ± 1.09
Lifun (%)	42.1	11.1	21.6	5.2	8.1	2.5	2.8	14.0
Æskilegar bakteríur (% af heildarörverufjölda)	04-394 (10%) 02-279 (20%)	02-279 (20%) LAB ekki mælanlegt (<0.1%)	02-279 (0.1%) LAB (0.01%)	LAB ekki mælanlegt (<0.01%)	LAB (1%)	LAB1 (20%)	02-279 (20%) LAB (1%)	
Óæskilegar bakteríur (% af heildarörverufjölda)	<i>Vibrio sp.</i> (10%) <i>Joostella marina</i> (20%) <i>Microbac-terium sp.</i> (20%)	<i>Vibrio splendidus</i> (20%) <i>Joostella marina</i> (20%)	<i>Vibrio gallicus</i> (20%) <i>Joostella marina</i> (20%) <i>Microbac-terium sp.</i> (10%)	<i>Vibrio splendidus</i> (50%) <i>Vibrio gallicus</i> (20%)	<i>Vibrio proteo-lyticus</i> (10%) <i>Joostella marina</i> (20%)	<i>Vibrio splendidus</i> (10%) <i>Vibrio sp.</i> (10%) <i>Joostella marina</i> (10%)		

Stfrávik: staðalfrávik; nd: ekki mælt; LAB: mjólkursýrubakteríur; *** marktækt hærrí (p=0.0003) en S2 og S3 lirlfur

Í ljósi þessara upplýsinga liggur það fyrir að niðurstöður úr þessu verkefni eru ekki tæmandi, sérstaklega m.t.t. greiningar á örveruflórunni sem miðuðu einungis við ræktanlega örveruflóru. Frekari rannsóknir voru gerðar á völdum bakteríutegundum til þess að fá betri skilning á eiginleikum þeirra og til þess að fá betri aðgreiningu innan bakteríuhópa. Árið 2005 voru 195 bakteríustofnar einangraðir (úr hrognum, sjó (inntaki), eldisvökva, lirlfum, lifandi fæðudýrum), greindir með ýmsum hefðbundnum prófum og eftir forflökkun voru 112 stofnar valdir og greindir með hlutaraðgreiningu 16S rRNA gensins. Þá voru valdir stofnar greindir með API 20 E (n=64 gerjandi stofnar), API 20 NE (n=38 ógerjandi stofnar) og síðan API ZYM (n=22 stofnar) sem sýnir ensímatíska virkni þessara baktería. Einnig voru helstu bakteríustofnar (n=80) kannaðir m.t.t. myndunar á “siderophore” efnunum og “acylated homoserine lactones” (AHLs). Siderophore efnin gera bakteríunum kleift að binda járn sem nýtist þeim til vaxtar, en AHL-efnin eru notuð við þéttiskynjun (quorum sensing, QS) baktería. Sýnt hefur verið fram á að QS-tjáningarkerfi baktería tengist oft sýkingarmætti þeirra [31]. Niðurstöðurnar sýndu að flestir *Vibrio* stofnar voru mjög virkir m.t.t. myndunar á ensímum, siderophore og AHL efnunum, auk þess að *V. logei* og *V. splendidus* höfðu mikla

blóðrofsvirkni. *Joostella* og *Microbacterium* tegundir voru með mjög breiða ensímatíska virkni. Frekari rannsóknir á þessum bakteríutegundum eru nauðsynlegar til þess að staðfesta áhrif þeirra á lírfustigi. Þetta mun væntalega vera gert í framhaldsverkefni.

2.2. Mat á lífrænu og ólífrænu efnaálagi í fiskeldi

Markmiðið var að kanna efnaálagið í þorskeldi, m.t.t. lífrænna og ólífrænna efna sérstaklega á þeim tímupunktum sem mikil afföll verða, og samhliða sýnatökum vegna örverumælinga. Einnig var efnaálagið kannað í lúðueldi í tengslum við forstyrkingu sem fékkst árið 2003, en helstu niðurstöðurnar voru kynntar í fyrri verkefnaskýrslu [29]. **Áætlaður afrakstur** var öflun gagna til (i) mats á ólífrænu efnaálagi í lúðu- og þorskeldi og (ii) til skilgreiningar á þáttum sem hafa áhrif á afkomu og þroska lirfa. Niðurstöður við efnamælingar í lúðueldi sýndu að afkomutölur samræmdust NH₃, H₂S, TP og TN mælingunum á hrognastigi.

Við sýnatökur við þorskeldi á Stað vorin 2004 og 2005 var sýnunum safnað í sérmeðhöndluðum og -merktum ílátum samkvæmt **töflu 2**. Á hrognastigi (12-13 dagar) voru sjósýni tekin úr tveimur sílóum, en á lírfustigi voru þau tekin úr ýmsum sílóum og stærri kerum fyrstu 30-60 dagana eftir klak. Eftirfarandi mælingar voru gerðar í eldisvökvanum: **ólífræn efni** sem hafa eiturverkan á lífverur, þ.e. ammóníak (NH₃), nítrít (NO₂⁻²), vetnissúlfíð (H₂S) og málmar (Fe, Zn, Cu, Ál) og **lífræn efni**: TOP (total ortho-phosphorus), TN (heildar köfnunarefni) og fita (O/F). Einnig var oxunargeta mæld (redox). Málmar voru mældir í þörungabykkni, hjóldýrum, artemíu, þurrfóðri og seiðum til að meta uppsöfnun á fyrsta stigi. Sýnataka fór fram samhliða örverusýnatöku valdra sýna. Alls voru 152 sýni rannsökuð.

Tafla 2. Efnamælingar framkvæmdar í mismunandi sýnum á hrogna- og lírfustigi

Tímabil	Sýni	Ár	Dagar	þurrefni	NH3	NO2-	H2S	málmar	TOP	TN	O/F	redox	
H	sjór úr slöngu	'05	0		x	x	x	x	x	x		x	
R	sjór-kontrol	'05	11		x	x	x		x	x		x	
O	sjór-baðað	'05	11		x	x	x		x	x		x	
G	sjór-meðhöndlað	'04	11		x	x			x	x		x	
N	sjór-ómeðhöndl.	'04	11		x	x			x	x		x	
eða	L sjór-baðað S1	'05	13		x	x	x		x	x	x	x	
	L sjór-kontról S3	'05	13		x	x	x		x	x		x	
	I sjór-kontról S27	'05	16		x	x	x		x	x	x	x	
	R sjór-baðað S1	'05	27		x	x	x		x	x	x	x	
	F sjór-baðað S2	'05	27		x	x	x		x	x	x	x	
	U sjór-kontról S3	'05	27		x	x	x		x	x	x	x	
	S sjór-kontról S4	'05	27		x	x	x		x	x	x	x	
	Í sjór-kontról E20	'05	30		x	x	x		x	x	x	x	
	L sjór-kontról E20	'05	60		x	x	x		x	x	x	x	
	Ó seiði ker E20	'05	60		x			x					
		sjór-kontról S7	'04	15		x	x	x		x	x		
		sjór-kontról E13	'04	28		x	x	x		x	x		x
		sjór-kontról E24	'04	28		x	x	x		x	x		x
		þörungabykkni	'04	28	x		x		x				
	auðguð hjóldýr	'04	28	x		x		x					
	auðguð artemía	'04	28	x		x		x					
K	þurrfóður	'04	28	x				x					
E	sjór-kontról E13	'04	56		x	x	x		x	x		x	
R	sjór-kontról E24	'04	56		x	x	x		x	x		x	
	seiði E13	'04	56		x			x					
	seiði E24	'04	56		x			x					

Mat á efnafræðilegu ástandi eldisins er mikilvægt því það mun leiða í ljós hvaða þættir skipta máli og hvað ber að forðast til að fyrirbyggja óásættanlega efnamengun í eldi. Mælingar í laxeldi á Íslandi hafa sýnt fram á mikilvægi eftirfarandi þátta: efnaálags vegna lífrænna efna í vatninu (svifagnir, uppleyst og agnabundið: COD, TN, TOP, olía og fita) og efna sem sannarlega hafa eiturverkan á lífverur (t.d. nítrít, vetnissúlfíð og uppleyst og agnabundið form málma og ammóníaks) [32]. Þeir málmar sem sérstaklega þarf að fylgjast með eru ál, járn, sink og kopar, en reynslan sýnir t.d. að minnsta hækkun í kopar getur haft mjög afdrifarík áhrif á vöxt og lifun lúðu (óbirtar niðurstöður, G.A. Auðunsson). Viðmiðunargildi fyrir vatn í eldiskerfum eru eftirfarandi: **< 0,01 ppm (ál), < 0,15 ppm (járn), < 0,005 ppm (sink) og 0,03 ppm (kopar)**, miðað við alkalískt vatn, þ.e. > 100 mg/L) [33]. Eituráhrif þessara málma eru talin vera minni með meiri vatnshörku [34]. Handy [35]. gerði grein fyrir að 0,01-0,15 ppm kopar í eldisvökvanum (mjúkt vatn) hafði mjög mikil eituráhrif á fiska.

Lífrænt álag er hættulegt þar sem það getur ýtt undir vöxt örvera. Óæskilegar tegundir geta því náð miklum fjölda á stuttum tíma og valdið skyndilegum og víðtækum afföllum á liffum/seiðum. Einnig er uppsöfnun köfnunarefnasambanda (þ.e. **ammóníak** og **nítrít**) í eldiskerfum óæskileg vegna eituráhrifa þeirra á fiskinn. Niðurbrot köfnunarefnasambanda (aðallega prótein og kjarnasýrur) leiðir til myndunar á afoxuðum N-efnasamböndum, aðallega ammóníaki (NH_3) [36, 37]. Sjávardýr skilja ammóníak út í eldisvökvann aðallega í gegnum tálknin, roð og nýru sem leysist upp í eldisvökvanum [38]. Auk þessarar uppsprettu ammóníaks getur það flætt frá setlögum vegna ýmissa efnahvarfa. Í tilbúnu eldiskerfi vantar það ferli sem sér um að fjarlægja ammóníak í náttúrulegu kerfi og NH_3 getur safnast fyrir, en í endurnýjanlegu kerfi sjá ákveðnar bakteríur um að oxu NH_3 og mynda þannig nítrít sem áfram oxast í nítrat (nitrification). Þetta ferli tryggir minni hættu á eiturverkun vegna þess að flest vatna- og sjávardýr eru næm fyrir **eituráhrifum NH_3 og nítríts (> 1 ppm)** en þola meira magn nítrats (upp í 500 ppm) [39]. Ýmis önnur viðmiðunarmörk hafa verið sett fram eins og neðangreindar heimildir sýna. Barnabè [40]. setti fram mörk þar sem enginn skaði fannst af völdum ammóníaks fyrir sjávarfiska frá 0 – 0,05 ppm, **en gildi hærra en 0,10 ppm var talið vera skaðlegt en var háð fisktegundum**. Alderson [41] gerði grein fyrir hámarks magni NH_3 (0,1 ppm við pH 7,9) sem hafði engin skaðleg áhrif fyrir sandhverfu. Einnig hefur verið mælt með að halda NH_3 gildi lægra en 0,1 ppm í tilapiueldi (20 g fiska) [42].

Ýmsir þættir hafa áhrif á ferli köfnunarefnasambanda eins og t.d. fôður, fôðrunarmynstur, vatnsrennsli/skipti, dýpt eldiskerfisins og loftun ásamt öðrum stjórnum háttum. Nítrít, sem er millistigsmyndunarefni í “nitrification” og “denitrification” ferlum, getur einnig safnast fyrir. Fáar bakteríutebundur geta oxað $\text{NH}_3 \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ á meðan fleiri tegundir geta tekið þátt í “denitrification”, sem er afoxunarferli nítrats ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$), m.a. *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Alcaligenes* tegundir [43]. Nítrít hefur eituráhrif vegna þess að það bindst við hemoglobin í blóði sjávardýra sem veldur súrefnisþurrð í blóðinu. Styrkleikur Cl^- í eldisvökvanum er m.a. talinn vera mikilvægur þáttur í hversu skaðlegt nítrít getur verið [44]. Umbreyting NH_3 yfir í nítrat er háð ýmsum þáttum, m.a. efnisstyrk, styrk uppleysts súrefnis, hitastigi, sýrustigi og fjölda virkra (nitrifying) baktería [45]. Hátt sýrustig eldisvökvans (pH > 8,5) vegna hás ammóníaksstyrks (0,1-1 ppm) hindrar oxun nítríts og þannig getur nítrít safnast fyrir [46].

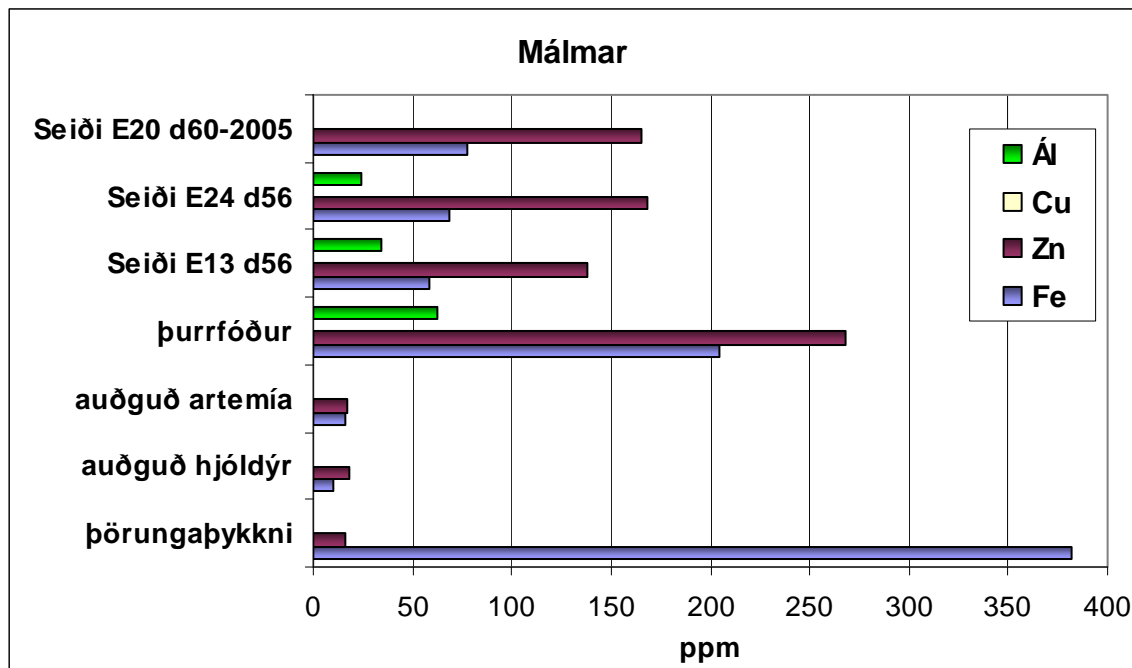
Súlfíð eða H_2S hefur einnig mikil eituráhrif á lífverur [38], en viðmiðunargildi fyrir H_2S í vatni í eldiskerfum er **< 0,002 ppm** [33]. Viðmiðunargildi fyrir **fosfór er 0,01-3 ppm** en

<1 ppm fyrir köfnunarefni (nitur) [33]. Samkvæmt norskum stöðlum telst sjórinn vera í góðu ástandi þegar fosfórstyrkur er < 0,021 ppm (vetur) og 0,012 ppm (sumar), en nítursstyrkur (TN) < 0,295 ppm (vetur) og 0,25 ppm (sumar) [47]. Trépanier o.fl. [48] töluðu um að hlutfall N:P miðað við vigt ætti að vera um 10 til að tryggja öruggt kerfi. Þegar hlutfallið er 7 eða hærra verður P takmarkandi fyrir vöxt þörungna. En það eru vísbendingar um að lífræn efni og uppleyst fosfór geti haft áhrif á myndun eiturefna við blóma plöntusvífa [49].

Niðurstöður efnamælinga sýna að um litla efnasöfnun var yfirleitt að ræða í eldiskerfum á Stað, aðallega vegna góðs rennslis. Meðal **ólífrænna efna** sem voru mæld og hafa eiturverkan á lífverur var einungis **ammóníaksstyrkurinn (NH₃)** sem jókst þegar á tímabilið leið. Á hrognastigi árið 2004 var upphafsstyrkur ammóníaks í eldisvökvanum undir mælingarmörkum (< 0,006 ppm) en degi fyrir klak var það um 0,1 ppm í meðhöndlaða sílóinu (viðmiðunargildið). Á lirlustigi jókst ammóníaksstyrkurinn úr 0,011 ppm á 15. degi eftir klak upp í 0,16 ppm 6 vikum seinna, en þessi hækkun tengist að öllum líkindum uppsöfnun vegna þurrfóðurs. Sama aukning mældist árið 2005 þegar sýni voru tekin fjórum vikum eftir klak (0,114 ppm) og við lok lirluskeiðs (60 dögum eftir klak: 0,232 ppm). Nítrít (NO₂⁻² < 0,016 ppm) og sulfíð (H₂S um 0,002-0,004 mg/l) voru vart mælanleg í eldisvökvanum. Nítrít mældist reyndar í þörungabykkni (3,09 ppm), en í lægri styrk í auðguðum hjóldýrum (0,15 ppm þe). Miðað við notkun þessara afurða (lítið magn sett út í marga lítra af eldisvökva) er óhætt að fullyrða að styrkur nítríts í eldisvökvanum hafi ekki farið yfir viðmiðunargildið (1 ppm).

Við skoðun á **lífrænu álagi**, jukust heildar **köfnunarefni (TN)** og ammóníak álíka þegar leið á tímabilið. Til dæmis mældist TN árið 2004 seint á hrognastigi (2,8 ppm) og lirlutímabilinu (2,3 ppm). Einnig jókst **styrkur fosfórs** á hrognastigi (0,44 ppm rétt fyrir klak) og lirlutímabilinu (um 0,15 ppm 8 vikur eftir klak). **Olíu- og fitumagnið (O/F)** var á bilinu 1,5-1,8 mg/l á fyrri stigi lirlutímabilsins (13-30 dagar eftir klak), en náði upp í 2,2-2,8 mg/l við lok lirluskeiðar. Þetta hærra magn fitu gæti ýtt undir vöxt *Vibrio* tegunda sem nýta sér fitu gjarnan til fjölgunar. Það er athyglisvert að nefna að í þeim eldiskerfum sem uppskárú vel var fitumagnið lægra við lok tímabilsins (2004 innihélt ker E24 um 0,6 mg/l á 56. degi en 2005 var S1 með 0,8 mg/l á 27. degi eftir klak). Einnig var oxunargeta mæld (redox). Redox-mælingarnar (gagnvart Ag/AgCl-viðmiðunarelektróðu) gáfu jákvæð gildi sem sýnir að súrefni var fyrir hendi í eldisvökvanum, en súrefnisríkur sjór við pH 8,1 er með spennu gangvart H-elektróðu um +740 mV. Sjór úr slöngu á Stað mældist með 336 redox gildi, en mælingar á eldisvökva árið 2004 voru á bilinu 307-338 en um 267-316 árið 2005. Þessar niðurstöður á redox gildum eldisvökva endurspeglar súrefnisauðgan sjó.

Mælingar á málmum í eldisvökvanum, seiðum og fýðrunarafurðum sýna að engin greinileg uppsöfnun átti sér stað á þessu tveggja mánaða tímabili. Mælingar á sjóinntaki voru undir mælanlegum mörkum (Fe < 0,03 ppm, Zn < 0,01 ppm, Cu < 0,03 ppm og ál < 0,04 ppm). Viðmiðunargildi málmanna í eldisvatni eru eftirfarandi: járn (Fe) < 0,15 ppm, sink (Zn) < 0,005 ppm, kopar (Cu) < 0,03 ppm og ál < 0,01 ppm [33]. Niðurstöðurnar sýna að við lok lirlustigsins (d56-60) voru seiðin með minna magn af málmum en mældist í þurrfóðrinu (**Mynd 2**). Þurrfóðrið innihélt sink í mestu magni (268 ppm) og sömuleiðis var það í mestu magni í seiðunum (138-168 ppm). Járn var einnig ríkjandi en ál lægra. Mælingar í auðguðum hjóldýrum og artemíum, sem eru lifandi fæðudýr, sýndu lægra magn af sinki og járn.



Mynd 2. Mælingar á málum í seiðum og fæðunarfurðum árin 2004 og 2005 (miðað við þurrvigt)

2.3. Skilgreining á þeim þáttum sem hafa áhrif á afkomu og þroska lirfa

Markmiðið var að skilgreina þá þætti sem hafa áhrif á afkomu og þroska lirfa og kanna hvort þránun í fituríku fæðri á sér stað við núverandi aðstæður í þorsk- og lúðueldi á fyrstu stigum, því samkvæmt nýlegum upplýsingum getur þránun í fæðri leitt til þroska- og vansköpunarvandamála. **Áætlaður afrakstur** var öflun þekkingar og greining á þeim þáttum sem hafa áhrif á afkomu og þroska lirfa. Fyrirhugað var í fyrstu lagi að fá heildarmynd af örveru- og efnaálagi þorsk-/lúðueldisins til þess að geta metið hvaða örverutegundir og lífræn/ólífræn efni eru óæskileg. Einnig var metið hvort og hvernig efnaálagið hafði áhrif á þróun örveruflóru. Þessar upplýsingar eru grundvöllur fyrir frekari þróun forvarnaraðferða. Í öðru lagi var mat gert á ástandi fituríks fæðurs við núverandi aðstæður í þorsk- og lúðueldi m.t.t. þránunar.

Bent hefur verið á að skortur á tókóferóli (E-vítamíni) geti leitt til vansköpunar og hugsanlegt er að rýrnun á tókóferóli gæti átt sér stað vegna innbyggðra þárra fituefna [50]. Magn tókóferóls er mismunandi eftir fisktegundum og er háð fæðrun [51]. Spurningin er hvort þránun í startfæðrun (vegna hásk hlutfalls fjölmættaðra fitusýra) gæti leitt til tókóferólrýrnunar og þar af leiðandi valdið vansköpun í lirfunum, eins og hefur oft komið fram í lúðu- og þorskeldinu. Þess vegna var þránun metin í ýmsum fituríkum fæðunarpáttum úr þorsk- og lúðueldi og staðan skoðuð miðað við íslenskar eldisaðstæður. Úttektin gaf til kynna að þránun sé ekki stórt vandamál við fæðrun lirfa. Hins vegar mátti greinilega sjá þráaaukningu í gömlum fæðunarfurðum, sem bendir til þess að fylgjast þurfi vel með gæðum og geymsluþoli fæðursins, eins og greint er frá í fyrri skýrslu [29].

Við úrvinnslu gagna með fjölþáttgreiningu á efna- og örveruálagi á hrognastigi kom í ljós að mestu tengsl voru milli heildartalninga á eldisvökvanum, ammóníaks- og heildar fosfórsstyrks. Einnig voru mest tengsl milli heildartalninga eldisvökvans og ammóníaksstyrks á lirfustigi. Við örverumælingar kom í ljós að sjógæði í eldiskerum urðu minni með tilkomu þurrfæðunar; í samræmi við efnamælingar þar sem heildarmagn

ammóníaks og köfnunarefna fór yfir viðmiðunarmörkin. Hins vegar hefur komið í ljós að varasamt er að einblína á heildarörverutalningu til að átta sig á velgengni eldiskerfa. Eins og lýst er í kafla 2.1 fengust athyglisverðar upplýsingar þegar velgengni (lifun og vöxtur lifra) og samsetning örveruflórunnar voru skoðaðar saman. Þannig hefur verið hægt að ákvarða æskilegar og óæskilegar bakteríur. Þannig hefur bætibakteríublandan verið endurskoðuð m.t.t. lokatilraunanna og haldið áfram með tvær af þremur bakteríum. Notkun 04-394 og 04-279 á lirlustigi árið 2006 sýndi að þessar bætibakteríur flýttu fyrir þroskun lirlfanna samkvæmt mælingum á ónæmisfræðilegum þáttum. Einnig hefur vaxtarhraðinn verið meiri við notkun bætibakteríanna á lirlfu og seiðastigi, og lifun meiri ef vel tókst til.

Við þróun á probíótískum hjóldýrum kom í ljós að notkun gersveppsins Levucell SB20 væri sennilega óæskileg á meðan mikið *Vibrio* álag væri að finna í hjóldýraræktunum. Einnig áttu bætibakteríurnar, sem voru prófaðar við lok auðgunar, erfitt með að ná sér upp vegna örveruálags. Margar tilraunir á mismumandi efnum til lækkunar á örveruálagi í eldiskerfum leiddu í ljós að ekki er auðvelt að losna við slíkt álag því sumar bakteríur taka þá við og verða ríkjandi. Til dæmis virtist pyceze virka ágætlega gegn víbríum en seinna kom í ljós að áhrifin entust stutt þegar hár *Vibrio* fjöldi mældist í hjóldýrum við lok auðgunar (2.5.2) eða á hrognum fyrir klak (undirkafla 2.6.1). Sótthreinsun hrogna með glutaraldehýð (300 ppm í 5 mín) hefur gefið góðan árangur, því hægari vöxtur *Vibrio* tegunda hefur komið í ljós heldur en þegar sótthreinsun var sleppt eða pyceze notað í staðinn. Einnig sýna niðurstöðurnar að örveruálagið á hrognum færast gjarnan á yfirborð lirlfanna eftir klak og þess vegna er talið mikilvægt að byrja böðunarmedferð með bætibakteríum strax eftir frjóvgun hrogna. Regluleg böðunarmedferð með bætibakteríum er líklegust til árangurs, sérstaklega til að tryggja bólfestu þessara baktería í eldiskerfunum. Samt sem áður virðist regluleg böðun með bætibakteríum ein og sér ekki duga fullkomlega til að tryggja velgengni í öllum eldiskerfunum eins og breytileikinn milli endurtekninganna sýnir. Það er hugsanlegt að notkun bætibaktería 04-394 og 04-279 við ræktun og/eða auðgun hjóldýra og Artemía myndi auka líkurnar til árangurs. Þetta á eftir að prófa til staðfestingar en einnig er nauðsynlegt að vinna betur að aðferðum við ræktun og auðgun á lifandi fæðudýrum til að tryggja betri stjórn á örveruálagi þar í kerfunum. En efnanotkun við ræktun og auðgun lifandi fæðudýra hefur verið frekar óæskileg því það getur ýtt undir hraðari vöxt þolinna og óæskilegra örvera. Til dæmis hefur komið í ljós að tilvist *Vibrio* tegunda með blóðrofvirkni varð áberandi á hrognum sem fékk pyceze meðhöndlun og í lirlfum sem fengu Remus-hjóldýrin (undirkafla 2.6.1). *Vibrio splendidus* og *Vibrio logei* eru helstu tegundirnar sem fundust á árunum 2004 og 2005 með mikla blóðrofvirkni, en *V. proteolyticus* hafði minni virkni (kafla 2.1). Nauðsynlegt er að staðfesta uppruna þessara baktería sem gæti verið vegna náttúrulegrar mengunar í sjó sem er notaður beint í eldiskerfin.

2.4. Einangrun, greining og val æskilegra baktería (bætibaktería)

Markmiðið var að einangra og greina bakteríur úr þorskeldinu með hindrandi eiginleika gagnvart óæskilegum bakteríum, auk þess að kanna ýmsa aðra þætti (vaxtarhraða, festigetu, þol m.t.t. eldisaðstæðna) sem hafa áhrif á vöxt og virkni valdra bætibaktería. **Áætlaður afrakstur** var væntalegar bætibakteríur valdar m.t.t. ýmissa eiginleika.

Á fyrsta ári verkefnisins voru 447 bakteríustofnar flokkaðir út frá hefðbundnum greiningum í 185 hópa (undirkafla 2.1). Valdir stofnar (n=188, a.m.k. einn fulltrúi hvers hóps) voru metnir m.t.t. hindrandi eiginleika gangvart þremur sjúkdómsvaldandi bakteríum (úr safni

Keldna: *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* F19-99 (Asa), *V. salmonicida* A8V-1-22 (Vs) og *V. anguillarum* F-139-03 (Va)). Einnig voru bakteríustofnar úr safni Keldna, K-1 og *Carnobacterium piscicola*, auk mjólkursýrubakteríustofnsins LAB1 (sem var einangraður úr laxi nokkrum árum áður) prófaðir. Þá kom í ljós að um 14% (n=26/188) einangraðra bakteríustofna úr þorskeldi sýndu mismikla hindrandi virkni. Það skal tekið fram að 80,8% af þessum hindrandi stofnum voru Gram-jákvæðar bakteríur en 19,2% Gram-neikvæðar. Einnig kom í ljós að 81% af Gram-jákvæðu stofnunum hindruðu a.m.k. tvo físksjúkdómsvaldandi bakteríur á meðan einungis 19,2% af þeim Gram-neikvæðu gerðu það. Gram-jákvæðir stofnar voru einangraðir úr lirlfum (10), þörungabykkni (8), eldisvökva (1) og þurrfóðri (2), og þeir hindruðu aðallega *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* F19-99 (Asa) og *V. salmonicida* A8V-1-22 (Vs), en færri *V. anguillarum* F-139-03 (Va). Gram-neikvæðir stofnar voru einangraðir úr lirlfum (2), eldisvökva (2) og þurrfóðri (1). Þessir stofnar hindruðu ekki Asa, en voru virkir gegn Vs og Va. Þessar niðurstöður sýna að meiri breidd er í hindrandi virkni Gram-jákvæðra baktería.

Hindrunarpróf var endurtekið á ofangreindum stofnum með það í huga að fá betri skilning á virkni þeirra, þ.e. hvort hindrunin væri vegna bakteríunnar sjálfar eða myndunar hindrandi efna (sýrustig mælt, efna- og siderophore myndun könnuð). Einnig var vaxtarhraði þessara baktería við mismunandi hitastig kannaður (8-15-22-30-35°C) til að spá fyrir um hvaða möguleika hver stofn hefði í eldisumhverfinu (t.d. kjörvaxtarhitastig). Eftir að frumniðurstöður á hlutaraðgreiningu 16S rRNA gensins lágu fyrir og út frá fyrnefndum athugunum (breidd virkni og vaxtarhraða), voru 11 bakteríur valdar til frekari rannsókna. Gagnkvæm áhrif (víxlverkun/hindrun) milli valdra baktería voru könnuð til að meta hvaða stofna væri hægt að nota saman í "probiotic" blöndu. Einnig var blóðrofsvirkni, viðloðunarhæfni á fiskafrumulínum og vaxtareiginleikar þeirra metnir við ýmis skilyrði. Gagnkvæm áhrif milli 15 bakteríustofna (11 sem eru í ofangreindri töflu ásamt eftirfarandi sjúkdómsvaldandi bakteríum: *Listonella anguillarum* (F-139-03), *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* (F19-99) *Vibrio salmonicida* (A8V-1-22) og *Vibrio wodanis* (B1)) Aðeins einn bakteríustofn hindraði *V. wodanis* (B1) þó lítil virkni hafi fundist, en B1 stofninn hindraði mjög vel stofna 04-394, 04-673 og 04-683, sem enginn hinna sjúkdómsvaldandi bakteríanna gerði. Þetta er mjög athyglisvert og þýðir að tilvist *V. wodanis* í eldisumhverfinu myndi líklega gera slíkar bakteríutegundir óvirkar ef þær yrðu fyrir valinu sem bætibakteríur. Stofn 04-279 hafði hindrandi eiginleika gangvart sumum *Vibrio* tegundum. Annars virtist vera hægt að nota flesta bakteríustofnana saman í blöndu.

Einn liður í að kanna "probiotic" eiginleika valdra baktería var að nota svokallað viðloðunarpróf (adhesion test) sem var framkvæmt hjá KVL í Danmörku og á Keldum árið 2005. Í slíku prófi er athugað hvort og í hve miklum mæli tiltekin bakteríutegund festist við frumur í rækt. Þrenns konar frumulínur (CHSE, Bf og RTG-2) voru ræktaðar upp við 16°C, en allar frumlíurnar voru úr ferskvatnsfiski, þ.e. ýmist þekjufrumur (epithelial cells) eða bandvefsfrumur (fibroblastic cells), þar sem það hefur ekki tekist að gera frumulínur úr þorskfiskum:

CHSE: chinook salmon embryo cells, frumur úr kóngalaxi (*O. tshawytscha*)

RTG-2: rainbow trout gonad cells, frumur úr regnbogasilungi (*O. mykiss*)

Bf: bluegill fry cells (*Lepomis macrochirus*)

EPC: epithelioma papulosum cyprini, frumur úr vatnakarpa (*Cyprinus carpio*)

Alls voru gerðar tilraunir með 15 bakteríustofna. KVL prófaði 13 stofna (10 hindrandi bakteríur, 2 físksjúkdómabakteríur og LGG sem er mannabrotótísk mjólkursýrubaktería, til samanburðar) á EPC frumum, en á Keldum voru prófaðir 15 stofnar á þremur

frumtegundum. Niðurstöðurnar benda til þess að engin ein þessara frumulína dygði til að meta viðloðun. Þar sem prófið er tíma- og efnisfrekt væri æskilegt að þurfa ekki að prófa fleiri en tvær frumulínur. Miðað við útkomuna í framangreindum rannsóknum væru það RTG-2 og CHSE sem yrðu fyrir valinu.

Tafla 3. Viðloðunarhæfni 4 valdra hindrandi baktería á 4 fiskafrumulínum við 16°C

Bakteríustofn	Tegund fiskafrumulína			
	CHSE ^a	Bf ^b	RTG ^c	EPC ^d
04-683	+++	+++	+++	+++
04-394	+++	+++	+++	++
04-279	+++	0	++	+
LAB1	+++	+++	+++	0

a: CHSE, fósturfrumulína úr *Oncorhynchus tshawytscha*; b: Bf, frumulína úr seiðum *Lepomis macrochirus*; c: RTG, kynkyrtlafrumulína úr *Oncorhynchus mykiss*; d: EPC, þekjufrumur úr *Cyprinus carpio*.
+++; viðloðun > 5%; ++; viðloðun milli 0.5 and 5%; +; viðloðun < 0.5%; 0: engin viðloðun.

Tafla 3 sýnir að viðloðunarhæfni mjólkursýrubaktería (04-683, 04-394 and LAB1) var mikið, óháð tegund fiskafrumulína sem var notuð. Þetta samræmist niðurstöður Salminen o.fl. sem sýndu að viðloðunarhæfni rannsakaðra baktería var ekki bundin hýsli, en frekar eiginleiki þessara baktería [52].

Einnig var reynt á KVL að meta áhrif þessara baktería á gegndræpi frumurækta með því að mæla rafviðnám til ákvörðunar á TER eða “transepithelial electrical resistance”. Þættir sem draga úr slíku viðnámi eru óæskilegir, því við lækun á TER eiga sýklar greiðari aðgang að vefjum og blóðrásarkerfi hýsilsins. Sýklar geta dregið úr viðnámi þekjufrumulags meðan bætibakteríur geta styrkt viðnámið [53]. Reynt var að mæla TER áhrif bakteríustofna sem sýndu viðloðunarhæfni á EPC. Fjöldi tilrauna, þar sem ýmsum ræktunarskilyrðum var breytt, var gerður til að fá fram skautaðar frumuræktir, eða alls 9 fyrir frumulínurnar EPC og CHSE. Þetta tókst ekki, svo TER gildi fyrir bakteríustofnana fengust ekki fram.

Að lokum voru áhrif umhverfisþátta (sýrustigs, sýklalyfja, o.fl.) á vöxt valdra baktería rannsökuð til að tryggja velgengni þeirra við fiskeldisaðstæður. Vöxtur valdra baktería var metinn í Culture Selco 3000 (næring fyrir hjóldýr) við 30°C (*in vitro*) auk þess sem áhrif neomycins á fjölda þeirra eftir ræktun voru metin. Út frá ofangreindum niðurstöðum og öðrum upplýsingum var ákveðið að prófa eftirfarandi **bætiörverur** við raunverulegar aðstæður:

Við þróun probiótískra lifandi fæðudýra, aðallega auðgaðra hjóldýra (25-26°C), og **fóðrun lirfa vorið 2005**: stofnar 04-342, 04-683 auk probiótíks gersvepps, Levucell SB20 frá Lallemand.

Við böðunartilraunir á hrognum, lurfum og seiðum (8-10°C) árið 2005: 04-279, 04-394 og LAB1.

2.5. Notkun valinna bætiörvera við þróun forvarnaraðferða

Markmiðið var að þróa forvarnaraðferðir m.t.t. eldisaðstæðna/þátta sem hafa áhrif á afkomu, þroska, streitu- og sjúkdómsþol þorsklirfa og m.t.t. eiginleika valinna bætiörvera. **Áætlaður afrakstur** var þróaðar forvarnaraðferðir, m.t.t. eldisaðstæðna/ þátta sem hafa

áhrif á afkomu, þroska, streitu- og sjúkdómsþol þorsklirfa, sem voru sannprófaðar við lokatilraunir vorið 2006. Nánar tiltekið, skilgreining á **bætibakteríum/örverum** sem hægt er að nota við stýringu eldisumhverfisins gegn óæskilegum bakteríum. Gerðar voru *in vivo* tilraunir á lifandi fæðudýrum, hrognum, liffum og seiðum með notkun bætiörvera/baktería. Notaðar voru hefðbundnar og sameindafræðilegar aðferðir við mat á breytingum örveruflórunnar sem áttu sér stað.

2.5.1. Mögnun/ ræktun bætibaktería

Nauðsynlegt var að tryggja nægjanlegt magn æskilegra baktería í *in vivo* fortíraunum. Leitað var eftir bestu ræktunarætum og aðferðum til að tryggja nægjanlegt magn bætibaktería í *in vivo* fortíraunum. Bakteríurnar, sem notaðar voru við hjóldýrarækt, voru ræktaðar í sérstöku ræktunarseyði við stofuhita í u.þ.b. 48 klst. Bakteríustofnunum á Stað (Grindavík) var viðhaldið daglega og starfsmaður Rannsóknastofnunar fiskiðnaðarins (Rf) endurnýjaði grunnræktina vikulega til að útiloka mengun. Levucell SB20 var notað eins og það kemur frá framleiðandanum. Bakteríurnar sem notaðar voru við böðunartilraunirnar voru ræktaðar á föstu æti. Vökvarækt (48 klst við 15°C) var notuð til að sá (0,5 ml) á agarskálar sem voru ræktaðar við 15°C í a.m.k. fjóra daga. Fyrir notkun (böðun) var 5 ml þynningarvökvi (artificial seawater, 50%) notaður á hverja skál til að leysa ræktina. Tvær til 4 skálar voru notaðar fyrir hvern bakteríustofn við mismunandi böðunartilraunir. Magn baktería í uppleystri rækt var oftast um 10^{10-11} /ml og var það geymt vel kælt til notkunar.

2.5.2. Þróun próbótískra lifandi fæðudýra

Reynt var að hafa áhrif á örveruflóru lifandi fæðudýra og samsetningu hennar auk þess að tryggja gæði/afkomu hennar. Þetta var gert með því að nota bætiörverur við ræktun/auðgun fæðudýra í litlum einingum, að fylgjast með þróun örveruflórunnar og notkun þeirra við lírfueldi árið 2005. Einnig var notkun ýmissa efna til að minnka örveruálagið rannsökuð árið 2006.

Örverumælingar á lifandi fæðudýrum fyrir og eftir auðgun hafa leitt í ljós hversu mikið örveruálag er að finna í hjóldýrarækt sem er viðhaldið allt árið um kring við 25-26°C. Niðurstöður okkar rannsókna sýna að sumar bakteríutegundir virðast þola lyfjameðferð (neomycin kannað upp í 200 ppm), sem þýðir að notkun slíkra efna veldur fækkun á viðkvæmum örverutegundum, bæði æskilegum sem og óæskilegum, og gefur meira svigrúm fyrir þolnari tegundir til að vaxa og dafna í umhverfinu. Einnig geta næmar örverutegundir orðið ónæmari með tímanum vegna aðlögunar á umhverfinu. Þetta er ekki æskilegt ástand ef það á að ná tökum á örveruálagi við ræktun og auðgun á lifandi fæðudýrum. Aftur á móti hafa *in vitro* rannsóknir á þoli valdra bætibaktería m.t.t. neomycins (50 ppm), sýrustigs og salts sýnt að þessar aðstæðar virðast ekki vera ómögulegar fyrir þær til að lifa af. Margar *in vitro* tilraunir við ræktun og auðgun hjóldýra voru gerðar en ekki gekk eins vel með bætiörverurnar sem voru notaðar. Mjög svipuð örveruvaxtarkúrfa fékkst milli tilrauna, þ.e. nokkuð hár upphafsörverufjöldi sem jókst fyrstu 24 klst þar til örverumettun var náð og lækkun á örverufjölda fylgdi í kjölfar þess. Við auðgun voru ýmis næringarefni gefin sem ýtti á ný undir aukningu á örverufjöldanum. Þetta ástand var ómögulegt fyrir bætiörverurnar. Einnig er talið að notkun gersveppsins hafi leitt til *Vibrio* vaxtar. Engu að síður voru próbótísk auðguð hjóldýr framleidd til notkunar við lírfueldi árið 2005, en sú tilraun tókst ekki vel.

Efnaeðhöndlun á hjóldýrum fyrir ræktun gaf litlar vonir (30-mín pyceze-meðferð með eða án þörungabykknis). Í raun má segja að engin af þessum efnaeðferðum hafi verið

fullnægjandi. Það var jafnvel betra m.t.t. örveruálagsins að sleppa efnameðhöndluninni og nota einungis Remus (100 ppm) við auðgun hjóldýra. Lyfjameðferð (100 ppm Abbeylincospect) við lok auðgunar var ekki heldur árangursrík. En notkun lyfja (150 ppm Abbeylincospect) ásamt Remus (50-100-200 ppm) við 12 klst-auðgun leiddi til verulegrar lækkunar á örveruflórinni, sérstaklega með hækkandi Remus-styrk sem hafði jákvæð áhrif á uppskeru hjóldýra. Einnig var kannað hvort samnotkun lyfja (50 ppm Abbeylincospect) og mismunandi efna (600 ppm Hatch Controller, 200 ppm Micro Control eða 200 ppm Remus) hefði áhrif á örverufjölda við auðgun Artemíu. Lyfið hafði lítil áhrif en samnotkun þess með ofangreindum efnun leiddi til marktækrar lækkunar (u.þ.b. tífaldrar) á heildarfjölda örvera og *Vibrio* tegunda. Þrátt fyrir þetta var örveruálagið við lok auðgunar frekar hátt ($10^{6-7}/\text{ml}$).

Það er ljóst að frekari rannsóknir eru nauðsynlegar til þess að vinna bug á óæskilegu örveruálagi í lifandi fæðudýrum. En athuganir á hindrandi virkni bætibakteríu 04-279 á bakteríur sem voru einangraðar úr lifandi fæðudýrum hafa sýnt að þessi bætibaktería hafði ágæta virkni gegn mörgum þeirra við stofuhita. Þessar niðurstöður gefa von um að hægt verði að stýra betur örveruflóru lifandi fæðudýra með sömu bætibakteríum og reyndust vel við böðunar- og fóðrunartilraunir.

2.5.3. Fortilraunir á notkun æskilegra baktería við böðun hrogna/ lirfa

2.5.4. Fortilraunir með notkun probíótískra lifandi fæðudýra

Markmiðið var að þróa mismunandi aðferðir til að stýra örveruflóru hrogna og/eða lirfa. Skoðaður var möguleiki á samfelldri og/eða ósamfelldri notkun bætibaktería við böðun hrogna og lirfa (undirkafla 2.5.3), auk notkunar probíótískra hjóldýra (undirkafla 2.5.4). Mat á lifun, lífeðlisfræðilegum þáttum og streituþoli lirfa var gert, og kortlagning örveruflórunnar ásamt mati á festingareiginleikum og stöðugleika bætibaktería í meltingarvegi lirfa framkvæmd. Þessi fortilraun leiddi til vals á bestu bætibakteríum fyrir lokatilraun og sýkingartilraunir.

Vorið 2005 var tilraunin sett af stað til að skoða áhrif mismunandi meðhöndlanna með bætibakteríum, eins og kynnt var í kafla 2.1:

- (iv) regluleg böðun frá hrognastigi (1. degi eftir frjóvgun) til lirlustigs (27 dagar eftir klak) með þremur bætibakteríum, alls 8 skipti. Hér voru notaðir þrjú bakteríustofnar saman í blöndu við böðun hrogna og lirfa (**04-279**, **04-394** og **LAB1**).
- (v) regluleg böðun með sömu blöndu þriggja baktería, eingöngu á lirlustigi í 23 daga, alls fjögur skipti.
- (vi) notkun auðgaðra hjóldýra sem vektor fyrir gjöf bætiörvera til lirlanna. Við auðgun var notað **Levucell SB20**, probíótiskur gersveppur frá Lallemand, auk tveggja bakteríustofna (**04-342** og **04-683**).

Fjallað var um helstu niðurstöðurnar í kafla 2.1. Í ljós kom að lítið samræmi var milli endurtekninganna á sömu meðhöndlunum. Greiningar á örveruflórinni skýrðu þennan breytileika, í ljós kom að bætibakteríurnar náðu ekki að aðlagast og taka bólfestu í öllum eldiskerfunum sem þeim var bætt í. Einnig var talið líklegt að ein þeirra (LAB1) væri óæskileg, þar sem hún náði ekki að hindra *Vibrio* tegundir þrátt fyrir háan fjölda hennar í meltingarvegi lirlanna.

2.5.5. Notkun bætibaktería við seiðaeldi: böðun seiða

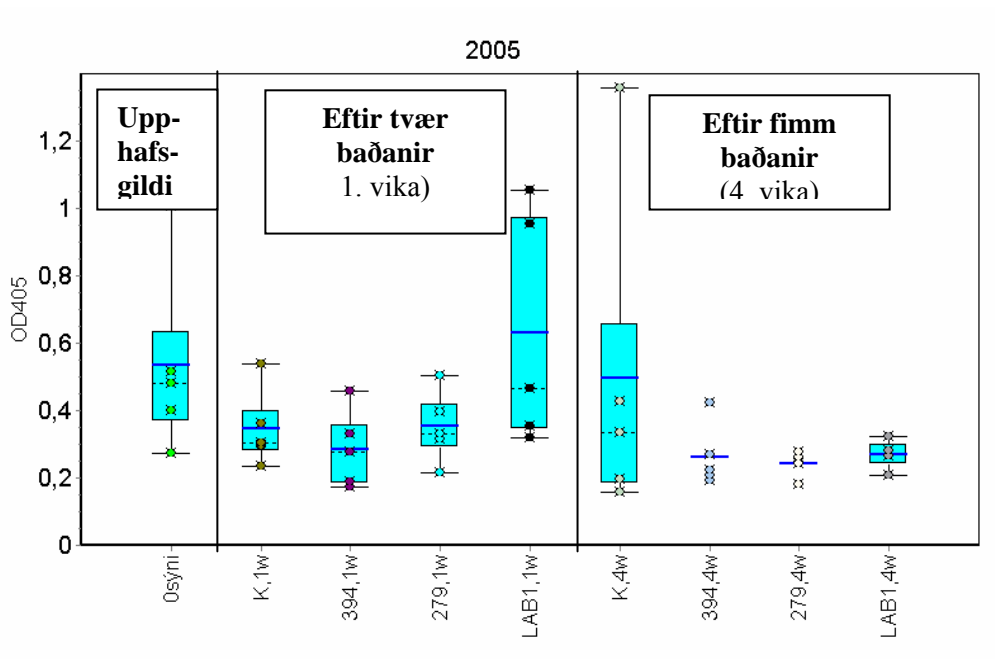
Ákveðið var að gera böðunartilraun haustið 2005 á seiðum til þess að skoða áhrif bætibakteríanna (04-279, 04-394 og LAB1) hvar um sig í seiðaeldi. Einnig var markmiðið að fá úr því skorið hvaða baktería væri æskilegust og hvort notkun þeirra hefði áhrif á ónæmiskerfi, líffæri og vöxt seiðanna. Auk þess var tilvist þeirra sérstaklega könnuð á roði, tálknum og í meltingarvegi seiðanna ásamt þróun örveruflóru í eldisvökvanum. Um 30 g seiði voru sett í 8 ker (300 l, 60 einstaklingar per ker við 8°C). Fjórir hópar voru skoðaðir: þrjú mismunandi bætibakteríuhópar og kontról-hópur. Tveir mismunandi bakteríustyrkleikar (L: 10^{4-5} / ml og H: 10^{5-6} / ml, en tífalt hærra fyrir stofninn 04-279) voru prófaðir. Böðun með bætibakteríum var gerð alls fimm sinnum, á dögum (d) 0-4-7-14-21. Sýni voru tekin á d0-7-12-28 og þrjú seiði voru sameinuð í eitt sýni fyrir hverja meðferð.

Örverumælingarnar endurspegluðu hvorki áhrif bætibakteríanna á seiði né eldisvökva, þar sem örverufræðileg gæði þessara þátta breyttist lítið yfir tímabilið. Heildarörverufjöldinn var um 10^{3-4} / ml en *Vibrio* fjöldinn tífalt lægri. Á degi 28 var *Vibrio* fjöldinn lægstur í hópnum böðuðum með LAB1 og 04-279 í hærri styrkleikanum. Mælingar á tálknum við upphaf tilraunarinnar sýndu greinilega að seiðin komu úr mengaðra umhverfi, því heildarörverufjöldinn lækkaði úr 10^{5-6} /g í 10^{3-4} /g á 7 dögum og *Vibrio* fjöldinn lækkaði einnig verulega fyrstu tvær vikurnar. Sama þróun átti sér stað á roði. Mjólkursýrubakteríur fundust í eldisvökvanum (10^{2-3} / ml), á tálknum (10^3 /g) og roði (10^2 /g) við upphaf tilraunarinnar og var því erfitt að staðfesta tilvist bætibakteríanna (04-394 og LAB1) meðan á tilrauninni stóð. Mælingar á örverufjölda í meltingarvegi seiða voru gerðar bæði á sýnum úr miðgörn (midgut) og aftasta hluta garnar (hindgut). Í ljós kom að meiri örverufjöldi var í aftasta hluta garnar (10^{5-6} /g) en í miðgörn (10^{3-6} /g) og þar var einnig meiri breytileiki í örverufjöldanum milli sýnatökudaga. Þessar niðurstöður eru sennilega eðlilegar þar sem seiðin höfðu verið án fôðrunar í 12-14 klst fyrir sýnatöku og meltingu var því að mestu lokið. Reynt var að tæma og skola görnina við sýnatöku til að meta fjölda viðloðandi örvera eingöngu. Viðloðun mjólkursýrubaktería í meltingarvegi seiða var lítil (10^{1-3} /g) við upphaf tilraunarinnar en mikil í böðuðu hópnum, sérstaklega í þeim sem fengu LAB1 og 04-394 í hærri styrkleikanum, og meiri í aftasta hluta garnar en í miðgörn þegar á tilraunina leið. Fjöldi þeirra var næstum því jafn mikill og heildarörverufjöldinn á dögum 7 og 14, en minni fjöldi mældist á degi 28, enda fór tíðni böðunar minnkandi með tímanum. Bætibakterían 04-279 var einungis viðloðandi á tálknum (10^2 /g), roði ($\sim 10^2$ /g) og í aftasta hluta garnar (20/g) á 14. degi tilraunarinnar.

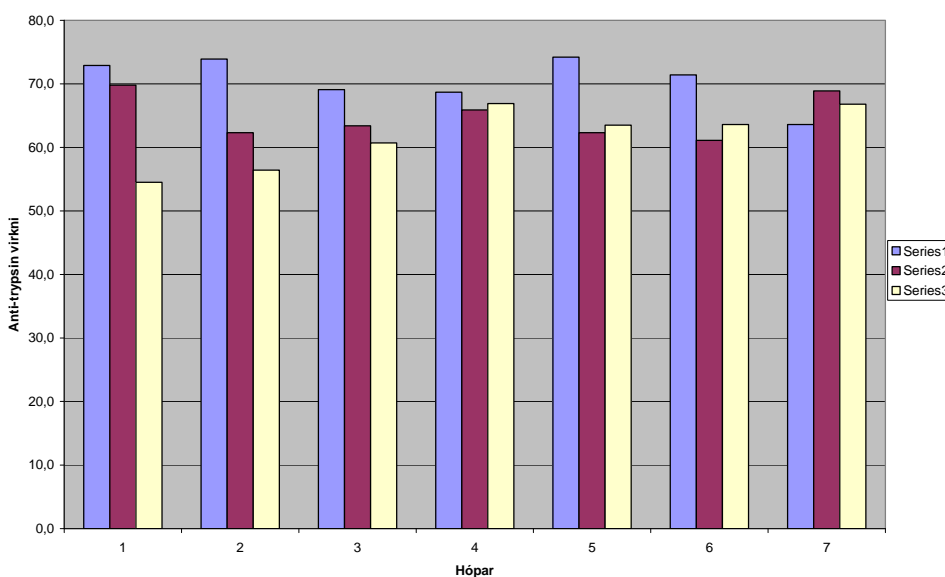
Fóður var skammtað af nákvæmni, sem gerði kleift að meta nýtingu þess (FF) við lok tímabilsins fyrir hvert ker. Einstaklingsvigtun við upphaf, við sýnatöku og við lok tilraunar var framkvæmd. Þannig var mögulegt að reikna leiðréttan vaxtarhraða (SGR=% vöxt per dag) yfir tímabilið m.t.t. til sýnatökunnar. Það má taka fram að seiðin átu frekar lítið fyrstu vikurnar eftir flutning í kerin, en voru farin að taka til sín meira fôður við lok tilraunarinnar. Svipaður vaxtarhraði fékkst í flestum kerum (0,53-0,66 %/dag), en hæsta gildi (0,83 %/dag) mældist hjá hópnum sem var baðaður í hærri styrk bakteríustofnsins 04-279. Þessi hópur var einnig með besta fôðurnýtingu (FF=1,0) en hinir hóparnir nýttu fôðrið ekki eins vel (1,3-1,5).

Mælingar voru gerðar á náttúrulegum mótefnum ásamt virkni gegn trypsíni í blóðvatni auk vefjalitunar. Mælingar á náttúrulegum mótefnum gegn TNP-BSA voru gerðar á blóðvatnssýnum einni viku eftir böðun og aftur þremur vikum seinna, þegar baðað hafði verið alls fimm sinnum (**Mynd 3**). Magn náttúrulegra mótefna lækkaði við böðun, meðan lítil breyting varð á magni í blóðvatni samanburðarfiska. Því má álykta að þetta sé vegna áhrifa bætibakteríanna. Náttúruleg mótefni eru mikilvæg í upphafsvörnum lífvera gegn

sýklum og rannsóknir benda til að þau séu sérlega mikilvæg í þorski þar sem framleiðsla sértækra mótefna gegn framandi mótefnavökum virðist vera takmörkuð. Nýlega var sýnt fram á að magn náttúrulegra mótefna getur verið í öfugu hlutfalli við bindigetu [54]. Vitað er að breytingar geta orðið fyrir tilstilli þátta svo sem hitastigs, aldurs og bólusetninga. Því má leiða líkur að því að lækkun í magni náttúrulegra mótefna í böðuðu seiðunum hafi fylgt aukin bindigeta, þ.e. virkari mótefni. Ekki er unnt að sannreyna þessa tilgátu þar sem aðferðin við að mæla það (ammonium thiocyanate elution) krefst meira mótefnamagns en var til staðar í viðkomandi sýnum. Lítil breyting varð á virkni gegn trypsíni á tímabilinu, en slík virkni er hemjandi gagnvart ýmsum sýklum. Svólitil lækkun varð í böðuðu hópunum, en tölurnar viku ekki marktækt frá ómeðhöndluðum samanburðarfiski (**Mynd 4**).



Mynd 3. Magn náttúrulegra mótefna gegn TNP-BSA í seiðum böðuðum með bakteríustofnum 04-394, 04-279 eða LAB1. Styrkur baktería í baðlausnum var $10^{5-6}/\text{ml}$; K: óböðuð kontról; 1w: 1 vika; 4w: 4 vikur.



Mynd 4. Virkni gegn trypsíni í böðuðum seiðum. Hópar 1 og 2: LAB1 ($10^{4-5}/\text{ml}$ og $10^{5-6}/\text{ml}$); 3 og 4: 04-394 ($10^{4-5}/\text{ml}$ og $10^{5-6}/\text{ml}$); 5 og 6: 04-279 ($10^{5-6}/\text{ml}$ og $10^{6-7}/\text{ml}$); 7: óbaðað kontról hópur. Sýni voru tekin 1, 2 og 4 vikum (series 1-2-3) eftir að meðhöndlun hófst.

2.5.6. Val forvarnaraðferða til frekari rannsókna

Samantekt niðurstaðna og samanburður á virkni bætibaktería í *in vitro* og *in vivo* tilraunum leiddi til vals á forvarnaraðferðum til frekari rannsókna vorið 2006.

Val bætibaktería fyrir böðunartilraunir á hrognum og lirfum vorið 2006 auk seiðatilrauna með próbótísku þurrfóðri haustið 2006: 04-279 og 04-394.

2.6. Prófun forvarnaraðferða - lokatilraunir

Markmiðið var að sannprófa valdar forvarnaraðferðir m.t.t. eldisaðstæðna/ þátta sem hafa áhrif á afkomu, þroska, streituból og örveruflóru þorsklirfa. Einnig þurfti að kanna sjúkdómsspól seiða sem hafa fengið valdar bætibakteríur og til þess þurfti að þróa próbótískt þurrfóður til notkunar í lengri tilraun.

2.6.1. Sannprófun þróaðra forvarnaraðferða á fyrri stigum þorsklirfueldis

Notaðar voru tvær mismunandi leiðir til að hafa áhrif á tilraunareldiskerfi: annars vegar böðun með bætibakteríum (**04-279** og **04-394**) á hrogn- og lirfustigi og hins vegar fóðrun lirfa með Remus-auðguðum hjóldýrum á dögum 3-35 eftir klak. Markmiðið var að staðfesta þau áhrif sem fengust vorið 2005 m.t.t. örveruþróunar, lifunar, þyngdaraukningar og streitubóls auk þess að kanna áhrif þessara meðferða á ónæmisfræðilega þætti lirfa. Remus-meðferð var prófuð vorið 2005 í B-hluta verkefnisins á Stað [25] og það þótti áhugavert að endurtaka svipaða meðferð vorið 2006, þ.e. að meðhöndla auðguð hjóldýr einu sinni á dag rétt fyrir gjöf með Remus (40 g/l) í 30 mín (Remus-hleðsla). Einnig sýndu forathuganir á auðgun hjóldýra vorið 2006 (sjá 2.5.2) að notkun 100 ppm Remus við 12 klst-auðgun leiddi til lágmarksörverufjölda þegar engin önnur efnameðhöndlun var notuð. Varðandi böðun með bætibakteríum vorið 2006 var ekki hægt að byrja meðhöndlun hrognanna fyrr en á 10. degi eftir frjóvgun þar sem það þurfti að nota hrogn sem voru nú þegar komin í síló. Þessi hrogn höfðu fengið pyceze-meðhöndlun (50 ppm í 30 mín) upphaflega og ákveðið var að hreinsa hrognin beint í sílóum (50 ppm í 30 mín) fyrir böðun á 10. degi. Einnig var böðunin framkvæmd á 12. degi eftir frjóvgun og lirfurnar baðaðar á dögum 1, 4, 8, 14, 21 og 28 eftir klak. Það þarf að taka tillit til þessa við túlkun og samanburð á niðurstöðum, að böðunartilraunin vorið 2006 var aðeins frábrugðin þeirri frá 2005, þó svo að átta baðanir væru gerðar í heild í þeim báðum.

Pyceze rannsóknir vorið 2006 (2.5.2) sýndu áhrif þess á lækkun *Vibrio* fjölda í hjóldýrum, en við lengri hjóldýraræktun hurfu þessi áhrif. Sambærilegar niðurstöður fengust þegar örverumælingar á hrognastigi eru skoðaðar. Lágur örverufjöldi mældist í eldisvökvanum og á hrognum á þriðja degi eftir sótthreinsun/frjóvgun en vöxtur *Vibrio* tegunda var meira áberandi viku seinna, sérstaklega á hrognum ($10^{4-5}/g$), miðað við glutaraldehýð-sótthreinsun árin á undan. Endurtekin sótthreinsun á 10. degi hafði lítil áhrif á heildarörveru- og *Vibrio* fjöldann. Ræktanir á blóð agar (BA-NaCl) sýndu mikilvægi *Vibrio* tegunda með blóðrofsvirkni á þessum tímamarki. Eftir klak voru vikulegar örverumælingar gerðar á eldisvökvanum en heildarörverufjöldinn var nokkuð stöðugur innan og meðal tilraunahópna á meðan á tilrauninni stóð (dagur 1 um $10^{3-4}/ml$). *Vibrio* fjöldinn var vart mælanlegur í eldisvökvanum á fyrsta degi eftir klak en náði um $10^{3-4}/ml$ á 36. degi (**Tafla 4**). Örveruálagið í meltingarvegi lirfanna var metið á dögum 21 og 36 eftir klak. Heildarfjöldinn breyttist lítið á þessu 15-daga tímabili, en *Vibrio* fjöldinn jókst 10-100 falt í öllum hópunum (**Tafla 4**). Mest var um víbríur með blóðrofsvirkni í Remus-hópunum (10^6

⁷/g). Samt sem áður var lítill munur á örverufjöldanum í auðguðum hjóldýrum með eða án Remus-hleðslunnar.

Tafla 4. Samantekt um helstu mælingar í eldishópunum á síðasta degi tilraunarinnar

36 dagar eftir klak	Kontról	Baðað	Remus-hjóldýr gefin
Eldisvökvi			
TVC (fjöldi örvera/ml)	10 ⁴⁻⁵	10 ³⁻⁴	10 ³⁻⁴
<i>Vibrio</i> fjöldi	10 ²⁻³	10 ²⁻³	10 ²
LAB fjöldi	<10	<10	<10
Lirfur			
TVC (fjöldi örvera/g)	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁶⁻⁷
<i>Vibrio</i> fjöldi	10 ⁵⁻⁶	10 ⁵⁻⁶	10 ⁶⁻⁷
LAB fjöldi	10 ¹⁻²	10 ³⁻⁶	10 ⁰⁻²
Afkoma: lifun (%) n = 4 síló	24,6 ± 6,5 ^a	20,4 ± 6,2 ^a	10,1 ± 5,6 ^b
Purrvignt (mg per lirfu) n = 30 lirfur x 4 síló	0,98 ± 0,10 ^b	1,22 ± 0,12^a	0,82 ± 0,10 ^c
Lengd (mm) n = 30 lirfur x 4 síló	10,7 ± 0,5 ^b	11,3 ± 0,6^a	10,7 ± 0,5 ^b

TVC: total viable count = heildarörverufjöldi; LAB: lactic acid bacteria = mjólkursýrubakteríur; Stafir **a, b, c** benda á marktækan mun ($p < 0,05$) milli hópanna fyrir viðkomandi mælingu.

Eins og í tilrauninni vorið 2005 var nokkur breytileiki innan hópanna m.t.t. afkomu, eins og sést á staðalfrávikum lifunartalna í töflu 4. Þrátt fyrir aðeins slakari meðalafkomu baðaðra hópa árið 2006 voru meðalpurrvigt og lengd þessara lirfa marktækt hærri við lok tilraunarinnar, svipað og árið 2005. Notkun þessara bætibaktería leiddi til hraðari vaxtar á lirfustigi en streitubolið varð ekki meira en hjá hinum hópunum í þessari tilraun. Ekki er hægt að fullyrða hvort þetta minna þol og lægri afkoma en reiknað var með hjá böðuðum lirfum stafi af seinkuninni við böðun á hrognastigi, samsetningu örveruflórunnar eða einhverju öðru. Líkt og áður skýrðu heildarörverutalningarnar ekki breytileikann sem fannst innan eða milli lirfuhópanna. Notkun Remus, sem er probíótísk eldisvara frá Avecom, við lok auðgunar á hjóldýrum gaf ekkert umfram kontról-hópin, þvert á móti urðu hugsanlega óæskilegar víbríur ríkjandi í meltingarvegi lirfanna við lok tilraunarinnar auk þess að afkoma og vöxtur lirfanna var marktækt minni.

Greining á próteinum sem einangruð voru úr safni lirfa úr hverjum hópi (4, 14, 21 og 28 dögum eftir klak) sýndu að þroskun baðaðra lirfa var komin lengra en lirfa úr hinum hópunum strax á fjórða degi eftir klak en þá hafa farið fram þrjár baðanir, þ.e. annars vegar tvær á hrognastigi og hins vegar ein á fyrsta degi eftir klak. Þessi munur kom fram með tveimur aðferðum, annars vegar ónæmisþykki þar sem litað var fyrir próteinum úr blóðvatni, blóðrauða, komplementþætti C3, ApoLipopróteini A-I, cathepsíni og CRP (C-reactive protein) með sérvirkum mótefnum, en hins vegar í virkniprófi fyrir ensímin caseinasa og gelatínasa. Í böðuðu lirfunum komu fram fleiri og/eða sterkari bönd í blóðvatni, blóðrauða og ApoLipopróteini A-I og hið sama átti við um ensímvirkniprófin.

Tilraun var gerð til að athuga dreifingu bætibaktería í vefjasneiðum með s.k. Gram litun. Sýni til þessara nota voru tekin um leið og önnur sýni. Ekki tókst að greina bætibakteríur með þessari aðferð, en í einu sýnanna sást lirfa sem var mikið sýkt af Gram neikvæðri bakteríu, líklega af *Vibrio* ætt. Ólitaðar vefjasneiðar verða geymdar til síðari nota, t.d. þegar völ verður á mótefnum gegn fleiri þáttum úr ónæmiskerfi þorsksins.

2.6.2. Notkun bætibaktería við þurrfóðrun í seiðaeldi

Til þess að geta metið áhrif bætibakteríanna á ýmsa þætti á seiðastigi (vöxt og sjúkdómsþol seiða eftir bætibakteríumedferð) var probíótískt fóður þróað. Valin var tegund fóðurs sem er notuð við seiðaeldi á Stað, þ.e. Mini 22/50 (1,6 mm; Fóðurblandan hf), sem var fengin gefins frá framleiðandanum. Úðun fóðurs með bætibakteríum var framkvæmd í litlum einingum í tilraunastofu til að ná u.þ.b. 10^8 /g fóðurs. Tvær bætibakteríur voru notaðar í sitt hvoru lagi, 04-279 og 04-394. Tilbúið fóður var skammtað, vakúm pakkað í lofttæmdar umbúðir (Plastprent #082020030, PA25/PE60) og geymsluþolstilraun gerð m.t.t. geymsluhitastigs (-20, 4 og 15°C). Þrísýni voru mæld við þökkun og við hverja sýnatöku sem fór fram á tveggja vikna fresti í átta vikur. Heildarörverufjöldinn var metinn og fylgst var með lifun bætibakteríanna. Kontról-fóðri var einnig pakkað og geymt við hvert hitastig til þess að geta metið áhrif geymsluaðferðanna á “ytri” gæði þess (útlit og lykt). Þessi skynmatsathugun fór fram við lok geymslunnar, en fjórir dómarar gerðu samanburð á kontról- og bakteríubættu fóðri.

Upphafsgæði fóðursins voru metin við heildartalningar við 15°C (log 2.48/g) en fjöldi mjólkursýrubaktería var ómælanlegur ($< 10^2$ /g). Vatnsinnihaldið var mælt í sameinuðum sýnum (n=3) eftir tveggja vikna geymslu við mismunandi hitastig: kontrol = $5,4 \pm 0,4\%$, bakteríubætt fóður við 4°C = $6,0 \pm 0,4\%$, við 15°C = $6,1 \pm 0,4\%$, og við -20°C = $5,9 \pm 0,4\%$. Samkvæmt lýsingunni á vörunni ætti fóðrið að innihalda um 7 % vatn, en þá þótti 5,9-6,1% vera nær í lagi í bakteríubættu fóðrinu. Báðar bætibakteríurnar þoldu vel vinnslu- og geymslumedferð þar sem fjöldi þeirra var nálægt því sem búast mátti við. Lítil munur var á milli geymsluhitastigs, en langtímageymsla við 4°C er væntanlega ákjósanleg meðferð. Við skynmatsathugun var lyktað af fóðrinu, útlit þess metið og áætlað var frávik frá staðli eftir fimm þrepa einkunnastiga: 5 (ekkert frávik), 4 (á mörkum), 3 (lítið), 2 (greinilegt), 1 (mikið). Sýnin voru sett á glerskálar með loki og látin standa nokkra stund til að ná stofuhita. Dómararnir voru sammála um að hugsanlega væri einhver örlítill munur á milli staðals og sýnis. Öll bakteríubættu fóðurssýnin reyndust heldur dekkri og ekki með lítil hvít “korn” eins og staðallinn. Þegar lyktað var fannst örlítill (3-4) munur á milli sýna og kontróls (staðalsins) en mjög erfitt var að lýsa þessum mun. Þetta var kannski rétt munur á lyktarstyrk, heldur daufari í staðlinum sem var með dæmigerða fiskimjölslykt. Prófað var að lykta aftur af sýnunum daginn eftir og þá reyndist munur á sýnum minni ef einhver. Dómararnir voru þó sammála um að það virtist verða vottur af lýsislykt eða e.k. lykt sem gæti verið byrjun á þranun af -20°C sýnunum, bæði af sýni og kontrólsýni.

Í kjölfarið var ákveðið að framleiða meira magn fóðurs með bætibakteríum 04-279 og 04-394 til að meta áhrif þeirra, í blöndu eða sér í lagi, á vöxt og þol seiða. Í raun voru tvær tilraunir settar af stað til að meta styttri (4 vikur) og lengri (8 vikur) þurrfóðrun með bætibakteríum (**Mynd 5**). Áttatíu seiði (10 ± 1 g) voru sett í 12 ker (300 l) við 8°C tveimur dögum fyrir upphaf tilraunarinnar til aðlögunar. Örverumælingar á eldisvökvanum, könnun á tilvist fisksjúkdómabaktería í frannýra (n=5 seiði per ker) með strikun á blóð agar (BA-NaCl) og söfnun blóðs (n=5 seiði per ker) og líffærasýna (n=3 seiði per ker) voru framkvæmd við upphaf og lok tilraunanna.

04-279 + 04-394						04-279				04-394					
Kontrol			Probiotic A			Kontrol		Probiotic B		Probiotic C		Kontrol		Probiotic C	
Ker 1	Ker 2	Ker 3	Ker 4	Ker 5	Ker 6	Ker 7	Ker 8	Ker 9	Ker 10	Ker 11	Ker 12	Ker 11	Ker 12	Ker 11	Ker 12
K	K	K	A	A	A	K	K	B	B	C	C	C	C	C	C
4 vikna-tilraun						8 vikna-tilraun									

Mynd 5. Tilraunauppsetning við seiðaeldi haustið 2006. K: kontról-fóður (Mini 22/50), A: fóður bætt með bakteríustofnum 04-279 (10^{8-9} /g) og 04-394 (10^{7-8} /g); B: fóður bætt með bakteríustofni 04-279 (10^{8-9} /g); C: fóður bætt með bakteríustofni 04-394 (10^{7-8} /g).

Örverumælingar á eldisvökvanum sýndu lítinn breytileika á heildarörverufjöldanum ($\sim 10^3/\text{ml}$) milli hópa og kera yfir 28-daga tímabil, auk þess sem *Vibrio* fjöldi var í kringum mælingarmörkin ($10/\text{ml}$) eða neðar. Fjöldi örvera í seiðunum sem fengu próbíótískt fóður (A) var yfirleitt lægri en hjá kontról-hópunum (**Tafla 5**). Talið er að bætibakteriurnar hafi fundist á tálknunum og í meltingarvegi seiðanna á 28. degi, en þetta var áætlað út frá útliti kólónía á sérhæfðu æti en hefur ekki verið staðfest með sameindarfræðilegum aðferðum. Samræmi var milli örverumælinga í meltingarvegi seiðanna (ker 1-6) og vaxtarhraða þeirra eftir 28 daga. Ker 1, 3 (K) og 6 (A) voru með minnstan vaxtarhraða ($0,54\text{-}0,73\ \%/ \text{dag}$) og heildarfjöldinn þar var $10^{6-7}/\text{g}$ en *Vibrio* fjöldinn tífalt lægri. Í kerinu með mesta vaxtarhraða (ker 5 = $1,00\ \%/ \text{dag}$) var að öllum líkindum bætibaktería 04-394 ríkjandi í heildarflórunni ($10^3/\text{g}$) á 28. degi.

Tafla 5. Samantekt um örverumælingar í seiðahópunum eftir 28 daga

	Kontról-fóður n=3	A-fóður n=3
Tálkn lirfa		
TVC (fjöldi örvera/g)	10^{5-6}	10^{4-5}
<i>Vibrio</i> fjöldi	10^{2-3}	10^{0-2}
Fjöldi bætibaktería		10^3
Meltingarvegur lirfa		
TVC (fjöldi örvera/g)	10^{6-7}	10^{3-5-7}
<i>Vibrio</i> fjöldi	10^{5-6}	10^{0-4-6}
Fjöldi bætibaktería		10^3

TVC: total viable count = heildarörverufjöldi; n = fjöldi kera

Tafla 6. Vaxtarhraði (%/ dag) í seiðahópunum eftir mismunandi þurrfóðrun og tímabilum

	Kontról-fóður	A-fóður	B-fóður	C-fóður
SGR (%/dag) d0-28	$0,76 \pm 0,16^b$ n=5	$0,90 \pm 0,15^b$ n=3	$0,83 \pm 0,15^b$ n=2	$1,05 \pm 0,15^a$ n=2
SGR (%/dag) d0-55	$1,10 \pm 0,04$ n=2		$1,12 \pm 0,08$ n=2	$1,26 \pm 0,08$ n=2
SGR (%/dag) d28-55	$1,38 \pm 0,03$ n=2		$1,42 \pm 0,07$ n=2	$1,48 \pm 0,10$ n=2

SGR: vaxtarhraði; Stafir **a, b** benda á marktækan mun ($p < 0,05$) milli hópanna; n = fjöldi kera

Til að bera saman mismunandi fódurhópa sýnir **Tafla 6** vaxtarhraða seiðanna eftir fóðrun og lengd hennar. Ekki voru gerðar örverumælingar á seiðunum í kerum 7 til 12 til staðfestingar á velgengni þeirra en þó er ljóst að fóður C með eingöngu 04-394 leiddi til mesta vaxtarhraða. Matarlystin var metin vera frekar lítil fyrstu vikunnar en seiðin uxu samt sem áður nokkuð vel fyrstu fjórar vikunnar og vaxtarhraði þeirra var marktækt hærri í kerum sem fengu C-fóðrið. Það er athyglisvert að nefna að bætibaktería 04-279, sem var notuð við böðun ári fyrr, leiddi þá til mesta vaxtaraukningar, hugsanlega vegna hærri styrks hennar þá. Reyndar er mögulegt að lykt þessarar bakteríu hafi nú haft fráhrindandi áhrif á seiðin við þurrfóðrun frekar en böðun þar sem seiðin neyðast til að innbyrða eldisvökvann en ekki fóðrið.

Í samræmi við kröfur um prófun á bætibakteríum var sýkingarmáttur bætibakteríanna í seiðum kannaður. Sterkum lausnum bakteríanna var sprautað í kviðarhol þeirra og fylgst

með þeim í eina viku. Þá var þeim fargað og leitað var að sjáanlegum einkennum sýkingar bæði útvortis og innvortis, en ekkert slíkt sást. Hins vegar voru viðkomandi stofnar einangraðir með ræktun úr nýra. Minnsti bakteríustyrkur sem gaf jákvæða ræktun var 3.900 CFU (colony forming units) fyrir stofn 04-394, 65.000 CFU fyrir stofn 04-279 og 8.000 CFU fyrir stofn LAB1. Greining bakteríanna var staðfest með greiningu á hluta 16S rRNA gensins úr hreinræktum. Það að sprauta þéttri bakteríublöndu í kviðarhol fiska getur leitt til þess að bakterían komist í blóð og þaðan í nýra, þótt ekki sé um sjúkdómsvald að ræða. Að öllu samanlögðu er því óhætt að fullyrða að viðkomandi bakteríur ollu hvorki sjúkdómseinkennum né orsökðu dauða. Einnig má benda á að þessar bakteríur ræktuðust aldrei úr nýra seiða sem voru böðuð með þeim eða átu þau í fóðri.

2.6.3. Sýkingartilraunir á þorskseiðum eftir þurrfóðrun með bætibakteríum

Seiðin úr fyrrgreindum tilraunum (undirkafl 2.6.2) voru flutt á Fræðasetrið í Sandgerði. Eftir viku aðlögunartíma var sjúkdómsspol seiðanna metið með tilraunasýkingum. Baðsmit með *Vibrio anguillarum*, sem veldur víbríuveiki, var gert tvisvar, en stungusmit, í kvið með *Yersinia ruckeri*, sem veldur rauðmunnaveiki, einu sinni. Eftir að tilraunasýkingar hófust fengu allir fiskar ómeðhöndlað fóður því hópunum var blandað saman í kerin. Litarmerki, sem sprautað var grunnt í húð, voru notuð til aðgreiningar á hópunum.

Tilraunasýking I – baðsmit með *V. anguillarum*

Prófaðir voru hópar sem höfðu verið á tilraunafóðri í fimm (4+1) vikur. Tveimur dögum eftir böðun með *V. anguillarum* dóu fyrstu fiskarnir, daginn eftir varð mikill dauði í öllum hópum og á sjöunda degi var allur fiskurinn dauður. Bakterían var einangruð úr ræktunarsýnum sem tekin voru á fimmta degi. Ómeðhöndlaður fiskur, sem var í sér kerri, lifði allur. Það er vandasamt að hitta á rétta þynningu af bakteríum til baðsmits og við rýmri aðstæður eru fleiri þynningar prófaðar því samtímis. Bakteriulausnin, sem var notuð, þ.e. $7,8 \times 10^8$ bakteríur/ml af sjó, var því greinilega of sterk og tilraunin skilaði ekki árangri við mat á hugsanlegu sjúkdómsspoli.

Tilraunasýking II – baðsmit með *V. anguillarum*

Prófaðir voru hópar sem höfðu verið á tilraunafóðri í átta vikur. Í þessari tilraun varð of lítill dauði og minnstur í ómeðhöndluðum samanburðarfiski. Munur milli hópa var ekki marktækur. Prófaðar voru tvær mismunandi þynningar af *V. anguillarum* rækt sem hvorug náði nægum styrk (**Tafla 7**). Hér náðist því heldur ekki að svara spurningunni um hugsanlegan mun milli hópa. Vera má að hann sé ekki mælanlegur við þessar tilraunaaðstæður, þar sem allir hópar voru á venjulegu fóðri þær fjórar vikur sem sýkingartilraunin tók.

Table 7. Uppsafnaður dauði (%) eftir baðsmit með *V. anguillarum* í 3 hópum þorskseiða sem fengu mismunandi fóður

Fóðurgerð	Uppsafnaður dauði %	
	Ker 1*	Ker 2**
Ómeðhöndlað	18	7
Gerð B ¹	29	20
Gerð C ²	22	10

*Bakteríustyrkur: 5×10^7 CFU/ml; ** Bakteríustyrkur: 1×10^7 CFU/ml

1: Fóðurgerð B með bætibakteríu 04-279; 2: Fóðurgerð C með bætibakteríu 04-394

Tilraunasýking III - Stungusmit með *Yersinia ruckeri*

Prófaðir voru hópar sem höfðu verið á tilraunafóðri í fimm (4+1) vikur. Smitað var með stungu í kviðarhol. Lítill munur var milli hópa 28 dögum eftir sýkingu (**Tafla 8**), nema hvað færri dóu úr hópnum sem fékk blandað bætibakteríufóður (gerð A) heldur en í kontról hópnum (K), þegar sýkt var með sterkri bakteríulausn (5×10^5 bakt/ml). Munurinn náði þó ekki marktækni í kjí tölfræðiprófi. Þessar niðurstöður gefa vísbendingu um að seiðin sem fengu fóðurgerð A hafi þolað sýkinguna betur en samanburðarseiðin, en það þyrfti að staðfesta með endurteknum tilraunum við betri tilraunaaðstæður. Til dæmis þá ræktaðast *Y. ruckeri* úr nokkrum fiskum áður en smittilraunin var framkvæmd, sem sýnir að bakterían var til staðar í einhverjum einstaklingum þegar þeir komu frá Stað. Þessi sýking hefur greinst þar öðru hvoru allt frá haustinu 2005.

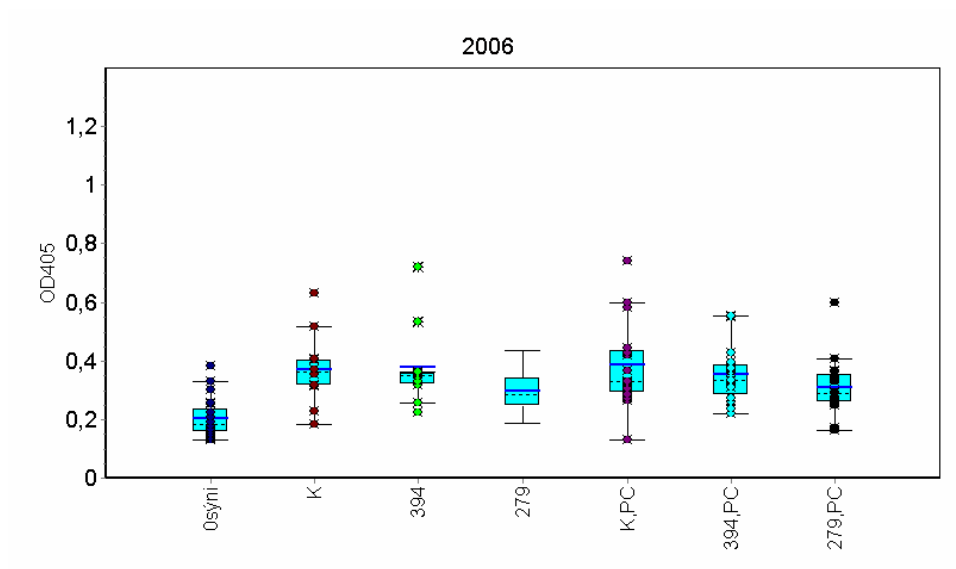
Tafla 8. Uppsafnaður dauði (%) í tilraunasýkingu þar sem sýkt er með *Y. ruckeri*, með stungu í kvið

Fóðurgerð	Smitmagn: CFU pr fisk		
	PBS	5×10^3	5×10^5
Ómeðhöndlað	27	50	70
Gerð A ¹	30	46	47

1: Fóðurgerð A með bætibakteríum 04-279 og 04-394

Mælingar á náttúrulegum mótefnum og CRP í blóðvatni - tilraunasýking II

Svolítill hækkun varð á magni náttúrulegra mótefna í öllum hópum á fóðrunartímanum en engin breyting varð við tilraunasýkingu (**Mynd 6**). Árið áður lækkaði magn náttúrulegra mótefna í bætibakteríuhópnum en þá voru seiðin böðuð nokkrum sinnum í viðkomandi bakteríum. C-reactive prótein (CRP) var mælt í blóðvatni úr fiskum í tilraunum II, við upphaf og við lok tilraunar. Engin munur sást á meðaltölum hópa en talsverður breytileiki kom þó í ljós.



Mynd 6. ELISA gildi fyrir náttúruleg mótefni gegn TNP-BSA. Hópar á mynd: 0 sýni: tekin í upphafi tilraunar; K: eftir 8 vikur á ómeðhöndluðu fóðri; 394: eftir 8 vikur á fóðri C; 279: eftir 8 vikur á fóðri B; PC: Sömu hópar, 4 vikur eftir tilraunasýkingu með *Vibrio anguillarum* böðun.

3. UMRÆÐA

Vonir eru bundnar við að notkun bætibaktería (probiótískra baktería) muni leiða til hagkvæmari og stöðugri framleiðslu á seiðum í framtíðinni með stýringu á örveruálagi. Þannig mætti ná æskilegu jafnvægi sem yki lifun, vöxt og vellíðan lirfa og seiða. Með "probiótísk" er átt við að lifandi baktería er notuð sem fæðubótarefni í þeim tilgangi að hafa jákvæð áhrif á viðkomandi einstakling með því að bæta örverufræðilegt jafnvægi í meltingarvegi hans [55]. Probiótískar örverur þurfa að uppfylla eftirfarandi skilyrði: (1) mega ekki valda sýkingu hjá hýsli; (2) þurfa að hafa hamlandi áhrif á óæskilegar örverur; (3) geta annað hvort fest sig og/eða vaxið í hýslinum, sérstaklega í meltingarveginum, eða örvað ónæmiskerfi hans; (4) æskilegt er að bætibaktería sé upprunnin úr sama umhverfi. Bætibakteríur sem á að nota við eldisaðstæður geta jafnvel haft áhrif á eldisumhverfið því áhrif þeirra á lifur og seiði eru jafn mikil og áhrif fæðu sem fer um meltingarveg þeirra. Lítið er vitað um samband milli svipgerðar- og arfgerðareinkenna örvera (*in vitro*) og mögulegra probiótískra áhrifa þeirra (*in vivo*) [16]. Probiótískar örverur eru af ýmsum örverutegundum, en mjólkursýrubakteríur eru þar mjög áberandi. Aðrar æskilegar, probiótískar tegundir tilheyra Vibrionaceae ættkvíslinni en einnig eru *Pseudomonas*, *Bacillus* tegundir og gersveppir meðal þeirra [56]. Það er því áhugavert að geta þess að sumar rannsóknir [57-60] hafa leitt í ljós að mjólkursýrubakteríur eru einnig hluti af náttúrulegri örveruflóru fisks. Notkun mjólkursýrubaktería í eldistilraunum sýnir að áhrif þessara baktería geta verið margþætt, s.s. hindrun sjúkdómsvaldandi baktería [61, 62], hraðari vöxtur fisks [63], og jafnvel aukið sjúkdómsþol sýktra fiska [60, 64, 65]. Bólfesta örvera í meltingarvegi lirfa/seiða/fiska er fyrsta skref í probiótískri meðferð. Bætibakteríurnar sem hafa orðið fyrir valinu í þessu verkefni (stofnar 04-279 og 04-394) hafa uppfyllt flest þessara viðmiða.

Spurningar sem þurfti að svara í þessum bætibakteríurannsóknum fjölluðu um framkvæmd og tíðni meðhöndlunar, þ.e. hvernig meðhöndlun hrognar og lirfa átti að vera, hvort betra væri að byrja snemma í ferlinu, strax eftir frjóvgun hrognar eða bara eftir klak til að minnka álagið og hversu oft þyrfti að baða. Þá var ekki vitað hvort böðun eða fóðrun með bætibakteríum væri æskilegri. Niðurstöður sýna að betra er að byrja böðun strax eftir frjóvgun og sóttþreinsun hrognar til þess að tryggja rétta örveruflóru í eldiskerfum og lifrum strax eftir klak. Breytileg útkoma í hópum sem hlotið hafa sömu meðferð með bætibakteríum er hins vegar áhyggjuefni. Það er hugsanlegt að tíðni böðunar hafi ekki verið nægilega mikil, sérstaklega þegar leið á tímabilið. Einnig er fyrirsjáanlegt að fóðrun bætibaktería til lirfa með auðguðum hjóldýrum er nauðsynleg viðbót við böðun og gæti leitt til jafnari útkomu á milli hópa sem fá sömu meðferð.

Helsti vandinn við þróun forvarnaraðferða var sá, að lifandi fæðudýr báru með sér mikið af örverum og á þetta sérstaklega við um hjóldýrin, sem er haldið í ræktun allt árið. Heildarferlið í hjóldýrarækt, sem var rannsakað, er um 50-60 tímar í loturækt. Megnið af hjóldýrunum eru þó 2-3 daga gömul við lok auðgunar. Í endurnýtingarkerfi er ferlið "endalaust" en fjölgunin mun hraðari og þar má reikna með því að hjóldýrin séu 1-2 daga gömul við lok auðgunar. Þetta kerfi er nýjung á Stað og hefur ekki verið skoðað m.t.t. þróunar á örveruálagi og samsetningu flórunnar. Margvíslegar tilraunir voru gerðar til að finna góðar leiðir til lækkunar á örveruálagi í hjóldýrarækt, en efna- eða lyfjameðhöndlun virtist ekki vera æskileg þar sem kjörskilyrði við lengri ræktun leiddu til hraðari vaxtar þolinnar baktería. Notkun Remus (100 ppm) við auðgun hjóldýra var prófuð tvisvar og hafði mismikil áhrif á örveruálagið á meðan samnotkun þess (200 ppm) með lyfi (150 ppm Abbeylincospect) dró verulega úr heildarörveru- og *Vibrio* fjöldanum. Notkun Remus við "hleðslu" á hjóldýrum við lok auðgunar reyndist ekki vel í lokatilrauninni þar sem afkoma

og vöxtur liffanna var marktækt minni en hjá hinum hópunum. Nauðsynlegt er að minnka lyfjanotkun í stríðeldi fiska og þess vegna er þörf á þróun mildari aðferða til þess að stýra örveruálagi þar sem fôðrun með lifandi fæðudýrum breytir örveruflóru í meltingarvegi liffanna. Athuganir á hindrandi virkni bætibakteríu 04-279 á bakteríum sem voru einangraðar úr lifandi fæðudýrum hafa sýnt að þessi bætibaktería hefur ágæta virkni gegn mörgum þeirra við stofuhita. Þessar niðurstöður gefa von um að hægt verði að stýra betur örveruflóru lifandi fæðudýra með sömu bætibakteríum og reyndust vel við böðunar- og fôðrunartilraunir. Að minnsta kosti tvær bætibakteríur (04-394 og 04-279), sem voru notaðar við samfellda böðun hrogna og lifra, leiddu til betri afkomu, meiri vaxtar og lífsþróttar auk þess að hafa áhrif á örveruflórana og þroskun lifra strax eftir klak. Bólfesta einnar tegundar (04-279) leiddi ekki til jafn góðs árangurs. Marktækt hærri vaxtarhraði fékkst einnig í tilraun við fôðrun seiða í 28 daga þegar bætibaktería 04-394 var notuð eingöngu. Athuganir voru gerðar á sýkingarmætti bætibakteríanna í þorskseiðum og leiddu í ljós að notkun þeirra væri nokkuð örugg því þær ollu hvorki sjúkdómseinkennum né orsökunni dauða.

Leit að þekktum fisksjúkdómabakteríum var gerð í sýnum frá Stað vorið 2004. Leitað var að *Aeromonas salmonicida* undirtegund *achromogenes* sem veldur kylaveikibróður, *Vibrio anguillarum* sem veldur víbrúveiki, *Vibrio salmonicida* sem veldur Hitraveiki, *Moritella viscosa* sem orsakar vetrarsár og *Yersinia ruckeri* sem veldur rauðmunnaveiki. Þessar bakteríur fundust hvorki á hrogna- né lifrustigi þorskeldisins. Við greiningu á algengustu bakteríustofnum sem einangruðust fannst stofn af tegundinni *Vibrio splendidus* sem gæti verið sjúkdómsvaldur [26, 27]. Þessi *Vibrio* tegund hefur mikla blóðrofsvirkni og fannst víða á hrogna- og lifrustigi árið 2005. Viðtæk greining á örveruflóru eldiskerfa og afkomutölur á lifrustigi leiddu til ákvörðunar á æskilegum og óæskilegum bakteríum, aðallega *Vibrio* tegundum. Samsetning örveruflórunnar skýrði betur afföll en heildarörveru eða *Vibrio* talningar gerðu. Þessar niðurstöður gefa möguleika á að þróa hraðvirkari greiningaraðferðir til að geta fylgst markvisst með breytingum á örveruflórinni.

Einnig kom í ljós að TCBS ætið, sem er notað til talningar á (presumptive) *Vibrio* tegundum, virtist ekki gefa rétta mynd af *Vibrio* álagi þar sem sumar tegundir uxu ekki við samkeppnisaðstæðum á TCBS en fundust í herra magni á heildartalningarætinu (Marine agar). Í ljósi þessara upplýsinga liggur það fyrir að niðurstöður úr þessu verkefni eru ekki tæmandi, sérstaklega m.t.t. greiningar á örveruflórinni sem aðeins náði til ræktanlegrar örveruflóru. Hér þyrfti að beita greiningaraðferðum sem eru óháðar ræktunum. Til dæmis er hægt að einangra heildar DNA, klóna, hlutaraðgreinina og áætla á þann hátt tegundasamsetningu og hlutföll milli tegunda. Þannig fengust upplýsingar um samsetningu heildarörveruflórunnar, ræktanlegrar sem óræktanlegrar í ákveðnum fjölda klóna. Gallinn við þessa aðferða er hins vegar sá að örverur í minnihluta sjást ekki nema með raðgreiningu á mjög miklum fjölda klóna en það er bæði dýrt og tímafrekt. Ný tækni sem felur í sér DNA raðgreiningu án klónunarskrefs er nýjung frá Roche. Með þessari tækni er hægt að raðgreina milljónir basapara fyrir brot af því verði sem það kostaði áður og á miklu styttri tíma. Með þessari tækni fæst greining á miklum fjölda örvera, bæði þeim tegundum sem yfirgnæfa samfélagið en einnig á þeim sem eru í færri eintökum í örverusamfélaginu [66, 67].

Greinilegt var að böðun seiða með bætibakteríum, haustið 2005, hafði áhrif á svo kölluð náttúruleg mótefni. Þetta eru mótefni sem hafa breiða virkni, þ.e. þekkja sameindir sem einkenna marga sýkla, og hafa hlutverki að gegna í svörun gegn þeim, einkánlega í upphafi sýkingar. Þar kemur bæði til virkjun átfrumna og ræsing komplementskerfisins. Þegar líður á sýkingu fær ónæmiskerfið ráðrúm til að mynda sértæk mótefni gegn sameindum, sem eru

sérkennandi fyrir hvern sýkil, og jafnframt verða til minnisfrumur sem geyma þetta svar og eru fljótar til viðbragðs næst þegar lífveran kemst í tæri við sama sýkil. Komið hefur í ljós að þorskur framleiðir mikið magn náttúrulegra mótefna en sértæka mótefnasvarið er vanþróað [68]. Því má leiða líkur að því að náttúruleg mótefni séu mikilvægari í þorski en mörgum öðrum lífverum. Áhrif bætibakteríanna í seiðunum komu fram sem minnkað magn þessara mótefna, sem trúlega er ekki óhagstætt viðibragð eins og ætla mátti, því nýjar rannsóknir sýna að jafnframt getur bindigeta þeirra aukist verulega [54]. Seiði sem fengu fóður með sömu bakteríum árið 2006 sýndu ekki verulegar breytingar á magni náttúrulegra mótefna, en áður en frekari ályktanir eru dregnar þyrfti að gera fleiri tilraunir. Ekki komu fram marktæk áhrif á varnavirkni gegn ensíminu trypsíni, sem er einn af sýkibáttum margra baktería, og heldur ekki á magni bráðapróteinsins CRP, sem er í samræmi við nýbirtar rannsóknir á hegðun þess í þorski [69]. Í öllum framangreindum rannsóknarþáttum kom fram mikill munur milli einstaklinga og er það einnig í samræmi við þær rannsóknir sem búið er að gera á þorski.

Tilraunir til að meta áhrif bætibaktería sem gefnar voru í fóðri á sjúkdómsþol seiða gáfu ekki afgerandi svör. Þarna fékkst samt reynsla og vísbendingar um jákvæð áhrif bætibakteríanna, sem kalla á frekari rannsóknir. Þær verða hins vegar ekki gerðar við þau skilyrði sem nú eru fyrir hendi hérlendis, því til slíkra rannsókna þarf bæði seiði sem bera örugglega ekki í sér neinn sýkil og öruggar aðstæður til sýkinga þar sem jafnframt eru eðlileg eldis skilyrði, fóðrun og umhirða kunnáttufólks. Til þess að rannsaka hið sérstæða ónæmissvar þorskens vantar einnig rannsóknartæki á Keldum, einkum svo kallaða frumflæðisjá. Slíkur búnaður kæmi auk þess að gagni við rannsóknir á ónæmisviðbrögðum annarra fisktegunda bæði hvað snertir sýkingar, umhverfisáhrif og svaranir við örvun ónæmiskerfisins og bólusetningum svo það helsta sé nefnt.

Efnaálagið virðist ekki vera mikið vandamál við þorskeldi á Stað, enda er rennsli eldisvökvans mikið, en uppsöfnun ammóníaks gerist gjarnan eftir að þurrfóðrun hefst. Það er því mikilvægt að hafa það í huga þegar fóðrun lirfa er endurskoðuð, t.d. hvort það eigi að byrja fyrir að gefa þurrfóður eða bæta gæði lifandi fæðudýra.

Erfitt er að fullyrða á þessu stigi hvort örverustýring með bætibakteríum er raunhæf aðferð í framleiðsluskala en með því að skipta lirfueldinu upp í tvo aðskilda hluta; fyrst 2-3 vikur í sílóum og síðan 5-6 vikur í kerum, væri böðunaraðferðin örugglega raunhæfur kostur í sílófasanum. Í sílóum er hægt að ala lirfur í miklum þéttleika og auðvelt er að minnka rúmmálið tímabundið til að framkvæma bakteríuböðun. Eftir 2-3 vikur eru lirfurnar síðan orðnar mjög lífvænlegar og þá er orðið óhætt að flytja þær í stór eldisker. Síðan væri þurrfóðrun með bætibakteríum líklega raunhæfari kostur á ungseiðastigi. Það er spennandi og raunhæft rannsóknaverkefni að þróa áfram aðferðir við lirfueldi þar sem örverustýringu er beitt til þess að ná lifun upp fyrir 50%. Nýlegar rannsóknir sýna að vöxtur á ungseiðastigi hefur áhrif á vöxt fisks í gegnum allt eldisferlið [70]. Sömuleiðis hafa mælingar á vexti lirfa og seiða á Stað á undanförunum árum leitt í ljós að meðalstærð 30 daga lirfa er svipuð hjá öllum árgöngum en síðan virðist hlutfallslegur þyngdarmunur undir lok ungseiðastigs (3-4 mánaða aldur) halda áfram í gegnum eldisferilinn. Þar sem niðurstöður sýna marktæka aukningu á vexti seiða sem böðuð voru með bætibakteríu er mjög áhugavert að gera ýtarlegri rannsókn þar sem lirfum og seiðum meðhöndluðum með bætibakteríum væri fylgt allt eldisferlið.

4. LOKAORÐ

Niðurstöður þessara rannsókna sýna að mögulegt er að nota bætibakteríur á hrogna-, lirfu- og seiðastigi til þess að ná betri afkomu, meiri vexti og lífsþrótti og síðast en ekki síst að hafa áhrif á örveruflórana og þroskun lirfa. Sömuleiðis höfðu bætibakteriurnar áhrif á vaxtarhraða þorskseiða við fóðrunartilraunir. Ekki er vitað á þessu stigi hvernig þessar bætibakteríur hafa þessi áhrif nákvæmlega, þó betri nýting fóðurs sé líkleg, eða hvort þær hafi áhrif á flóru sem veldur þessum breytingum. Frekari rannsóknir á heildarörverusamfélagi í meltingarvegi eldisfisks eru þess vegna nauðsynlegar til þess að skilja betur hvað skiptir máli í þróun lirfa og seiða.

Ef litið er á eldisferilinn í heild sinni, frá frjóvgun til loka lirfustigs, sýna mælingar í seiðaframleiðslunni á Stað að afföllin í framleiðslunni eru langmest á tímabilinu 3-14 dagar eftir klak. Á þessu tímabili eru hjóldýr eina fæða lirfanna og bein smitleið fyrir óæskilegar örverur inn í lirfurnar. Aðrar mögulegar smitleiðir eru einkum frá sjónum, hrognum eða með þörungabykkni. Stigmögnun örveruflóru eftir að frumfóðrun hefst á degi 3 bendir þó til þess að hjóldýrin séu mikilvægasta smitleiðin. Auðguð hjóldýr hafa mikla óæskilega örveruflóru og sótthreinsun virðist skila takmörkuðum árangri fyrir eða eftir auðgun. Æskilegt væri að bæta aðferðir við sótthreinsun hjóldýra til þess að rýma fyrir bætibakteríum og auka áhrif þeirra. Vænleg aðferð gæti verið að UV-geisla hjóldýrin eftir auðgun og baða þau síðan í háum styrk bætibaktería í stuttan tíma fyrir gjöf.

Nýlegar rannsóknir sýna að vaxtarhraðinn á ungseiðastigi sé afgerandi þáttur fyrir varanlega vaxtargetu þorsksins. Því er hugsanlegt að heilstæð bætibakteríumeðferð frá hrognastigi til loka ungseiðastigsins, með böðun hrogna og lirfa auk fóðrunar með bætibakteríum gegnum lifanfi fædudýrum og þurrfóðri, gæti bætt gæði seiða og tryggt stöðugan og aukinn vöxt. Einnig er hugsanlegt að notkun endurnýtingarkerfis við lirfueldi auðveldi bætibakteríum að ná bólfestu í eldiskerfunum. Mikilvægt er að kanna áhrif slíkrar heilstæðrar bætibakteríumeðferðar á velgengni seiðaeldisins m.t.t. lifunar, vaxtar, sjúkdómspols og vansköpunar. Einnig væri áhugavert að skoða ferlið lengra og meta áhrifin á seinna stigi m.t.t. kynþroskunar og velgengni í kvíum. Lengi býr að fyrstu gerð í seiðaframleiðslu og góður árangur í lirfueldi er frábært veganesti fyrir ungseiðaeldið.

5. ÞAKKAORÐ

AVS-sjóðnum er þakkað fyrir að gera þátttakendum kleift að framkvæma þessar rannsóknir og auka þannig við þekkingu á eldi sjávarfiska. Öllum þátttakendum í verkefninu er þakkað fyrir ómetanlega aðstoð og velvilja, sérstaklega starfsmönnum á Stað fyrir allar *in vivo* tilraunir og starfsmönnum við Fræðasetrið í Sangerði fyrir aðstoð og eftirlit með sýkingatilraunum. Einnig fæ Fóðurblandan hf sérstakar þakkir fyrir gefið fóður sem notað var við þróun próbiotíks þurrfóðurs og seiðatilraunir.

6. HEIMILDIR

1. Steinarsson A. 2004. Framleiðsla þorskseiða. In: Björnsson B & Gunnarsson VI (eds.), *Þorskelði á Íslandi*. Hafrannsóknastofnunin, Reykjavík. Fjölrit 111: 41-86.
2. Magnadóttir B, Jónsdóttir H, Helgason S, Björnsson B, Jørgensen T & Pilström L. 1999a. Humoral immune parameters in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) I: The effects of environmental temperature. *Comp. Biochem. Physiol.* 122B: 173-180.
3. Magnadóttir B, Jónsdóttir H, Helgason S, Björnsson B, Jørgensen T & Pilström L. 1999b. Humoral immune parameters in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) II: The effects of size and gender under different environmental conditions. *Comp. Biochem. Physiol.* 122B: 181-188.
4. Lange S, Gudmundsdóttir BK & Magnadóttir B. 2001. Humoral immune parameters of cultured halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Fish Shellf. Immunol.* 11: 523-535.
5. Magnadóttir B, Jónsdóttir H., Helgason S., Björnsson B, Solem ST & Pilström L. 2001. Immune parameters of immunized cod (*Gadus morhua* L.). *Fish Shellf. Immunol.* 11 (1): 75-89.
6. Magnadóttir B, Bambir SH, Gudmundsdóttir BK, Pilström L & Helgason S. 2002. Atypical *Aeromonas salmonicida* infection in naturally and experimentally infected cod (*Gadus morhua* L.). *J. Fish Dis.* 25: 583-597.
7. Gudmundsdóttir S, Lange S, Magnadóttir B & Gudmundsdóttir BK. 2003. Protection against atypical furunculosis in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*, comparison of fish vaccinated with commercial furunculosis vaccine and an autogenous vaccine based on the challenge strain. *J. Fish Dis.* 26: 331-338.
8. Björnsdóttir B, Gudmundsdóttir S, Bambir SH, Magnadóttir B & Gudmundsdóttir BK. 2004. Experimental infection of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) by *Moritella viscosa*, vaccination effort and vaccine induced side effects. *J. Fish Dis.* 27 (11): 645-655.
9. Magnadóttir B. 2000. The spontaneous haemolytic activity of cod serum: Heat insensitivity and other characteristics. *Fish Shellf. Immunol.* 10: 731-735.
10. Lange S, Dodds AW, Magnadóttir B. 2004a. Isolation and Characterisation of Complement Component C3 from Atlantic Cod (*Gadus morhua* L.) and Atlantic Halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Fish Shellf. Immunol.* 16: 227-239.
11. Lange S, Bambir S, Dodds AW, Magnadóttir B. 2004b. The ontogeny of complement component C3 in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) – an immunohistochemical study. *Fish Shellf. Immunol.* 16: 359-367.
12. Magnadóttir B, Lange S. 2004. Is apolipoprotein A-I a regulating protein for the complement system of cod (*Gadus morhua* L.)? *Fish Shellf. Immunol.* 16: 265-269.
13. Björnsdóttir R & Smáradóttir H. 2003. Stýring örveruflóru í startfóðurkerjum lúðulirfa. Verkefnaskýrsla 21-03. Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins, 36 bls.
14. Ellis AE. 1988. Current aspects of fish vaccination. *Dis. Aquat. Org.* 4 (2): 159-164
15. Fuller R. 1989. Probiotics in man and animal. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365-378.
16. Spanggaard B, Huber I, Nielsen J, Sick EB, Pipper CB, Martinussen T, Slierendrecht WJ, Gram L. 2001. The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. *Env. Microbiol.* 3 (12): 755-765.
17. Sissons JW. 1989. Potential of probiotic organisms to prevent diarrhoea and promote digestion in farm animals. A review. *J. Sci. Food Agric.* 49: 1-13.
18. Montes AJ, Pugh DG. 1993. The use of probiotics in food-animal practice. *Vet. Med.* 88: 282-288.

19. Westerdahl A, Olsson JC, Kjelleberg S, Conway P. 1991. Isolation and characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*)-associated bacteria with inhibitory effect against *Vibrio anguillarum*. *Appl. Env. Microbiol.* 57: 2223-2228.
20. Olsson JC, Westerdahl A, Conway PL, Kjelleberg S. 1992. Intestinal colonization potential of turbot (*Scophthalmus maximus*) and dab (*Limanda limanda*)-associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Appl. Env. Microbiol.* 58: 551-556.
21. Westerdahl A, Olsson JC, Conway P, Kjelleberg S. 1994. Characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*)-associated bacteria with inhibitory effect against the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 41: 403-409.
22. Austin B, Stuckey LF, Robertson PAW, Effendi I, Griffith DRW. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *J. Fish Dis.* 18: 93-96.
23. Bergh Ø. 1995. Bacteria associated with early life stages of halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., inhibit growth of a pathogenic *Vibrio* sp. *J. Fish Dis.* 18: 31-40.
24. Hansen GH, Olafsen JA. 1989. Bacterial colonization of cod (*Gadus morhua* L.) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs in marine aquaculture. *Appl. Env. Microbiol.* 55: 1435-1446.
25. Björnsdóttir R, Smáradóttir H, Jóhannsdóttir JÞ, Guðmundsdóttir Á, Sveinsdóttir H, Jónsdóttir, HR, Sigvaldadóttir SÓ, Nonilla VM, Reynisson E, Pétursdóttir M. 2006. Forvarnir í fiskeldi – B-hluti: Flokkun örvera, tilraunir með notkun bætibaktería og próteinmengjarannsóknir. Verkefnaskýrsla 18-06. Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins, 53 bls.
26. Santos Y, Pazos F, Nunez S & Toranzo AE. 1997. Antigenic characterization of *Vibrio anguillarum* related organisms from turbot and cod. *Dis. Aquat. Org.* 28: 45-50.
27. Thomson R, Macpherson HL, Rianza A & Birkbeck TH. 2005. *Vibrio splendidus* biotype 1 as a cause of mortalities in hatchery-reared larval turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) *J. Appl. Microbiol.* 99: 243-250.
28. Bowman JP. 1998. *Pseudoalteromonas prydzensis* sp. nov., a psychrotrophic, halotolerant bacterium from Antarctic sea ice. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 1037-1041.
29. Lauzon HL og Björnsdóttir R. 2006. Forvarnir í fiskeldi. Verkefnaskýrsla 01-06. Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins, 69 bls.
30. Míguez B & Combarro MP. 2003. Bacteria associated with sardine (*Sardina pilchardus*) eggs in a natural environment (Ría de vigo, Galicia, northwest Spain). *FEMS Microbiol. Ecol.* 44: 329-334.
31. Diggle SP, Crusz SA and Cámar M. 2007. Quorum sensing. *Current Biology* 17: R907-R910.
32. Auðunsson GA. 2002. Losun og afdrif efna frá fyrirhuguðu laxeldi Samherja hf í Reyðarfirði. Mat á samlegðaráhrifum/sammögnunaráhrifum vegna byggðar og annarrar atvinnustarfsemi í Reyðarfirði, þ.m.t. hugsanlegt álver í landi Hrauns og Sómastaðargerðis í Reyðarfirði. Ráðgjafarskýrsla Rf 02 - 02. Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins. Júní 2002.
33. Timmons MB, Ebeling JM, Wheaton FW, Summerfelt ST, Vinci BJ. 2002. Recirculating Aquaculture Systems, 2nd edition, Cayuga Aqua Ventures, NY, USA.
34. Howarth RS & Sprague JB. 1978. Copper lethality to rainbow trout in waters of various hardness and pH. *Wat. Res.* 12: 455-462.
35. Handy RD. 2003. Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process? *Comp. Biochem. Phys. Part A* 135: 25-38.
36. Heales D. 1985. Water quality changes during the conditioning of small, closed seawater systems. Report 176. CSIRO Marine Laboratories, Cleveland, Qld, Australia.
37. Hopkins JS, Hamilton RD, Sandifer PS, Browdy CL, Stokes AD. 1993. Effect of water exchange rate on production, water quality, effluent characteristics and nitrogen budgets of intensive shrimp ponds. *J. World Aquacult. Soc.* 24 (3): 304-320.
38. Spotte S. 1979. Seawater Aquariums: The Captive Environment. Wiley, NY, USA.

39. Moe MA Jr. 1993. The Marine Aquarium Reference: Systems and Invertebrates. Green turtle Publications, plantation, FL, 510 bls.
40. Barnabè G. 1994. On growing fish in intensive system. Aquaculture: biology and ecology of cultured species. In: Barnabè G. (Ed.), Ellis Horwood Series in Aquaculture and Fisheries support, bls. 353-356.
41. Alderson R. 1979. The effect of ammonia on the growth of juvenile dover sole, *Solea solea* (L.) and turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Aquacult.* 17: 291-309.
42. El-Shafai SA, El-Gohary FA, Nasr FA, van der Steen NP, Gijzen HJ. 2004. Chronic ammonia toxicity to duckweed-fed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquacult.* 232 (1-4): 117-127.
43. Focht DD & Verstraete W. 1977. Biochemical ecology of nitrification and denitrification. *Adv. Microb. Ecol.* 1, 135-211.
44. Svobodova Z, Machova J, Poleszczuk G, Huda J, Hamackova J, Kroupova H. 2005. Nitrite poisoning of fish in aquaculture facilities with water-recirculating systems. *Acta Veterinaria BRNO* 74 (1): 129-137.
45. Hargreaves AH. 1998. Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. *Aquacult.* 166: 181-212.
46. Belser LW. 1979. Population ecology of nitrifying bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 83: 171-176.
47. SFT, 1997. Klassifisering av miljøkvalitet i fjorder og kystfarvann. Statens Fourensningsstilsyn (SFT). Veiledning 97:03, Oslo.
48. Trépanier C, Parent S, Comeau Y, Bouvrette J. 2002. Phosphorus budget as a water management tool for closed aquatic mesocosms. *Wat. Res.* 36, 1007-1017.
49. Holby O & Hall POJ. 1991. Chemical fluxes and mass balances in marine fish cage farm. II. Phosphorus. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 70: 263-272.
50. Watanabe T. 1982. Lipid nutrition in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 73B: 3-15.
51. Ackman RG and Cormier MG. 1967. α -Tocopherol in some Atlantic fish and shellfish with particular reference to live-holding without food. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 24 (2): 357-373.
52. Rinkinen M, Westermarck E, Salminen S, Ouwehand AC . 2003. Absence of host specificity for in vitro adhesion of probiotic lactic acid bacteria to intestinal mucus. *Vet. Microbiol.* 97 (1-2): 55-61.
53. Klingberg TD, Pedersen MH, Cencic A, Budde BB. 2005. Application of measurements of transepithelial electrical resistance of intestinal epithelial cell monolayers to evaluate probiotic activity. *Appl. Env. Microbiol.* 71 (11): 7528-7530.
54. Magnadóttir B, Gísladóttir B and Gudmundsdóttir S. 2007. The natural antibodies of cod (*Gadus morhua* L.) 7th International Symposium on Fish Immunology, Stirling, Scotland, June 19-22, 2007, p-76.
55. Fuller R. 1989. Probiotics in man and animal. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 365-378.
56. Gatesoupe FJ. 1999. Review: The use of probiotics in aquaculture. *Aquac.* 180: 147-165.
57. Strøm E, Olafsen JA. 1990. The indigenous microflora of wild-captured juvenile cod in net-pen rearing. In: Lésel, R. (Ed.) *Microbiology of Poecilothers.* Elsevier, Amsterdam, pp. 181-185.
58. Ringø E, Strøm E. 1994. Microflora of Arctic charr, *Salvinus alpinus* (L): gastrointestinal microflora of free-living fish and effect of diet and salinity on intestinal microflora. *Aquac. Fish. Manag.* 25: 623-629.
59. Ringø E, Bendiksen HR, Gausen SJ, Sundsfjord A, Olsen RE. 1998. The effect of dietary fatty acids on lactic acid bacteria associated with the epithelial mucosa and from faecalia of Arctic charr, *Salvinus alpinus* (L). *J. Appl. Microbiol.* 85: 855-864.

60. Robertson PAW, O'Dowd C, Burrels C, Williams 4, Austin B. 2000. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquac.* 185: 235-243.
61. Lewus CB, Kaiser A, Montville TJ. 1991. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Appl. Env. Microbiol.* 57: 1683-1688.
62. Gildberg A, Johansen A, Bøgwald J. 1995. Growth and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry given diets supplemented with fish protein hydrolysate and lactic acid bacteria during a challenge trial with *Aeromonas salmonicida*. *Aquac.* 138: 23-34.
63. Noh SH, Han K, Won TH, Choi YJ. 1994. Effects of antibiotics, enzyme, yeast culture and probiotics on the growth performance of Israeli carp. *Korean J. Anim. Sci.* 36: 480-486.
64. Gatesoupe FJ. 1994. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic vibrio. *Aquat. Living Resour.* 7: 277-282.
65. Gildberg A., Mikkelsen H., Sandaker E. & Ringø E. 1997. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Hydrobiologia* 352: 279-285.
66. Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Welch DM, Huse SM, Neal PR, Arrieta JM and Herndi GJ. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere" *PNAS* 103 (32):12115-12120.
67. Huse SM, Huber JA, Morrison HG, Sogin ML and Welch DM. 2007. Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. *Genome Biology* 8 (7): Art. No. R143 2007.
68. Magnadóttir B, Jonsdóttir H, Helgason S, Björnsson B, Solem ST and Pilstrom L. 2001. Immune parameters of immunised cod (*Gadus morhua* L.). *Fish Shellfish Immunology* 11: 75-89
69. Gísladóttir B, Guðmundsdóttir S, Jónsson Z and Magnadóttir B. 2007. C-reactive protein and acute phase response in cod (*Gadus morhua* L.). 7th International Symposium on Fish Immunology, Stirling, Scotland, June 19-22, 2007, p-36.
70. Imsland AK, Foss A, Koedijk R, Folkvord A, Stefansson SO, Jonassen TM. 2006. Short- and long-term differences in growth, feed conversion efficiency and deformities in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) started on rotifers or zooplankton. *Aquac. Res.* 37 (10): 1015-1027.

VIÐAUKI A: KYNNINGARSTARFSEMI A-HLUTANS – FORVARNIR Í ÞORSKELDI

Þátttakendur verkefnisins hafa kynnt verkefnið og niðurstöður þess víða, í skýrsluformi, með veggspjöldum og erindum, bæði hérlendis sem erlendis. Einnig er stefnt að birtingu á nokkrum ritrýndum greinum árið 2008 en þær tengjast doktorsverkefni Hélène L. Lauzon, “Preventive measures in cod aquaculture at early stages”.

Kynningar hérlendis:

1. Lauzon HL og Björnsdóttir R. 2006. Forvarnir í fiskeldi. **Verkefnaskýrsla 01-06**. Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins, 69 bls.
2. **Erindi** á Vísindadögum Keldna, 28.04.2006. **Leitað að bætibakteríum til að bæta afkomu þorsks á fyrstu vikunum eftir klak**. Sigríður Guðmundsdóttir¹, Bjarnheiður K. Guðmundsdóttir¹, Agnar Steinarsson², Berglind Gísladóttir¹, Bergljót Magnadóttir¹, Maja Herold Pedersen³, Birgitte Budde³ og Hélène Liette Lauzon⁴.
3. **Erindi** á Stöðumat og stefnumótun fyrir þorskeldi, ráðstefna á Grand Hótel, Reykjavík, 29.–30. nóvember 2007. **Áhrif bætibaktería á þorsklirfur – framtíðar möguleikar**. H.L. Lauzon, S. Guðmundsdóttir, A. Steinarsson, M. Oddgeirsson, E. Reynisson, S.K. Pétursdóttir, B. Magnadóttir og B.K. Guðmundsdóttir.
4. **Erindi** á Stöðumat og stefnumótun fyrir þorskeldi, ráðstefna á Grand Hótel, Reykjavík, 29.–30. nóvember 2007. **Ónæmissvörun þorsklirfa sem baðaðar eru með bætibakteríum (probiótica)**. S. Guðmundsdóttir, B. Magnadóttir, B.K. Guðmundsdóttir, Í.Ö. Árnason, A. Steinarsson, M. Oddgeirsson og H.L. Lauzon.
5. **Veggspjald** á Stöðumat og stefnumótun fyrir þorskeldi, ráðstefna á Grand Hótel, Reykjavík, 29.–30. nóvember 2007. **Natural antibodies, C-reactive protein and anti-trypsin activity in cod (*Gadus morhua* L.) fry bathed in or fed with potential probiotic bacteria**. Sigríður Guðmundsdóttir, Hélène L. Lauzon, Ívar Örn Árnason, Bjarnheiður K. Guðmundsdóttir, Berglind Gísladóttir, Agnar Steinarsson and Bergljót Magnadóttir.

Kynningar erlendis:

6. **Erindi** á International Symposium on Aquatic Animal Health, Sept. 2-6, 2006, San Francisco. Ráðstefnuhandbók, bls.126. **Searching for probiotic bacteria for use in the early stages of Atlantic cod (*Gadus morhua*) rearing**. Sigríður Guðmundsdóttir¹, Bjarnheiður K. Guðmundsdóttir¹, Agnar Steinarsson², Berglind Gísladóttir¹, Bergljót Magnadóttir¹, Maja Herold Pedersen³, Birgitte Budde³ og Hélène Liette Lauzon⁴ (2006).
7. **Veggspjald** á The Seventh International Symposium on Fish Immunology, Stirling, June 19 – 22, 2007. **Natural antibodies, C-reactive protein and anti-trypsin activity in cod (*Gadus morhua* L.) fry bathed in or fed with potential probiotic bacteria**. Sigríður Guðmundsdóttir, Hélène L. Lauzon, Ívar Örn Árnason, Bjarnheiður K. Guðmundsdóttir, Berglind Gísladóttir, Agnar Steinarsson and Bergljót Magnadóttir.
8. **Erindi** á The Seventh International Symposium on Fish Immunology, Stirling, June 19 – 22, 2007. **Effects of probiotic bacteria on larvae of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.)**. Sigríður Guðmundsdóttir, Hélène L. Lauzon, Ívar Örn Árnason, Bjarnheiður K. Guðmundsdóttir, Agnar Steinarsson and Bergljót Magnadóttir.
9. **Erindi** á 13th EAFP International Conference on ‘Diseases of Fish and Shellfish’, Grado, Italy, 17th – 21st September, 2007. **Influence of microbial treatments on survival, development and microbiota of Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae**. H.L. Lauzon, S. Guðmundsdóttir, A. Steinarsson, E. Reynisson and B.K. Guðmundsdóttir.