

Nýsköpun & neytendur  
Innovation & Consumers

Vinnsla, virðisaukning & eldi  
Value Chain, Processing  
& Aquaculture

Mælingar & miðlun  
Analysis & Consulting

Líftækni & lífefni  
Biotechnology & Biomolecules

Öryggi, umhverfi & erfðir  
Food Safety, Environment  
& Genetics



# Ræktun og nýting svifþörunga úr hafinu við Ísland

Jónína Þ. Jóhannsdóttir  
Friðbjörn Möller  
María Pétursdóttir  
Hlynur Ármannsson  
Kristinn Guðmundsson  
Rannveig Björnsdóttir

Vinnsla, virðisaukning og eldi

Skýrsla Matís 24-12  
Júní 2012

ISSN 1670-7192

# Ræktun og nýting svifþörunga úr hafinu við Ísland

## Culturing and utilization of marine algae from the sea surrounding Iceland

### MATÍS – Skýrsla

Júní 2012

#### Höfundar skýrslu:

Jónína Þ. Jóhannsdóttir<sup>1)</sup>

Friðbjörn Möller<sup>2)</sup>

María Pétursdóttir<sup>1)</sup>

Hlynur Ármannsson<sup>3)</sup>

Kristinn Guðmundsson<sup>3)</sup>

Rannveig Björnsdóttir<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup> Matís, Vínlandsleið 12, 113 Reykjavík

<sup>2)</sup> Háskólinn á Akureyri, Auðlindafræði, Norðurslóð 2, 600 Akureyri

<sup>3)</sup> Hafrannsóknastofnunin, Skúlagötu 4, 121 Reykjavík

#### Þátttakendur og styrktaraðilar:

Matís ohf.

Háskólinn á Akureyri

Hafrannsóknastofnunin

Verkefnasjóður sjávarútvegsins



SJÁVARÚTVEGS- OG  
LANDBÚNAÐARRÁÐUNEYTIÐ

Titill / Title	<b>Ræktun og nýting svifþörungna úr hafinu við Ísland /</b> Culturing and utilization of marine algae from the sea surrounding Iceland		
Höfundar / Authors	Jónína Þ. Jóhannsdóttir, Friðbjörn Möller (nemandi), María Pétursdóttir, Hlynur Ármannsson, Kristinn Guðmundsson og Rannveig Björnsdóttir.		
Skýrsla / Report no.	24-12	Útgáfudagur / Date:	Júní 2012
Verknr. / project no.	2005-2062		
Styrktaraðilar / funding:	Verkefnasjóður sjávarútvegsins		
Ágrip á íslensku:	<p>Breytileiki svifþörunganna er mikill en í sjó á norðurhveli jarðar eru kísilþörungar og svipþörungar algengastir. Svifþörungar hafa verið ræktaðir í Japan frá því um 1960 og nýttir til að auðga næringarinnihald ýmiskonar fæðu og hafa þannig jákvæð áhrif á heilsu bæði manna og dýra. Hátt hlutfall omega 3 (<math>\omega 3</math>) og <math>\omega 6</math> fitusýra í kaldsjávarþörungum gera þá einnig að áhugaverðum kosti í ræktun.</p> <p>Megin markmið verkefnisins var að einangra þörungna úr hafinu við Ísland og rækta á rannsóknastofu við mismunandi aðstæður. Tekist hefur að einangra og viðhalda hreinræktum af 4 tegundum kaldsjávarþörungna, <i>Phaeodactylum tricornutum</i>, <i>Microcystis</i> sp., <i>Chlorella</i> sp. og <i>Dunaliella salina</i>. Fituinnihald og hlutfall <math>\omega 3</math> fitusýra reyndist hæst í <i>P. tricornutum</i> en tegundirnar innihéldu allar tiltölulega hátt hlutfall <math>\omega 3</math> fitusýra og voru auðveldar í ræktun þó svo að vöxtur þeirra væri mismunandi háð aðstæðum. Niðurstöður benda til þess að fituinnihald og hlutfall mismunandi fitusýra sé breytilegt eftir vaxtarstigum. Niðurstöður sýna ennfremur að hjóldýr éta <i>Microcystis</i> sp. og <i>Chlorella</i> sp. og því mögulega áhugavert að nýta þessar tegundir til auðgunar hjóldýra sem notuð eru sem lifandi fóðurdýr við eldi sjávarlirfa í fiskeldi.</p> <p>Verkefnið hefur leitt af sér ný verkefni þar sem unnið er áfram með þær tegundir þörungna sem tekist hefur að rækta í hreinræktum. Markmið þessara rannsókna er annars vegar að þróa áfram aðferðir við ræktun í því markmiði að auka hlutfall fitu og vinna fituefni úr þörungum og hins vegar tilraunir með ræktun tegundanna í affallsvatni frá fiskeldisstöð. Einnig er hafin tilraun í eldi þorskseiða með notkun þessara tegunda þörungna við auðgun fóðurdýra lirfa.</p>		
Lykilorð á íslensku:	<i>Svifþörungar, ræktun, omega 3,</i>		
Summary in English:	<p>Phytoplankton is the autotrophic component of the plankton community. Phytoplankton has been cultured since 1960 in Japan for a variety of purposes, including foodstock for other aquacultured organisms and a nutritional supplement. The most abundant groups of microalgae around Iceland are the diatoms and dinoflagellates. High omega 3 (<math>\omega 3</math>) and <math>\omega 6</math> fatty acid content in cold water marine algae make them interesting for culturing.</p> <p>The main goal of the project was to search expedient plankton suitable for culturing and investigate the effects of different culture conditions. Four species of cold-water algae have been isolated in monocultures, <i>Phaeodactylum tricornutum</i>, <i>Microcystis</i> sp., <i>Chlorella</i> sp. og <i>Dunaliella salina</i>. <i>P. tricornutum</i> was found to contain the highest fatty acid and <math>\omega 3</math> content but all species were relatively high in <math>\omega 3</math> content and were easy to culture. The results indicate that the fatty acid composition differed with respect to growth stages. The results also indicate that rotifers grazed on <i>Microcystis</i> sp. and <i>Chlorella</i> sp., thereby making them interesting for enrichment of the live prey commonly used in marine aquaculture.</p> <p>The project has resulted in new projects with further studies on the isolated species and developing methods for increasing their fat content, processing methods for extraction of the fat content and culturing using waste water from aquaculture farms. Also, two of the algae species are presently being used for enrichment of the live prey of cod larvae in an ongoing project.</p>		
English keywords:	<i>Phytoplankton, culturing, omega 3</i>		

## EFNISYFIRLIT

<b>1. INNGANGUR</b> .....	<b>1</b>
<b>2. FRAMKVÆMD</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1. Innsöfnun sýna og meðhöndlun</b> .....	<b>4</b>
<b>2.2. Einangrun þörunga</b> .....	<b>5</b>
<b>2.3. Ræktun þörunga á rannsóknastofunni</b> .....	<b>6</b>
<b>2.3. Eiginleikar þörungategunda</b> .....	<b>7</b>
2.3.1. Samsetning bakteríuflóru .....	7
2.3.2. Bakteríuhamlandi virkni .....	8
2.3.3. Næringarefnasamsetning .....	9
<b>3. NIÐURSTÖÐUR OG UMRÆÐUR</b> .....	<b>10</b>
<b>3.1. Tegundagreining þörunga í innsöfnuðum sýnum</b> .....	<b>10</b>
<b>3.2. Ræktun þörunga við stýrðar aðstæður</b> .....	<b>12</b>
<b>3.3. Einangrun þörunga og hreinræktun</b> .....	<b>13</b>
3.1.1. <i>Phaeodactylum tricornutum</i> .....	13
3.2.2. <i>Microcystis</i> sp. ....	15
3.1.3. <i>Dunaliella salina</i> .....	17
3.1.4. <i>Chlorella</i> .....	18
<b>3.3. Efnainnihald þörungategunda</b> .....	<b>19</b>
3.3.1. Næringarefnainnihald .....	19
3.3.2. Fitusýrusamsetning .....	20
<b>3.4. Samsetning bakteríuflóru og bakteríuhamlandi virkni</b> .....	<b>24</b>
<b>3.5 Notkun þörunga við ræktun hjóldýra</b> .....	<b>26</b>
<b>4. ÁLYKTANIR</b> .....	<b>27</b>
<b>5. ÞAKKARORÐ</b> .....	<b>29</b>
<b>6. HEIMILDIR</b> .....	<b>29</b>
<b>7. VIÐAUKI</b> .....	<b>31</b>

## 1. INNGANGUR

Svifþörungar eru hluti af svifi sjávar (plöntusvif). Breytileiki svifþörunganna er mikill en á norðurhveli jarðar eru kísilþörungar og svipuþörungar algengastir. Svifþörungarnir geta með hjálp sólarljóss myndað lífræn efni úr ólífrænum og eru þeir megin uppspretta lífrænna fæðuefna handa öðrum lífverum. Svifþörungarnir eru þannig fæða dýrasvifsins, sem sjálf er svo fæða fiskungviðis og uppsjávarfiska. Svifþörungar eru því grundvöllur alls dýralífs í sjónum og þar með fiskistofna.

Magn svifþörungna er háð náttúrulegum skilyrðum í sjónum. Vegna legu landsins á mörkum hlýrra og kaldra hafstrauma eru umhverfisaðstæður hér við land mjög breytilegar, bæði í tíma og rúmi. Segja má að ástand sjávar hér við land sé tiltölulega óstöðugt, sérstaklega fyrir norðan landið þar sem innflæði hlýs Atlantssjávar er mjög breytilegt frá ári til árs. Það er þó einmitt þessi breytileiki sem á sinn þátt í því að íslenska hafsvæðið er jafn frjósamt og raun ber vitni. Þannig stuðla bæði vindar og straumar að því að nýr forði næringarefna berst upp til efri sjávarlaga þar sem hann nýtist svifþörungunum. Á hinn bóginn stuðlar þessi sami breytileiki einnig að því að sveiflur frá ári til árs í framleiðni dýrastofna hér við land geta orðið tiltölulega miklar (Jónsson, 2004). Vaxtarskilyrði svifþörungna eru því mjög góð hér við land og er íslenska hafsvæðið á meðal frjósömstu hafsvæða heims (Hafrannsóknastofnun, 2006). Þannig hefur verið áætlað að svifþörungar innan íslensku efnahagslögsögunnar bindi um 120 milljón tonn af kolefni í lífræn efni á ári, sem slagar hátt upp í það sem er í Barentshafi, en þar eru sem kunnugt er einnig mjög auðug fiskimið (Gíslason, 2002).

Verulegur munur getur verið á magni svifþörungna milli svæða, dýpis og ára (Eydal, 2003; Guðmundsson, 2002). Takmarkaðar rannsóknir hafa verið gerðar á svifþörungum í íslenskum fjörðum en vistfræðirannsóknir í íslenskum fjörðum hafa verið framkvæmdar af Matís („Íslenskir firðir: Náttúrulegt lífríki Ísafjarðardjúps og þolmörk mengunar“) og Hafrannsóknastofnun svo og rannsóknir á eitruþörungum í tengslum við ræktun kræklinga. Framvinda svifþörungna er að mörgu leyti svipuð á þeim stöðum við landið sem rannsakaðir hafa verið. Kísilþörungar eru ríkjandi að vori þegar gróðurinn fer af stað, skoruþörungar taka við yfir sumarið ásamt smáum svipuþörungum en á haustin er blanda skoru- og kalksvifþörungna (Gunnarsson, 2003). Í Eyjafirði voru framkvæmdar rannsóknir á

frumframleiðni fjarðarins og magni plöntusviðs á árunum 1992-1993 (Guðmundsson, 2002; Jónsson, 1996). Snemma vors er styrkur næringarefna hár og plöntusviðið í fullum blóma. Helstu tegundir sem finnast í Eyjafirði á vorin þegar mest magn blaðgrænu mælist eru kísilþörungarnir *Thalassiosira nordenskioeldii*, *Pseudo-nitzschia granii* og *P. pouchetii*. Um sumarið þegar ganga fer á næringarefnin verða skorupörungar ríkjandi, aðallega af ættinni *Protoperdinium* og af þeim er *P. pellucidum* mest áberandi auk smærri kísilþörungna (Jónsson, 1996). Breytingar á umhverfisþáttum yfir árið eru þó mismunandi og tengjast þær veðráttu þannig að samsetning þörungategunda getur verið mismunandi milli ára.

Nýting stórpörunga (þangs og þara) á sér langa sögu um víða veröld en þeir eru prótínríkir og sumar tegundir innihalda mikið magn af fjölmöttuðum fitusýrum og lausum amínósýrum. Á Íslandi er þessi saga styttri og nýting þörungna fremur takmörkuð. Íslendingar þekkja helst söl til slíkra nota og hér hefur þang verið borið beint á akra auk framleiðslu lífræns þangmjöls. Svifþörungar eru víða nýttir sem bindiefni í mat og einnig sem dýrafóður og til áburðar á akra.

Samfélag svifþörungna er fjölbreytt hvað varðar stærð, næringarnám, vaxtarhraða, búsvæði og efnasamsetningu en þeir eru orku- og efnaríkir með góða samsetningu fitusýra auk þess að innihalda andoxandi efni og ýmiskonar lífvirkni. Svifþörungar hafa verið ræktaðir síðan 1960 í Japan og fjöldi tegunda og stofna eru til í gagnabönkum víðsvegar um heiminn. Meðal helstu flokka svifþörungna í ræktun má nefna: kísilþörungna (*Baccilariophyceae*), skorupörunga (*Dinophyceae*), dulþörungna (*Cryptophyceae*), pnymsesiophyta (*Prymnesiophyceae*) og prasinophyta (*Prasinophyceae*). Vegna efnainnihalds svifþörungna, er hægt að nýta þá til að auðga næringarinnihald ýmiskonar fæðu bæði manna og dýra og hafa þannig jákvæð áhrif á heilsu. Efnainnhald svifþörungna er þó mismunandi eftir tegundum auk þess sem ræktunaraðstæður hafa einnig áhrif. Rannsóknir hafa sýnt að fituinnihald er á bilinu 1-70% en það geti farið upp í 90% af þurrvigt við ákveðnar aðstæður (Metting, 1996). Á meðal þeirra fitusýra sem þörungar innihalda eru bæði  $\omega 3$  og  $\omega 6$  fitusýrur sem eru mjög áhugaverðar og er einnig hægt að hafa áhrif á hlutfall þeirra með umhverfisaðstæðum (Brown *et al.*, 1997; Tonon *et al.*, 2002). Auk þess að vera ríkir af fitusýrum eru svifþörungar einnig mikilvæg uppspretta vítamína (t.d. A, B1, B2, B6, B12, C, E, nicotinate, biotin, folic sýru og pantothenic sýru og er hægt að hafa áhrif á magn með aðferðum við ræktun (Spolaore *et*

*al.*, 2006). Svifþörungar innihalda mikið magn ýmissa litarefna eins og chlorophyll, carotenoids og phycobiliproteina sem eru notuð í ýmiskonar afurðir. Meltanleiki þörungna er hár sem auðveldar notkun þurrkaðra afurða í fóður (Spolaore *et al.*, 2006).

Þörungar geta undir vissum skilyrðum náð gríðarlegum vaxtarhraða og jafnvel tvöfaldað þyngd sína nokkrum sinnum á sólarhring (Svavarsson, 2010). Þetta er margfalt meiri vaxtarhraði en þekkist meðal annarra nytjaplantna sem gerir svifþörungarækt að mjög áhugaverðum kosti við bindingu CO<sub>2</sub> úr andrúmslofti. Margvísleg verðmæti er auk þess að finna í þörungalífmassa og sem notkunarvið má nefna þörungna sem lífmassa í eldiskerjum, þörungamjöl í fóður fyrir eldisfiska og olíu til notkunar í húð- og heilsuvörur, matvæli svo og eldsneytisframleiðslu (Spolaore *et al.*, 2006). Hér á landi hefur lífvirkni þörungna verið rannsakað hjá Matís auk þess sem nú standa yfir rannsóknir í samvinnu Biopol á Skagaströnd og Háskólans á Akureyri á ákveðnum tegundum ófrumbjarga sjávarþörungna af flokki *Thraustochytrids* (Thraustar) og hafa afurðir þeirra m.a. verið notaðar í fiskifóður og sem fæðubótaefni.

Niðurstöður rannsókna í fyrra verkefni (Ræktun dýrasvifs, styrkt af Verkefnasjóði sjávarútvegsins 2009-2010) leiddi í ljós að unnt reyndist að rækta þörungna sem safnað var úr sjónum í Eyjafirði, við stýrðar aðstæður á rannsóknastofunni. Hins vegar reyndist ekki unnt að koma upp þéttri rækt af villtum þörungum við þau ræktunarskilyrði sem prófuð voru. Meginmarkmið þessa verkefnis var að safna þörungum úr sjónum við Ísland, einangra stakar tegundir, tegundagreina þær og rannsaka áhrif mismunandi aðstæðna á vöxt og næringarsamsetningu þeirra.

## **2. FRAMKVÆMD**

Verkefnið var unnið í samstarfi milli Matís, Háskólans á Akureyri og Hafrannsóknastofnunar. Vinna við verkefnið hefur að mestu verið í samræmi við það sem sett var fram í umsókn til sjóðsins og hefur rannsóknahluti verkefnisins að mestu verið unninn af nemanda í rannsóknatengdu BS námi við HA í nánú samstarfi við sérfræðinga Matís og Hafrannsóknastofnunar.

### **2.1. Innsöfnun sýna og meðhöndlun**

Leiðangrar til sýnatöku voru farnir á tímabilinu maí 2011 til mars 2012, bæði á rannsóknarbáti Hafrannsóknastofnunar (Einari í Nesi) og nýttar hafa verið ferðir starfsmanna og nemanda sem farnar hafa verið í öðrum tilgangi. Innsöfnun sýna hefur farið fram á nokkrum stöðum í Eyjafirði (úr Pollinum við Akureyri, við Dalvík, Árskógsströnd, Hjalteyri, Krossanes, Svalbarðseyri, Grenivík og við Hörgárósa) og einnig hafa sýni verið tekin í Skjálfandaflóa og við Vestmannaeyjar.

Við sýnatöku á rannsóknabáti var notaður svifdýraháfur sem er 2,5 metra langur með 90  $\mu$ m neti og opi sem er 90 cm í þvermál og tengt sýnatökuboxi. Háfnun var sökkt í sjó á 15 metra dýpi og dreginn varlega upp á yfirborðið þar sem skolað var úr sýnatökuboxi. Sýni voru síuð gegnum stafila af stigminnkandi síum (250, 125 og 63  $\mu$ m) til að ná frá stórum svifdýrum og gróðri en síunarvökva sem fór í gegn var komið fyrir í 5 lítra glærum ræktunareiningum úr plasti sem innihéldu næringarlausn og flutt á rannsóknastofuna. Sýnataka á landi eða af bryggjum var framkvæmd með sama hætti að því undanskildu að sýnum var ausið með fötu og þau síuð eins og áður er lýst. Sýni sem safnað var frá Vestmannaeyjum voru þó ekki síuð á staðnum heldur var næringu bætt út í glösin og sýnin síuð þegar komið var á rannsóknastofu.



## 2.2. Einangrun þörunga

Við einangrun þörunga var stuðst við aðferðir sem heimildir sýna að hafi nýst vel í þessum tilgangi. Hins vegar er vel þekkt að erfitt er að einangra stakar tegundir þörunga úr blönduðum ræktum ef ekki er notuð flæðifrumusjá. Eftirfarandi aðferðir voru notaðar í verkefninu við einangrun þörunga úr innsöfnuðum sýnum:

Sáning á agaræti. Úr innsöfnuðum sýnum var sáð á næringarauðgaðan Marine agar (1ml/L Conwy medium) og ræktað við tvö mismunandi hitastig: 22-25°C og 10°C með lýsingu. Skálar voru skoðaðar daglega í leit að þörunga-kólóníum. Þegar greinilegar kólóníur höfðu náð að vaxa upp þá var tekið úr stökum kólóníum og umsáð í sjó með næringarlausn.

Þynningaraðferð. Sýni úr ræktum voru þynnt tífalt í hreinum sjó (1ml/10ml) og hrist vel. Síðan var 1ml úr þeirri lausn sett út í 9ml af hreinum sjó og þannig var haldið áfram og útbúnar 12 þynningar á sama hátt. Úr hverri rækt voru útbúnar nokkrar alveg eins þynningarraðir sem ræktaðar voru með mismunandi næringu (Conwy medium, F2 næring og T næring) auk þess sem ræktað var við mismunandi hitastig (10 - 12°C og 20 - 25°C) með lýsingu (18 klst ljós / 6 klst myrkur). Glösin voru skoðuð daglega og hrist tvisvar á dag til að fá loftun, auk þess sem fylgst var með ræktum á hverjum degi í smásjá.

Prófað var að einangra stakar þörungategundir með þynningaraðferð bæði úr innsöfnuðum sýnum sem ræktuð höfðu verið á rannsóknastofunni, með íblöndun næringar, og einnig beint úr sýnum strax við innsöfnun. Þetta var gert til þess að koma í veg fyrir að missa af þörungategundum í innsöfnuðum sýnum sem ekki náðu að vaxa á tilbúinni næringu.

Pípettuaðferð. Sýni úr ræktum var komið fyrir á gleri undir víðsjá og glerpípetta notuð til að reyna að ná stökum þörungum og koma fyrir í hreinum sjó með mismunandi næringu og við mismunandi hitastig. Þessi aðferð reyndist mjög erfið þar sem þörungar eru mjög smáir og erfitt að ná einstaka þörungum með pípettu.

Sýni af þörungum voru send til starfsmanns Hafrannsóknastofnunnar til tegundagreiningar þar sem greining var gerð með ljóssmásjá og mismunandi ljóssíum til að skerða bylgjusviðið í innfallandi ljósi eða með litunarprófi þar sem notað var joð. Sumar tegundir þörunga voru

auk þess tegundagreindar af nemanda sem notaði til þess greiningarlykil Hafrannsóknastofnunar.

### 2.3. Ræktun þörunga á rannsóknastofnunni

Aðstaða til ræktunar á þörungum við stýrðar aðstæður var sett upp í sameiginlegu rannsóknarými að Borgum á Akureyri í tengslum við fyrra verkefni („Tilraunaræktun náttúrulegs dýrasvifs og gæði dvalareggja“). Í tengslum við þetta verkefni hefur ræktunaraðstaðan verið endurbætt og settar upp stærri og fleiri ræktunareiningar sem hægt er að hafa við herbergishita og einnig þar sem hitastigi er stjórnað með vatnsbaði eða í hitaskápum.

Síunarvökva sem fór í gegnum 63µm síu við innsöfnun var komið fyrir í 5 lítra glærum ræktunareiningum úr plasti eða 2L glerkolbum með næringarblöndu. Loftdælu var komið fyrir í ræktunarlátunum og loftið síað í gegnum bakteríu- og gróhelda síu auk þess sem bómullartappi var hafður í opinu til þess að loft kæmist út. Við ræktun þörunga voru eftirfarandi umhverfisþættir rannsakaðir:

- Hitastig: 10°C og 15°C auk stofuhita (22-25°C).
- Lýsing: notað var daylight, 36W lýsing í 18 klukkustundir og 6 tímar í myrkri til þess að líkja eftir náttúrulegum aðstæðum þegar mestur þörungablómi er í hafinu við Ísland
- Eldisvökvi: þörungum var sáð í sjó sem síaður hafði verið í gegnum sandfilter og hafður í fullri seltu. Einnig voru gerðar tilraunir með tilbúinn sjó (Instant Ocean®) með seltustig 30-33 ppt.
- Næringarlausnir: Þörungar voru ræktaðir í nokkrum mismunandi næringarlausnum en hins vegar kom í ljós, við leit á netinu, að flestar næringarefnalausnir sem notaðar eru innihalda svipuð næringarefni. Prófaðar voru mismunandi næringarlausnir til þess að athuga hvort hægt væri að stjórna því hvaða tegundir þörunga fara að vaxa úr sömu sýnum. Sem dæmi má nefna að þekkt er að kísilþörungar þurfa kísil til þess að vaxa og þurfa aðrar tegundir þörunga önnur næringarefni. Gerðar voru tilraunir með íblöndun niturs (**NH<sub>4</sub>**,**NO<sub>3</sub>**) í sjó og áhrif þess á vöxt þörunga rannsökuð. Nánari innihaldslýsing á þeim næringarlausnum sem prófaðar voru er að finna í viðauka við skýrsluna. Í byrjun var næringu bætt í sjóinn í hlutföllum 1,0ml á móti hverjum líter af sjó, en síðan var styrkur næringarlausna aukinn í 1,5 ml í hverjum líter.
- Einnig hafa verið gerðar tilraunir með að bæta CO<sub>2</sub> út í ræktir í litlu magni

Sömu aðstæður voru notaðar við ræktun innsafnaðra sýna og þegar búið var að ná tegundum í hreinrækt. Fylgst var daglega með lit ræktanna og vexti þörunga þar sem sýni voru tekin og skoðuð undir víðsjá eða smásjá auk þess sem vöxtur þörunga var kannaður með ljósgleypnimælingu og talningu undir smásjá. Sjó og næringu var bætt í ræktunareiningar eftir þörfum, annaðhvort þegar litur ræktanna var orðinn mjög dökkur eða þegar ljósgleypnimælingar sýndu að hámarksþéttleika hafði verið náð.

Ræktunarflöskur voru hreinsaðar með jöfnu millibili en þá voru flöskurnar fylltar með sjóðandi heitu vatni með 4 klórtöflum og það látið standa í 24 tíma áður en flöskur voru skolaðar og notaðar að nýju. Til þess að forðast smit á milli rækta voru ávallt notaðir nýir loftsteinar auk þess sem fjölnota pípettur, tilraunaglös og annar glerbúnaður var klóraður eða hreinsaður með spritti.

### **2.3. Eiginleikar þörungategunda**

Eiginleikar þörungategunda voru rannsakaðir með því að skoða bakteríuflóru sem fylgir innsöfnuðum sýnum, áhrif þörunganna á vöxt þekktra sýkingarvaldandi baktería auk þess sem næringarefnasamsetning og samsetninga fitusýra í tegundunum var skoðuð. Einnig var gerð tilraun þar sem skoðað var hvort hjóldýr ætu þörungana og var þetta gert með það að markmiði að kanna möguleika á að nýta þörungana til þess að auðga hjóldýr og bæta þannig fituinnihald þeirra og gera þau heppilegri sem fóður fyrir smálirfur sjávarfiska.

#### **2.3.1. Samsetning bakteríuflóru**

Bakteríuflóra var rannsökuð í innsöfnuðum sýnum og í sýnum sem tekin voru úr ræktunareiningum á rannsóknastofunni. Samsetning bakteríuflóru var rannsakað með DGGE aðferð og samanburður gerður á villtum sýnum og þörungum í ræktun.

Við einangrun erfðaefnis úr sýnum voru notuð mismunandi einangrunarkit frá MoBio (MoBio Soil, MoBio RapidWater og MoBio Power Soil). Við mögnun erfðaefnis var notast við tvö mismunandi vísapör (515/816 og 341/534) og afurðir greindar með rafdrætti á DGGE geli úr 8% Acrylamide og með 30-60% afmyndandi styrkhallanda (denaturing gradient). Samanburður var gerður á milli samsetningar bakteríuflóru í sýnum af mismunandi

þörungaræktum með því að bera saman munstur á gelum en bönd voru ekki skorin út til raðgreiningar og staðfestingar á bakteríutegundum sýnanna.

### 2.3.2. Bakteríuhamlandi virkni

Til rannsókna á bakteríuhamlandi virkni voru skoðuð bæði áhrif þörunganna sjálfra (sameinda á yfirborði þeirra og verkun þörunganna beint) og hvort þeir framleiddu efni sem hafa áhrif á vöxt þekktra sýkingarvaldandi baktería í fiski. Bakteríustofnar sem notaðir voru í tilraunir voru fengnir frá Rannsóknastofnun Háskóla Íslands í meinafræði á Keldum (Tafla 1).

**Tafla 1. Bakteríustofnar sem notaðir voru sem prófstofnar í rannsóknum á bakteríuhamlandi áhrifum þörunga og efna sem þeir framleiða.**

Matís nr.	Nafn	Stofnanúmer
1	<i>Yersinia ruckeri</i>	NCTC10476
2	<i>Yersinia ruckeri</i>	F128-04
3	<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC14715
4	<i>Aeromonas bestarium</i>	ATCC51108
5	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	NCIMB1102
6	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i>	NCIMB1110
7	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i>	Keldur265-87
8	<i>Moritella viscosa</i>	88/478
10	<i>Aliivibrio logei</i>	NCMB1143
12	<i>Vibrio anguillarum</i> O2 alpha	SES 0303
13	<i>Vibrio anguillarum</i> O2 beta	F139-04
14	<i>Vibrio splendidus</i>	NCMB1
15	<i>Vibrio pelagius</i>	vib305

Við rannsóknir á bakteríuhamlandi virkni þörunga voru notaðar svokölluð dropaaðferð (Bjornsdottir *et al.*, 2010) og holu-agars aðferð sem þróuð var af nemanda í rannsóknatengdu BS námi í Líftækni við Háskólann á Akureyri í samvinnu við sérfræðinga Matís (Hermannsdottir *et al.*, 2009).

Bakteríustofnum var sáð á yfirborð Tryptic soy agars (TSA) sem þynntur var í 70% sjóvatni (TSA-SW). Þörungaræktir (1 L) voru spunnar niður við 2000 rpm í 10 mín. og flotið tekið varlega ofan af. Sýnum af bæði floti og þörungum var komið fyrir á ræktunarskálum með prófstofnum með mismunandi hætti:

- Dropi af flotinu (10 µl) settur á yfirborð agar-skálar (dropaaðferð).
- Þörungar í botnfalli voru leystir upp í sjó sem innihélt 1 ml/L af næringarefni (Conwy medium). Sýnum úr þessari blöndu var komið fyrir í holum á yfirborði holu-agars (40µl/holu).

Skálar voru ræktaðar við stofuhita í 6 daga áður en vöxtur og eyður í kringum dropa eða holur var rannsakað.

### 2.3.3. Næringarefnasamsetning

Sýnum til greininga á næringarefnasamsetningu var safnað úr eldiseiningum þörunga á mismunandi tímum, bæði úr blönduðum ræktum þörunga og hreinræktum. Þörungum var safnað úr ræktunareiningum með því að spinna sýni á fullum hraða (2000rpm) í 3 mín, og floti hellt ofan af botnfallinu.

Næringarefnasamsetning sýna var rannsökuð á rannsóknastofu Matís á Akureyri en greining á samsetningu fitusýra var framkvæmd á rannsóknastofu Matís í Reykjavík eftir að fita hafði verið dregin út og sýni undirbúin á Akureyri.

#### Fitusýrugreining:

Undirbúningur sýna fólst í útdrætti fitu sem gerð var með eftirfarandi aðferð:

1. 10g af sýni þeytt með 10ml af klóróformi/metanól blöndu (80/20) í 1 mín. 25ml af leysinum bætti við og þeytt í aðra mínútu.
2. Sett í skilvindu, hitastillt á 15°C, hraði 200rpm, í 5 mín
3. Leysir sem inniheldur fituna úr sýninu er veiddur úr skilvinduglasi (neðsta lag) yfir í kúluflösku
4. Fitán í kúlufloöskunni vigtuð og leyst upp í 10ml ísooktani (notaðir eru 10 mL óháð magni fitu).

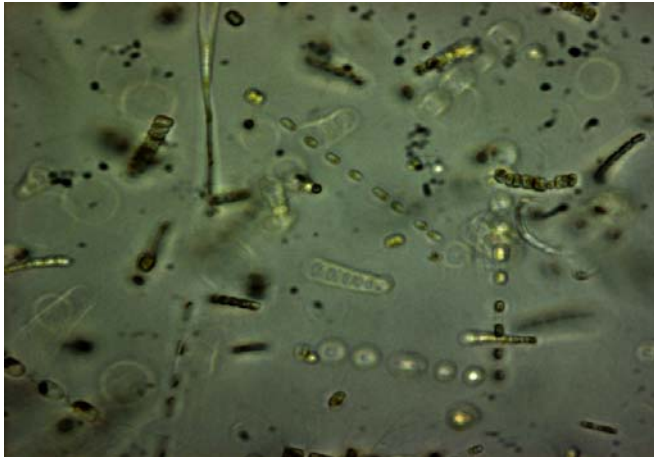
Greining fitusýrusamsetningar var síðan framkvæmd með stöðluðum aðferðum á rannsóknastofu Matís í Reykjavík. Niðurstöður fitusýrugreiningar eru settar fram sem meðaltöl tveggja ákvarðana en útdráttur fitu var einfaldur fyrir hvert sýni.

Næringarefnasamsetning: Næringarefnagreining þar sem mælt var magn próteins, vatns, fitu og ösku var gerð á rannsóknastofu Matís að Borgum, Akureyri. Mælingar voru framkvæmdar í þrítekningu fyrir hvert sýni. Próteininnihald var mætt með Kjeldahl aðferð, fita með Soxhlet aðferð og aska með AOAC aðferð. Fyrir frekari lýsingu á aðferðum við efnamælingar er vísað á Matís skýrslu 33-11 (<http://www.matis.is/media/matis/utgafa/33-11-Naeringargildi-sjavarafurda.pdf>).

### 3. NIÐURSTÖÐUR OG UMRÆÐUR

#### 3.1. Tegundagreining þörunga í innsöfnuðum sýnum

Mikill fjöldi þörungategunda var í innsöfnuðum sýnum (Mynd 1).



*Mynd 1. Dæmi um fjölda tegunda þörunga í innsöfnuðum sýnum.*

Stundum reyndist erfitt að tegundagreina þörunga í sýnum út frá útliti og til þess að fá nákvæma tegundagreiningu þyrfti að tegundagreina út frá raðgreiningu á erfðaefni. Í töflu 2 má sjá yfirlit yfir þær tegundir þörunga í innsöfnuðum sýnum sem var mögulegt að greina út frá útliti.

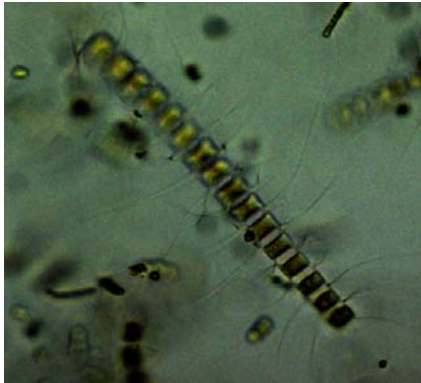
**Tafla 2 Yfirlit yfir þörungategundir sem greindar hafa verið í innsöfnuðum sýnum.**

tegund	Söfnunarstaðir	Tímabil
<i>Skeletonema costatum</i> *	Dalvík, Árskógsströnd, Hjalteyri, Krossanes, Grenivík, Svalbarðseyri	Maí, Júní 2011
<i>Chaetoceros didymus</i> *	Dalvík, Árskógsströnd, Hjalteyri, Krossanes, Grenivík, Svalbarðseyri	Maí, Júní 2011
<i>Ceratium fusus</i> *	Dalvík, Árskógsströnd, Hjalteyri, Krossanes, Grenivík, Svalbarðseyri	Maí, Júní 2011
<i>Cylindrotheca closterium</i>	Dalvík, Árskógsströnd, Hjalteyri, Krossanes, Grenivík, Svalbarðseyri	Maí, Júní 2011
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Dalvík, Árskógsströnd, Hjalteyri, Krossanes, Grenivík, Svalbarðseyri, Vestmannaeyjar	Maí, Júní, Júlí, Ágúst September 2011
<i>Dunaliella salina</i>	Vestmannaeyjar	Ágúst 2011
<i>Alexandrius tamarensis</i> **	Dalvík, Árskógsströnd, Hjalteyri, Krossanes	Maí 2011
<i>Volvox carteri</i>	Grenivík	Maí, Júní 2011
<i>Chroomonas salina</i>	Dalvík, Árskógsströnd, Hjalteyri	Júní, Júlí 2011
<i>Chroococcus</i> sp. eða <i>Microcystis</i> sp.	Krossanes	September 2011
Chrysophyceae, c.f. <i>Ochromonas</i> sp.	Krossanes,	Ágúst, September 2011
<i>Chlorella</i> sp.	Krossanes, Vestmannaeyjar	Júlí, Ágúst, September 2011
<i>Pavlova gyrams.</i>	Krossanes	September 2011
<i>Thalassionema nitzschioides</i> *	Dalvík, Árskógsströnd, Hjalteyri	Júní, Júlí 2011
<i>Prymnesium parvum</i>	Dalvík, Árskógsströnd, Hjalteyri	Júní, Júlí 2011
<i>Euglena</i> sp.	Dalvík, Árskógsströnd, Hjalteyri	Júní, Júlí 2011
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Dalvík, Árskógsströnd, Hjalteyri	Júní, Júlí 2011

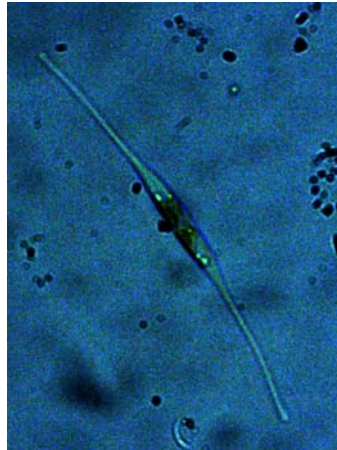
\* Hefur ekki tekið við sér í rækt við þær aðstæður sem notaðar eru við ræktun á rannsóknastofunni

\*\* Eitraður þörungur

Í maí fram til ágúst 2011 var aðallega farið í sýnatökuferðir á mismunandi stöðum í og við Eyjafjörð. Í maí reynast vera botnlægir þörungar ríkjandi í innsöfnuðum sýnum og mest um kísilþörungum þó svo grænn svipuþörungur hafi líka greinst í litlu magni. Sömu tegundir greinast í sýnum sem safnað var í maí og júní og er þar að finna fjölbreytta flóru sem eru langflestir einkonar ásætubörungur sem mynda filmu á botni og á hliðum ræktunareininga. Sú tegund sem reyndist ríkjandi í þessum sýnum var *Phaeodactylum tricornutum*. Í maí greindist þörungurinn *Alexandrius tamarensis* á mörgum stöðum í Eyjafirði en það er eittraður þörungur. Á myndum 2 og 3 má sjá dæmi um tegundir sem fundust í innsöfnuðum sýnum.



Mynd 2. Dæmi um þörunga sem greindust í innsöfnuðum sýnum. Myndin sýnir *Chaetoceros didymus*



Mynd 3. Dæmi um þörunga sem greindust í innsöfnuðum sýnum. Myndin sýnir *Ceratium fusus*

Í júní fara að finnast þörungar sem lifa mun lengur á rannsóknastofunni og við hærra hitastig. Í sýnum frá þessum tíma er um að ræða blöndu mismunandi tegunda og engin ein tegund meira ríkjandi en önnur. Í júní verður vart við þörung af tegundinni *Chroomonas* sp. og kísilþörungar virðast dafna vel þrátt fyrir að minna sé af kísil í sjónum í Eyjafirði miðað við venjulegt árferði. Í júlí fór að bera meira á svifdýrum í innsöfnuðum sýnum og var þá nauðsynlegt að sía sýni betur til að aðskilja þau frá þörungum. Á þessum tíma voru *Phaeodactylum tricorutum*, *Prymnesium* sp. og *Chroomonas* sp. algengustu tegundir þörunga sem fundust í innsöfnuðum sýnum. Í september fer að bera meira á *Microcystis* sp., *Chrysophysis* c.f. og *Pavlova gyrans*.

Sýnataka var framkvæmd við Vestmannaeyjar í júlí og ágúst 2011. Þar reyndist vera blanda þörunga með *Phaeodactylum tricorutum* mest ríkjandi auk þess sem einnig greindust *Chlorophyta* c.f., *Dunaliella salina* og *Cryptophyceae* (ógreind tegund).

### 3.2. Ræktun þörunga við stýrðar aðstæður

Niðurstöður benda til þess að almennt þrífist þörungar úr sjónum við landið vel við þær aðstæður sem prófaðar voru í verkefninu.



Betri vöxtur fékkst með notkun á sjó sem síaður hafði verið í gegnum sandfilter samanborið við notkun á tilbúnum sjó (Instant Ocean®) og var það því notað við ræktun allra hreinrækta þegar líða tók á verkefnistímann. Allar tegundir þörunganna virtust vaxta við hitastig á bilinu 10-25°C, en hins vegar reyndist mismunandi eftir tegundum við hvaða hitastig vöxturinn var mestur.

Eins og áður sagði reyndist ekki vera mikill munur á næringarinnihaldi þeirra næringarblandna sem prófaðar voru en mikill vöxtur var í þörungaræktum með notkun þeirra allra. Ekki reyndist vera munur á hvaða tegundir þörunga uxu í blönduðum ræktum eftir því hvaða næring var notuð þó svo íblöndun niturs reyndist styðja frekar við vöxt kísilþörunga. Erfitt reyndist að stjórna nákvæmlega viðbættu magni CO<sub>2</sub> út í ræktir auk þess sem íblöndun þess reyndist ekki hafa jákvæð áhrif á vöxt þörunganna.

### **3.3. Einangrun þörunga og hreinræktun**

Einangrun þörungategunda reyndist mjög erfið og tímafrek en þynningaraðferðin reyndist gefa bestu niðurstöðurnar. Pípettuaðferð reyndist mjög erfið í framkvæmd þar sem þörungarnir eru mjög smáir og því erfitt að ná stökum þörungum í pípettuna með þeim tækjabúnaði sem er til staðar á rannsóknastofunni. Engar kólóníur fengust með sáningu á agaræti og sú aðferð því ekki hentug við einangrun þörunga við þessar aðstæður.

Tekist hefur að ná 4 þörungategundum í hreinrækt sem virðast allar vaxa vel í tilraunaræktum á rannsóknastofunni í 20L einingum. Hér verður fjallað stuttlega um hverja þeirra.

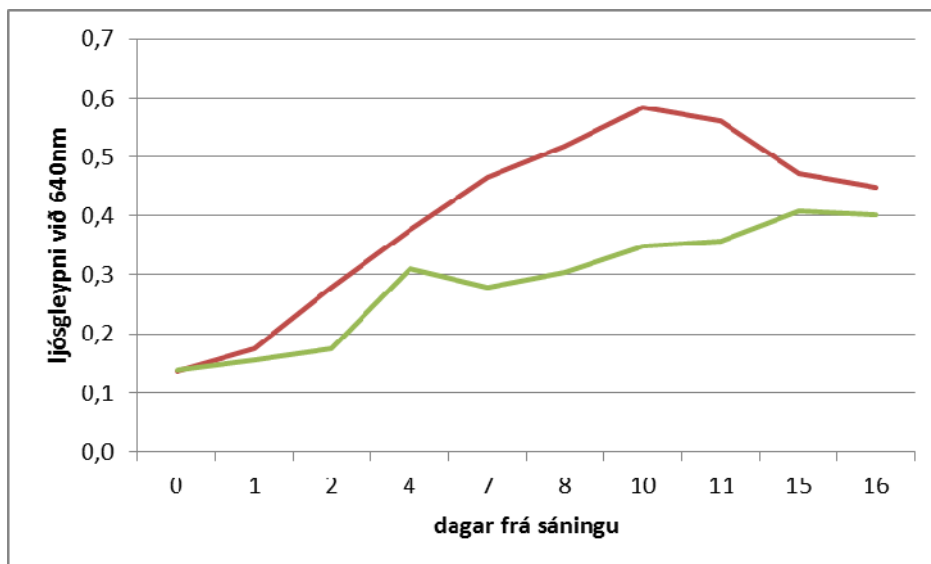
#### **3.1.1. *Phaeodactylum tricornutum*.**

*Phaeodactylum tricornutum*, greinist í nær öllum sýnum sem tekin voru á verkefnistímanum og var sú tegund sem var mest ríkjandi á tímabilinu. Þörungurinn var fyrst einangraður úr blönduðu sýni sem safnað var 28. maí við Hjalteyri, Dalvík og Árskógsströnd og hann nær sér á strik í fyrstu þynningarröðunum við 10-12°C hita í öllum næringarlausnum sem prófaðar voru.



Mynd 4. Kísilþörungurinn *Phaeodactylum tricornerum* á þríarma formi.

Auðvelt reyndist að viðhalda ræktum og óx þörungurinn tiltölulega hratt eins og sést á vaxtarkúrfu á mynd 5. Þær aðstæður sem virðast henta *P. tricornerum* best í rækt eru: 10-12° hiti, selta 33 - 35 ppt. loftum um 500 ml/sek., lýsing 18klst ljós/6 klst myrkur og með notkun á Conwy næringu (1ml/L).



Mynd 5. Vaxtarkúrfa *Phaeodactylum tricornerum* ræktað við 10-12° hita, seltu 33-35 ppt., loftun um 500 ml/sek., lýsing 18klst ljós/6 klst myrkur og með íblöndun Conwy næringar (1ml/L). Ræktir eru báðar upprunnar frá sömu sáningu og var fylgt eftir í 16 daga með ljósgleypnimælingu við 640nm.

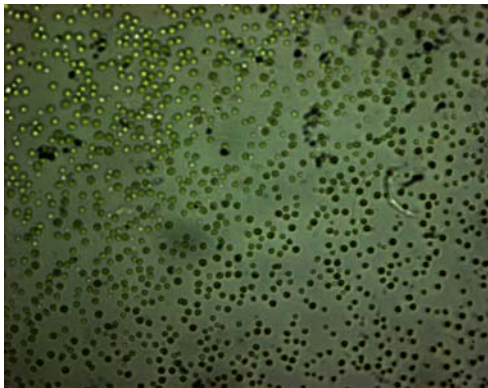
*Phaeodactylum tricornerum* er kísilþörungur og útbreiðsla tegundarinnar einskorðast líklega við grunnsævi þó svo hann hafi fundist á ýmsum stöðum. Tegundin getur aðlagast að

óstöðugum umhverfisskilyrðum og tengist það lögun hennar. Fruman er oftast þríarma (Mynd 4), en finna má allt frá 'tvíarma' frumum, bæði bognum og staflaga og líka X-form. Talið er að umhverfisskilyrði ráði mestu um form tegundarinnar (De Martino *et al.*, 2007).

### 3.2.2. *Microcystis* sp.

*Microcystis* sp. greindist fyrst í sýni af *Rhodomonas baltica*, þörungi sem fenginn var frá norskum samstarfsaðilum í tengslum við fyrra verkefni („Tilraunaræktun náttúrulegs dýrasvifs og gæði dvalareggja” styrkt af Verkefnasjóði Sjávarútvegsins 2010–2011). Þessum þörungi hefur verið viðhaldið í rækt á rannsóknastofunni við eftirfarandi aðstæður: Hitastig 20 - 25°C, selta 31 ppt., lýsing í 18 klst á móti 6 klst myrkur, loftun ca. 500 ml/sek. og viðbættri Conwy næringu (2ml/L).

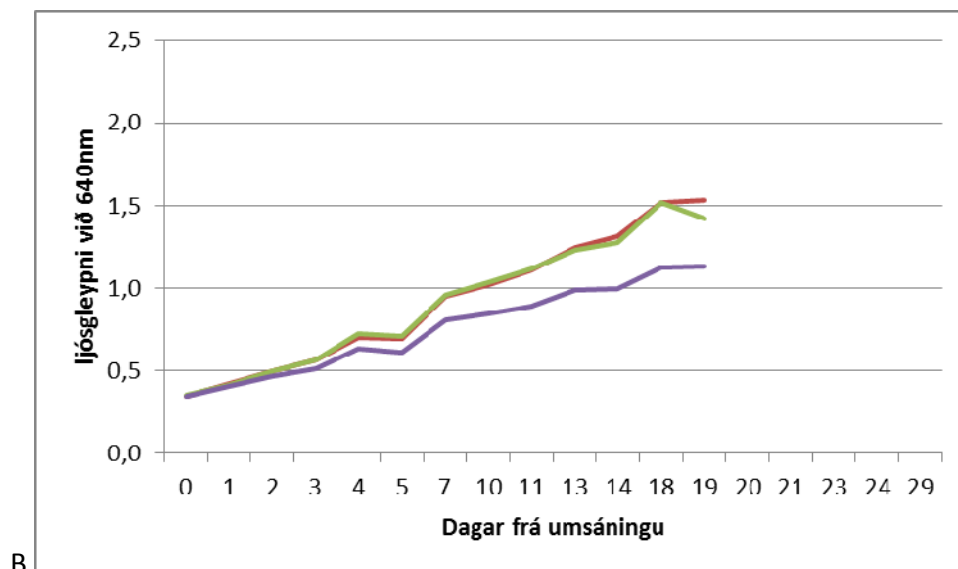
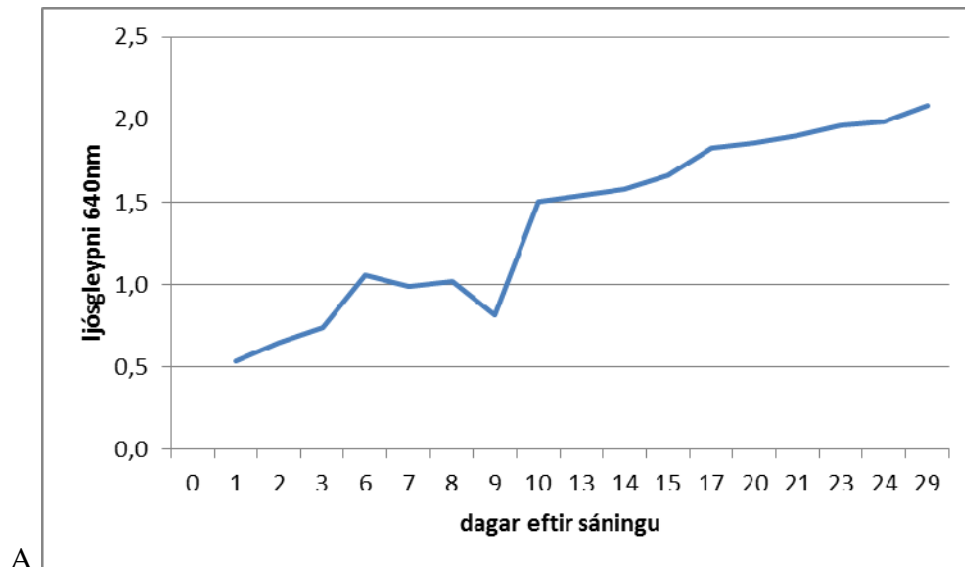
Í þessu verkefni var *Microcystis* sp. einangraður úr sýni sem safnað var í hjá Krossanesi í september. *Microcystis* sp. eru mjög smáir þörungur (mynd 6) og ekki hefur tekist að greina nákvæmlega þá tegund sem er í ræktinni út frá útliti og þarf erfðaefnisgreiningu til að fá nákvæma tegundagreiningu.



Mynd 6. Dæmi um *Microcystis* sp. í ræktun við 20-25°C, seltu 31 ppt. og með íblöndun Conwy næringar (2ml/L).

*Microcystis* sp. er frekar auðveld tegund í ræktun og gerir ekki miklar kröfur til umhverfisaðstæðna og næringar. Niðurstöður benda til að *Microcystis* sp. vaxi vel við hitastig á bilinu 9-25°C, en það hægir á vextinum við lægri hitastig og yfir 25°C. Selta virðist ekki hafa nein afgerandi áhrif á vöxt og er seltubilið sem þörungurinn vex við, allt frá 3 ppt og upp í 40

ppt. en mestur er þó vöxtur *Microcystis* sp. við 20 -25°C, seltu 31 ppt. og við notkun Conway næringar (2ml/L) og má sjá vaxtarkúrfu þörungsins við þær aðstæður á mynd 7.



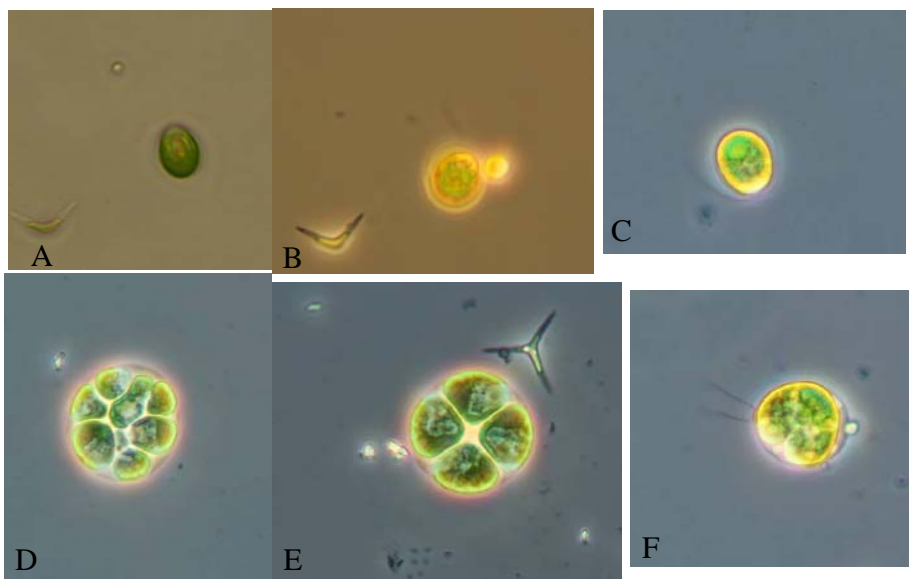
Mynd 7. Vaxtarkúrfur *Microcystis* sp. ræktað við 20-25°C, seltu 31 ppt. og með íblöndun Conway næringar (2ml/L) mælt með ljósgleypnimælingu við 640nm. Sýndar eru niðurstöður ljósmælinga á rækt sem fylgt var eftir 29 daga eftir sáningu (A) og þriggja rækta frá annarri sáningu sem fylgt var eftir í 19 daga (B).

Þörungar af tegundinni *Microcystis* hafa oft verið taldir valdir að eitrunum í skelfiski. Sú tegund sem hér er í rækt virðist ekki vera eitruð þar sem prófað var að fódra smáfiska með henni og dafna þeir vel.

### 3.1.3. *Dunaliella salina*

Tegundin var einangruð úr sýnum sem safnað var við Vestmannaeyjar í ágúst og reyndist vaxa best við við 20 -25°C, seltu 31 ppt. og við notkun Conway næringar (2ml/L).

Þörungar af ættinni *D. salina* geta tekið á sig fjölbreyttar birtingamyndir og skipt litum. Með því að stýra vaxtarskilyrðum má framkalla þessi mismunandi vaxtaform en í þessu verkefni greindust mörg mismunandi vaxtarform þörungsins (mynd 8).



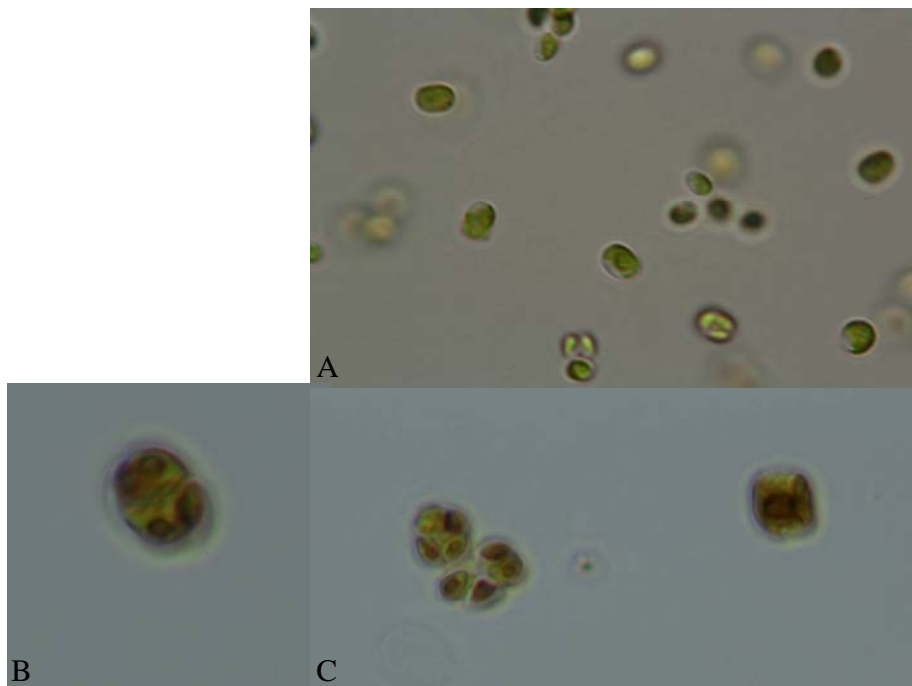
Mynd 8. Myndir úr ræktum á rannsóknastofunni sýna grænþörunginn *Dunaliella salina*. Litur á myndunum er afstæður, en litaberinn er gjarnan grænn. Myndir A, B og C sýna algengasta vaxtaform þörungsins (vegetative cells) en á myndum D, E og F má svo greina frá hægri til vinstri hvernig frumur eru að deila sér í tvær, fjórar og átta dótturfrumur (pamelloid stages). Á myndum A, B og E má einnig sjá kísilþörunginn *P. tricornutum* á þríarma formi.

Á mynd 8 má sjá að *Dunaliella* tegund sem einangruð hefur verið er með tvær jafn langar svipur (isokont) og líklega snúa svipurnar oft fram af frumunni en aftur með, en báðar stöðurnar koma fyrir. Af innihaldi frumanna má yfirleitt greina bæði kjarna ('nucleus'), blaðgrænusekk ('chloroplast') og forðapoka ('vacuola') og fremst (skv. sundstefnu) er eins og þykkildi þar sem svipurnar festast við frumuna. Flestar *Dunaliella* frumurnar eru u.þ.b. 15 µm langar, en svo má einnig sjá talsverðan fjölda afbrigða og mest áberandi eru frumuskiptingar á mismunandi stigum. Oftast virðast frumur annað hvort skipta sér í tvo hluta, en líka er

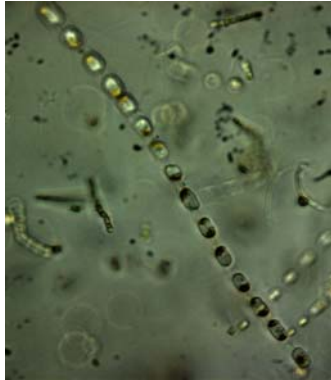
algengt að sjá frumur sem eru að deila sér í fjórar dæturfrumur og meira að segja átta dæturfrumur (pamelloid).

#### 3.1.4. *Chlorella*

*Chlorella sp.* var einangruð úr sýnum sem safnað var við Vestmannaeyjar í ágúst 2011. Erfitt reyndist að tegundagreina þennan þörung með ljóssmásjá og var því einnig framkvæmt litunarpróf með joði. Flekkir í frumunum taka lit umfram litberann eða frumuna alla eins og sést á mynd 9. en ekki hefur verið hægt að greina nákvæma tegund út frá útliti eða með litun. Svifþörungurinn er grænþörungur (heilkjörnungur) og svipulaus (*Chlorococcoales*) auk þess sem stærð frumu gefur til kynna og vegna þess að ekki varð vart við kynfrumur er talið að um *Chlorella* ættkvísl sé að ræða.



Mynd 9. Dæmi um *Chlorella* þörungur úr hreinræktum. Mynd A er ólituð en myndir B og C sýna frumur eftir litun með joði. Myndir eru teknar með 100x stækkun og sýna frumur sem mælast um 3-4µm langar áður en litberinn fer að klofna. Á mynd A sést móta fyrir frumulíffærum í grænum kornforma frumunum. Á mynd B má greina móðurfrumu með fjórum dótturfrumum og fjórum joðlituðum sterkjukornum. Á mynd C má greina sterkjubólur í einni frumu sem er líklega að undirbúa fyrsta þrep frumudeilingar og síðan tvær sem hafa deilt sér í fjórar dæturfrumur og þar af er önnur um það bil að rofna.



Mynd 10. *Skeletonema costatum* í innsöfnuðu sýni

Auk þessarra 4 þörungategunda sem tekist hefur að viðhalda í hreinrækt þá voru aðrar tegundir einangraðar úr innsöfnuðum sýnum sem ekki náðu sér á strik í hreinræktum við þær aðstæður sem prófaðar voru í verkefninu (sjá töflu 2). Sem dæmi má nefna þörung af tegundinni *Skeletonema costatum* (mynd 10) sem einangraður úr sýnum sem safnað var í Eyjafirði í maí og júní 2011. *Skeletonema costatum* er talin álitleg til ræktunar úr íslensku umhverfi vegna þess hversu algeng hún er

hér við land auk þess sem rannsóknir hafa sýnt að fituinnihald er 13-51% af lífmassa (Renaud *et al.*, 1999).

Niðurstöður benda til þess að þær ræktunaraðstæður sem notaðar voru í verkefninu hafi ekki verið hagkvæmar fyrir allar tegundir sem var að finna í sýnum sem safnað var á tímabilinu eða að kjöraðstæður þessara tegunda feli hugsanlega í sér samlífi við aðrar þörungategundir (efni/efnasambönd sem aðrar tegundir framleiða). Vísbendingar fengust um þetta þar sem tegundirnar náðu sér ekki á strik í hreinræktum en sýni úr sömu rækt dafnaði vel í blandaðri rækt þörunga.

### 3.3. Efnainnihald þörungategunda

#### 3.3.1. Næringarefnainnihald

Niðurstöður rannsókna á næringarefnainnihaldi þeirra þörungategunda sem náðst hafa í hreinræktir eru sýndar í töflu 2. Sýndar eru niðurstöður mismunandi blandaðra þörungarækta eftir að þær höfðu verið í rækt við stýrðar aðstæður í mismunandi langan tíma auk þess sem greind var efnasamsetning hreinrækta af *Chlorella* og *Microcystis*. Í þörungablöndu I er *Phaeodactylum tricornutum* ríkjandi tegund en í blöndu II er *Microcystis* sp. ríkjandi. Ekki reyndist unnt að mæla efnasamsetningu *Phaeodactylum tricornutum* og *Dunaliella salina* í hreinræktum á verkefnistímanum.

**Tafla 2. Niðurstöður næringarefnagreiningar á þörungum í blandaðri rækt auk þörunga af ættkvísl *Chlorella* og *Microcystis* í hreinrækt. Blandaðar ræktir voru númeraðar í tímaröð sýnatökur.**

Sýni	Hlutfall af votvigt					Hlutfall af þurrvigt		
	Vatn (%)	Purrefni (%)	Prótein (%)	% Fita	Aska (%)	Prótein (%)	% Fita	Aska (%)
Blönduð rækt I	92,95	7,05	2,29	0,41	2,88	32,52	5,84	40,79
Blönduð rækt II	94,44	5,56	1,29	0,07	2,87	23,24	1,23	51,73
Blönduð rækt III	93,78	6,22	0,89	0,04	3,17	14,25	0,68	50,86
Blönduð rækt IV	94,08	5,92	0,53	0,19	4,41	8,92	3,19	74,60
Chlorella	95,21	4,79	0,69	0,17	3,05	14,50	3,50	63,64
Microcystis	94,46	5,54	1,01	0,36	3,46	18,27	6,43	62,48

Niðurstöður benda til þess að fituinnihald blandaðra rækta sé mjög mismunandi eða á bilinu 0,04%-0,47% af votvigt og 0,68%-5,84% af þurrvigt. Skýrist þessi munur af mismunandi samsetningu þörungategunda í blönduðu ræktunum. *Microcystis* sp. reyndist innihalda hærra hlutfall fitu samanborið við *Chlorella* sp., eða 0,36% af votvigt og 6,43% af þurrvigt.

### 3.3.2. Fitusýrusamsetning

Niðurstöður fitusýrugreiningar eru sýndar í töflum 3 og 4. Rannsókuð varfitusýrusamsetning í tveimur blönduðum ræktum þörunga (blöndu I og II) auk nokkurra hreinrækta sem ræktaðar höfðu verið við kjöraðstæður.



Tafla 3. Hlutfall fitusýra í blönduðum ræktum I og II (% af heildar fitusýru methyl esterum). Fitusýrur í flokki omega 3 fitusýra eru með rauðlituðu lettri.

	Blönduð rækt I	Blönduð rækt II
C8:0	0,02	0,16
C10:0	0,00	0,19
C12:0	0,00	0,04
C13:0		
C14:0	1,16	2,06
C14:1		
C15:0	0,09	0,32
C16:0	8,99	11,96
trans C16:1n7	0,00	0,11
C16:1n9	0,20	1,19
C16:1n7	4,34	2,58
C17:0	0,56	0,10
C16:2n4	3,91	0,14
C18:0	0,98	1,96
C16:3n4	4,18	0,00
trans C18:1	0,12	5,57
C18:1n11	0,12	0,77
C18:1n9	1,43	16,28
C18:1n7	0,72	3,40
C18:1n5	0,00	0,23
trans C18:2n6		
C18:2n6	3,14	7,55
C18:3n6	0,03	0,35
C18:3n4	0,00	0,03
C18:3n3	5,24	14,10
C18:4n3	21,06	1,56
C20:0	0,01	0,17
trans C20:1	0,00	0,02
C20:1n11	0,08	0,84
C20:1n9	0,12	4,14
C20:1n7	0,04	0,49
C20:2n6	0,07	0,82
C20:3n6		
C22:1n9	0,11	3,23
C20:3n3+C20:4n6	0,08	0,63
C20:4n3	0,05	0,06
C20:5n3	11,91	0,64
C22:5n3	0,19	0,08
C22:6n3	8,08	0,53
C23:0		
C24:0		
C24:1		
SFA	11,8	17,0
MUFA	7,2	33,2
PUFA	57,9	26,5
TFA	0,1	5,7
unknown	23,0	17,7
OMEGA 3	50,81	17,99

Í þörungablöndu I er *Phaeodactylum tricornutum* ríkjandi tegund en í blöndu II er *Microcystis* sp. mest ríkjandi. Samkvæmt niðurstöðum í töflu 3 er rúmlega helmingur (57,9%) fitusýra í þörungablöndu I í flokki fjölómettaðra fitusýra (PUFA: poly unsaturated fatty acids) og talsvert hærra hlutfall samanborið við blöndu II (26,5 %). Hlutfall omega 3 fitusýra ( $\omega$ 3), EPA og DHA er einnig hærra í blöndu I samanborið við blöndu II.

Rannsókuð voru sýni úr fjórum þörungategundum í hreinrækt þar á meðal tvö sýni úr hreinræktum af *Microcystis* sp. og *P. tricornutum*, en þessi sýni voru tekin úr mismunandi ræktum sem ræktaðar höfðu verið við sömu umhverfisaðstæður.

Samkvæmt niðurstöðum inniheldur *Phaeodactylum tricornutum* mest magn PUFA eða 53,9%-55,11% en hlutfall PUFA er einnig hátt í hinum tegundunum (34,1%-43,2%). Hlutfall omega 3 ( $\omega$ 3) fitusýra er einnig hæst í *Phaeodactylum tricornutum* (48,88%-49,11%) en einnig töluvert hátt í öllum tegundum (24,54% - 40,28%). Hlutfall EPA og DHA er töluvert hærra í blöndu I samanborið við það sem er í *Phaeodactylum tricornutum* þegar hann er í hreinrækt.

Eins og sést í töflu 4 þá fást mismunandi niðurstöður um hlutfall fitusýra úr sýnum sem tekin voru af mismunandi ræktum *Microcystis* sp. og *P. tricornutum*. Hlutfall einstakra fitusýra er nokkuð mismunandi auk þess sem nokkur munur er á hlutfalli PUFA og omega 3 fitusýra. Þessar niðurstöður benda til þess að hlutfall fitusýra geti verið mismunandi eftir því hvar í vaxtarkúrfunni sýnum er safnað. Reynt var að taka sýni við hámark vaxtar sem var þó ekki mælt nákvæmlega við þessar sýnatökur.

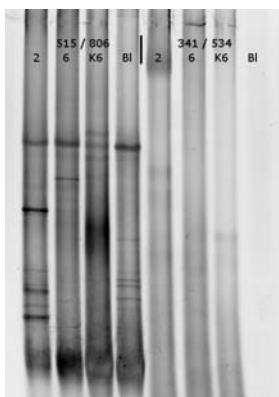
**Tafla 4. Hlutfall fitusýra í mismunandi þörungategundum í hreinrækt (% af heildar fitusýru methyl esterum). Sýni merkt I og II eru tekin úr mismunandi hreinræktum sem ræktaðar eru við sömu aðstæður. Fitusýrur í flokki omega 3 fitusýra eru með rauðlituðu lettri.**

	<i>Chlorella</i> sp.	<i>Microcystis</i> sp. I*	<i>Microcystis</i> sp. II	<i>Dunaliella</i> <i>salina</i>	<i>Phaeodactylum</i> <i>Tricornutum</i> I	<i>Phaeodactylum</i> <i>Tricornutum</i> II
C6:0	0,07			0,03		
C8:0	0,2			0,18	0,01	
C10:0	0,21			0,29	0,01	
C12:0	0,39		0,06	0,44	0,03	0,04
C14:0	1,96	0,58	7,54	3,06	7,3	3,51
C14:1	0,13			0,05	0,04	
C15:0	0,5	0,23	0,39	0,18	0,19	0,15
C16:0	12,19	6,58	11,04	9,6	3,38	4,49
trans C16:1n7	0,05			0,02	0,05	
C16:1n9	1,95	1,66	0,46	0,28	1,52	0,88
C16:1n7	1,28	1,14	22,45	15,49	12,34	13,56
C17:0	0,24	0,07	0,79	0,1	0,49	1,30
C16:2n4	0,12	0,19	2,56	0,41	3,26	4,60
C18:0	3,89	1,01	0,80	0,41	0,14	0,25
<b>C16:3n4</b>	<b>0,02</b>		<b>3,90</b>	<b>0,25</b>	<b>9,91</b>	<b>11,47</b>
trans C18:1	15,97	19,2		0,08	0,05	
C18:1n11			0,04	0,06	0,1	0,13
C18:1n9	2,78	1,89	5,46	3,06	0,45	1,29
C18:1n7	1,62	2,12	0,49	0,57	0,43	0,30
C18:1n5	0,38			0,87	0,03	
C18:2n6	9,35	10,91	1,61	1,76	1,43	1,63
C20:0	0,17		0,06	0,02	0,03	0,02
<b>C18:3n6</b>	<b>0,03</b>		<b>0,21</b>	<b>0,13</b>	<b>0,11</b>	<b>0,12</b>
<b>C18:3n4</b>	<b>0,09</b>				<b>0,02</b>	<b>0,00</b>
trans C20:1			0,00		0	0,00
<b>C18:3n3</b>	<b>23,71</b>	<b>29,88</b>	<b>0,92</b>	<b>2,86</b>	<b>0,83</b>	<b>0,98</b>
C20:1n11	0,08	0,2				
C20:1n9	0,62	0,98	0,23	0,02	0,01	0,09
C20:1n7	0,04	0,05			0,11	
<b>C18:4n3</b>	<b>0,16</b>	<b>0,23</b>	<b>2,88</b>	<b>0,03</b>	<b>0,37</b>	<b>1,78</b>
C20:2n6	0,05	0,08		0,05	0,13	
C22:0	0,17	0,06		0,07	0,28	
C20:3n6	0,02			0,18	0,02	
C22:1n9	0,43	0,78	0,27	0,04	0,04	0,09
<b>C20:3n3+C20:4n6</b>	<b>0,09</b>	<b>0,14</b>	<b>0,12</b>	<b>2,55</b>	<b>0,35</b>	<b>0,09</b>
<b>C20:4n3</b>	<b>0,01</b>	<b>0,04</b>	<b>0,55</b>	<b>0,04</b>	<b>0,07</b>	<b>0,12</b>
<b>C20:5n3</b>	<b>0,17</b>	<b>0,83</b>	<b>24,07</b>	<b>33,02</b>	<b>36,71</b>	<b>30,83</b>
<b>C23:0</b>			0,05			0,02
C24:0	0,19	0,11	1,08	0,02	0,33	0,58
C24:1	0,04		0,30	0,04	0,21	0,16
<b>C22:5n3 (EPA)</b>	<b>0,03</b>	<b>0,07</b>	<b>0,15</b>		<b>0,08</b>	<b>0,20</b>
<b>C22:6n3 (DHA)</b>	<b>0,23</b>	<b>0,84</b>	<b>1,84</b>	<b>1,4</b>	<b>0,66</b>	<b>3,29</b>
<b>SFA</b>	<b>20,2</b>	<b>8,6</b>	<b>21,80</b>	<b>14,5</b>	<b>12,2</b>	<b>10,34</b>
<b>MUFA</b>	<b>9,4</b>	<b>8,8</b>	<b>29,69</b>	<b>20,5</b>	<b>15,3</b>	<b>16,51</b>
<b>PUFA</b>	<b>34,1</b>	<b>43,2</b>	<b>38,81</b>	<b>42,7</b>	<b>53,9</b>	<b>55,11</b>
<b>TFA</b>	<b>16</b>	<b>19,2</b>		<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	
<b>unknown</b>	<b>20,3</b>	<b>20,1</b>	<b>9,70</b>	<b>22,3</b>	<b>18,5</b>	<b>18,03</b>
<b>omega 3</b>	<b>24,54</b>	<b>32,03</b>	<b>34,64</b>	<b>40,28</b>	<b>49,11</b>	<b>48,88</b>

\*heildarmagn sýnis var mjög lítið og gæti það haft áhrif á niðurstöður

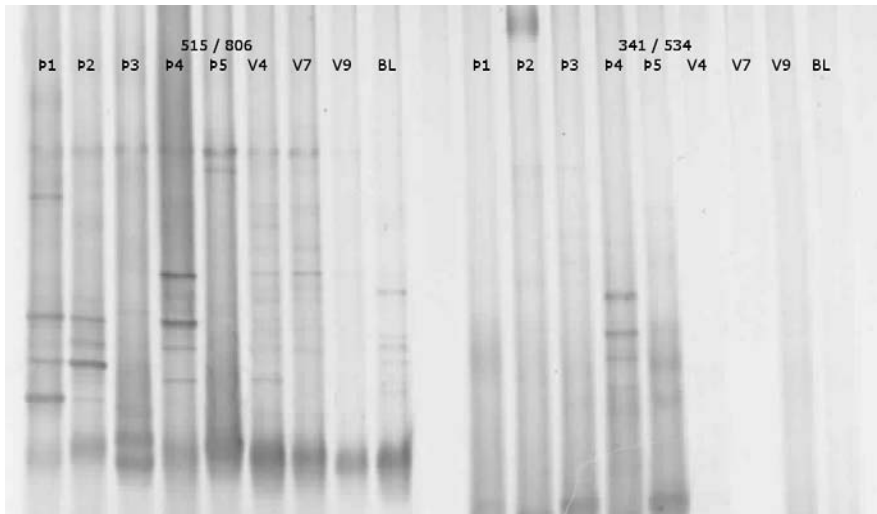
### 3.4. Samsetning bakteríuflóru og bakteríuhamlandi virkni

Einangrun á DNA baktería reyndist koma best út þegar notað var Rapid Water einangrunarkitt. Niðurstöður benda til mismunandi bakteríusamsetningar í þörungaræktum (sýni 2 og 6). Hins vegar má sjá að ekki er nein mögnun með primerum 341/534 sem bendir til þess að aðlaga þurfi aðstæður í hvarfi með þeim primerum. Einnig sést mengun í blanki og því ber að fara varlega í ályktanir.



Mynd 11. DGGE gel frá sýnum einangruð 24. október (sýni 2 og 6) með Rapid Water einangrunarkitti. Til viðmiðunar er sýnd hreinrækt bakteríustofns (K6) og viðmiðþar sem notað var vatn í stað sýnis (BI). Sýnin voru mögnuð með mismunandi primerapörum (515/806 og 341/534).

Mynd 12 sýnir niðurstöður greiningar á bakteríuflóru sýna sem einangruð voru með Power Soil kitti. Sýnd er niðurstaðar greiningar á blönduðum þörungaræktum og sýnum sem voru tekin beint úr innsöfnuðum sýnum.



Mynd 12. DGGE gel af sýnum einangruð 24. og 25. Nóvember með Power Soil einangrunarkitti. Sýnd eru sýni af þörungaræktum (P) auk sýna sem tekin voru beint úr innsöfnuðum sýnum (V) og viðmið þar sem notað varvatn í stað sýnis (BL). Sýnd eru sýni sem mögnuð voru með mismunandi primerapörum (515/806 og 341/534).

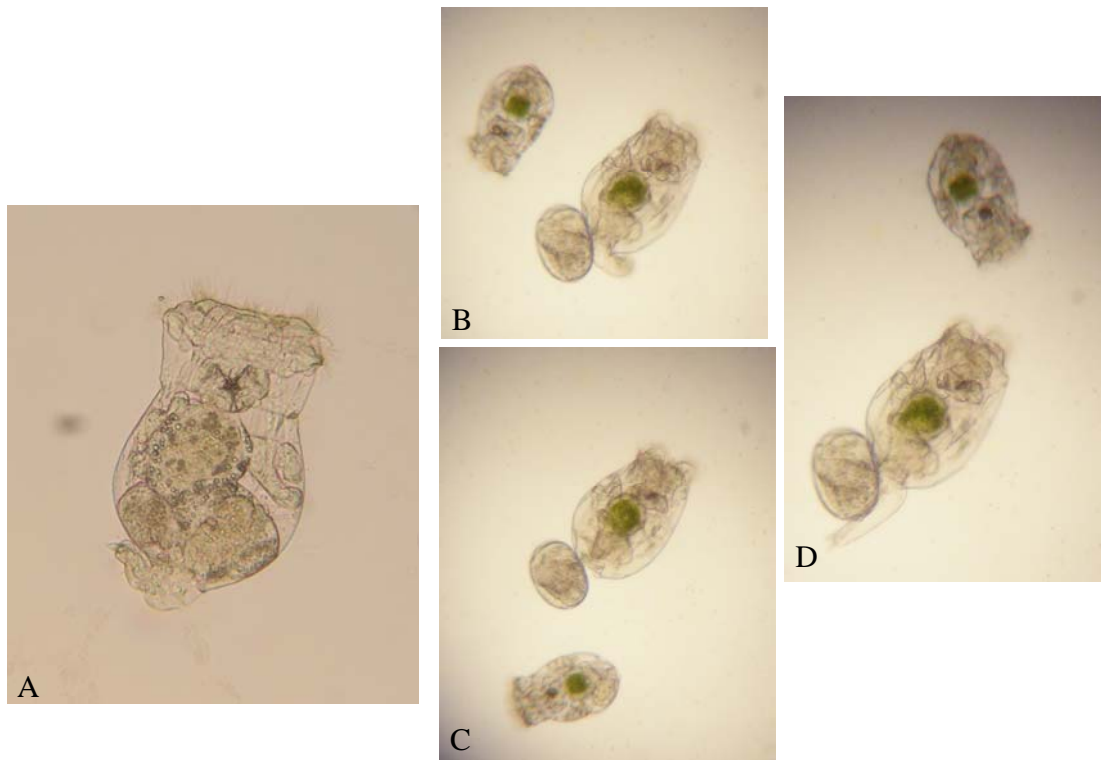
Eins og áður fengust betri niðurstöður frá primerapari 515 / 806 (Mynd 12) og aðeins eitt sýni er með niðurstöður frá 341/534 primeraparinu. Þó svo það sé einhver mengun í blanki þá koma þar ekki sömu bönd og í sýnum af þörungum og eru þau því ekki talin hafa áhrif á aðrar niðurstöður. Auðveldast reyndist að greina sýni P1, P2 og P4. Böndin eru daufari í innsöfnuðum sýnum samanborið við sýnum úr ræktum en minna magn einangraðist úr þessum sýnum og sem skýrir þann mun.

Svo virðist sem fjórar bakteríutegundir séu mest ríkjandi í þörungaræktum. Ein tegund virðist sameiginleg með sýnunum þremur og sýni P1 og P2 virðast innihalda sömu 2 tegundir en P1 auk þess tvær aðrar bakteríutegundir.

Niðurstöður benda ennfremur til að þörungarnir búi ekki yfir vaxtarhamlandi áhrifum á þær bakteríutegundir sem rannsakaðar voru, hvorki frá sameindum á yfirborði eða efni sem þeir seita út. Við skoðun skálanna viku eftir sáningu voru þær þaktar bakteríuvesti en enginn eyða sjáanleg kringum dropa eða holur í agar. Taka ber fram að bakteríuhamlandi áhrif voru ekki skoðuð í þynningum þörunga eða í floti þörungarækta.

### 3.5 Notkun þörunga við ræktun hjóldýra

Með þörungagjöf er hægt að auka magn amínósýra í hjóldýrunum (Aragao *et al.*, 2004) svo og fitu og fjölómattaðra fitusýra. Í verkefninu voru gerðar rannsóknir á því hvort hjóldýr í rækt myndu éta mismunandi tegundir þörunga sem búið var að ná í hreinrækt (Mynd 13).



Mynd 13. Hjóldýr og upptaka á *Microcystis* þörungi. Mynd A sýnir hjóldýr sem ekki hefur verið fóðrað í 3 klukkustundir en myndir B, C og D sýna hjóldýr 2 mín eftir að *Microcystis* sp. var bætt út í ræktina.

Eins og sést á mynd 13 þá virðast hjóldýr sem ekkert hafa fengið að éta í nokkrar klukkustundir vera búin að fylla sig af þörungum aðeins 2 mínútum eftir að þörung hafði verið bætt í ræktina. Þetta sést greinilega af græna litnum í meltingarvegi hjóldýranna samanborið við svelt hjóldýr. Sömu niðurstöður fengust þegar hjóldýrum var gefinn þörungurinn *Chlorella* sp. (niðurstöður ekki sýndar) hins vegar virðist sem hjóldýrin éti ekki þörunga af tegundunum *Phaeodactylum tricornutum* eða *Dunaliella salina*. Hjóldýrin eru á stærðarbilinu 50µm til 2mm og gera má ráð fyrir að *Microcystis* sp. og *Chlorella* sp. sem eru um 5 µm, séu af hentugri stærð, en að hinar tvær tegundirnar hafi verið of stórar til átu.

Með þessari tilraun var einungis athugað hvort hjóldýrin átu þörungana en næringarinnihald hjóldýranna var ekki mælt til þess að fá samanburð milli hjóldýra sem alin voru á hefðbundnu fóðri og þeirra sem fengu þörungana.

#### 4. ÁLYKTANIR

Í verkefninu hefur náðst að einangra í hreinræktir 4 tegundir þörunga úr hafinu við landið og rækta við stýrðar aðstæður á rannsóknastofunni. Til viðbótar hafa verið borin kennsl á fjölda tegunda sem ræktuðust í blönduðum ræktum en sem ekki gekk að ná í hreinræktir við þær aðstæður sem prófaðar voru. Gerðar voru tilraunir með ræktun þessara fjögurra tegunda við mismunandi aðstæður og sýna þær rannsóknir að tegundirnar eru fremur auðveldar í viðhaldi en vöxtur þeirra er þó mismunandi eftir aðstæðum. Þörf er frekari rannsókna til að kanna til hlítar áhrif umhverfisaðstæðna á vöxt og næringarinnihald tegundanna.

Tegundir þörunga sem einangraðar voru í verkefninu eru: *Phaeodactylum tricornutum*, *Microcystis* sp., *Chlorella* sp. og *Dunaliella salina*. Ekki hefur tekist að tegundagreina nákvæmlega alla þörungana út frá útliti og joðlitun og endanleg tegundagreining fæst ekki nema með erfðaefnisgreiningu. Allar þessar tegundir þörunga eru þekktar og hafa verið í ræktun víðsvegar um heiminn til einhverskonar nýtingar.

Ræktun svifþörunga á iðnaðarskala hófst með framleiðslu *Chlorella* í Japan upp úr 1960 (Spolaore *et al.*, 2006) og er því mjög margt vitað um þessa tegund og ræktun hennar. Algengasti þörungur sem notaður er í fiskeldi er ferskvatnsþörungur af ættkvíslinni *Chlorella* en vegna næringarinnihalds hefur *Chlorella* víða verið hampað sem gæðafæðu. Þörungurinn getur innihaldið um 45% prótein, 20% fitu, 20% kolvetni, 5% trefjar og 10% steinefni og vítamín auk þess sem með aðlögum í umhverfisaðstæðum hefur verið unnt að auka hlutfall EPA í allt að 39,9% af heildar fituinnihaldi (Seto *et al.*, 1984; Yongmanitchai & Ward, 1991). Ekki hefur fundist heimild fyrir því að *Chlorella* sp. hafi áður verið einangruð úr hafinu við Ísland og er því mjög spennandi að fá nákvæma greiningu á þeirri tegund sem hér er komin í hreinrækt.

*P. tricornutum* er auðveld í ræktun og á hún sér langa sögu sem slík og hefur verið notuð til ýmissa rannsókna auk þess sem hún hefur verið notuð í fiskeldi vegna þess hversu fiturík

hún er. Hægt er að bæta fituhlutfall þurrfóðurs með því að nota þurrkaða afurð í fóður en hins vegar benda rannsóknir til þess að það geti valdið skemmdum á meltingarvegi lirfa vegna „cornutates“ innihalds en það auðveldar ásókn sýkingarvaldandi baktería í meltingarveginn og getur valdið dauða lirfa (Atalah *et al.*, 2007).

*Dunaliella* sp. hefur mikið verið notuð í rækt, bæði tengt eldi t.d. seldýra og svo í efnaframleiðslu. *Dunaliella salina* er framleidd í miklu magni aðallega vegna  $\beta$ -caroten litarefna (Spolaore *et al.*, 2006) en ýmis ræktuð afbrigði tegundarinnar skila úrvali af efnem sem í dag eru nýtt í ýmiskonar framleiðsluvörur.

Mikilvægi  $\omega$ 3 fitusýra, einkum docosahexaenoic sýru (DHA) og eicosapentaenoic sýru (EPA) til að fyrirbyggja hjarta- og æðasjúkdóma er vel þekkt auk þess sem fjölómettuð fita, einkum DHA og EPA, er mjög mikilvægur þáttur við startfóðrun lirfa í fisk-og/eða skeldýraeldi, þar eð þær hafa beina þýðingu í eðlilegum þroska margra líffæra. Það er vel þekkt að næringarinnihald og hlutfall fitusýra er mismunandi milli þörungategunda. Niðurstöður verkefnisins benda einnig til þess að hlutfall fitusýra sé mismunandi eftir því hvenær í vaxtarfasanum þörungurinn er þegar sýni er tekið og þarf að gera frekari rannsóknir á því hvar best er að uppskera hverja tegund. Hægt er að hafa áhrif á næringarinnihald og hlutfall fitu með breytingum í umhverfisaðstæðum í ræktun. Aðferðir til að auka hlutfall fitu eru mismunandi eftir tegundum þörunga en rannsóknir sýna að með viðbótum á glúkósa eða skorti á nitri er hægt að auka hlutfall fitu verulega við ræktun ýmissa tegunda (Choi *et al.*, 2011; Wan *et al.*, 2011). Þær tegundir sem hér voru einangraðar geta samkvæmt heimildum innihaldið hátt hlutfall fitu og omega 3 fitusýra hins vegar benda niðurstöður mælinga til þess að hlutfall fitu sé minna en áður hefur tekist að ná fram með ræktun. Eins og áður segir getur uppskera þörunganna á réttum tímapunkti í vaxtarferlinu haft mikið að segja auk þess sem auka má fituhlutfall með stjórnun ræktunaraðstæða fyrir uppskeru. Af þessum sökum er nauðsynlegt að gera frekari rannsóknir á ræktunaraðferðum til þess að hámarka fituhlutfall í afurðunum við uppskeru.

Verkefnið hefur leitt af sér ný verkefni þar sem unnið er áfram með þær tegundir þörunga sem tekist hefur að rækta í hreinræktum á rannsóknastofunni. Um er að ræða sumarverkefni þriggja nemenda sem styrkt eru af Nýsköpunarsjóði námsmanna og Vöruþróunarsetri sjávarafurða hjá Mátis sumarið 2012. Markmið þessara rannsókna er



annars vegar að þróa og prófa aðferðir við ræktun til að auka hlutfall fitu og vinna fituefni úr þörungum og hins vegar tilraunir með ræktun tegundanna í affallsvatni frá fiskeldisstöð. Þá er einnig hafin tilraun í eldi þorskseiða með notkun þessara tegunda þörunga til að auðga fóðurdýr í tengslum við alþjóðlegt verkefni sem í gangi er hjá samstarfsaðilum (CODAtlantic, styrkt af NORA sjóðnum) þar sem meginmarkmið verkefnisins er að framleiða þorskseiði af hámarks gæðum.

## 5. ÞAKKARORÐ

Höfundar skýrslunnar þakka Verkefnasjóði sjávarútvegsins fyrir veittan styrk til verkefnisins. Einnig þökkum við samstarfsaðilum hjá Mátis fyrir framkvæmd mælinga á fitusýrusamsetningu þörungategunda og Tryggva Sveinssyni, skipsstjóra á Einari í Nesi fyrir aðstoðina við sýnatökur.

## 6. HEIMILDIR

- Aragao, C., Conceicao, L. E. C., Dinis, M. T., & Fyhn, H. J. (2004). Amino acid pools of rotifers and *Artemia* under different conditions: nutritional implications for fish larvae. *Aquaculture*, 234 (1-4), 429-445.
- Atalah, E., Cruz, C. M. H., Izquierdo, M. S., Rosenlund, G., Caballero, M. J., Valencia, A., & Robaina, L. (2007). Two microalgae *Cryptocodinium cohnii* and *Phaeodactylum tricornutum* as alternative source of essential fatty acids in starter feeds for seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 270 (1-4), 178-185.
- Bjornsdottir, R., Karadottir, E. G., Johannsdottir, J., Thorarinsdottir, E. E., Smaradottir, H., Sigurgisladottir, S., & Gudmundsdottir, B. K. (2010). Selection of bacteria and the effects of bacterial treatment of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) eggs and larvae. *Aquaculture*, 302 (3-4), 219-227.
- Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K., & Dunstan, G. A. (1997). Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151 (1-4), 315-331.
- Choi, G. G., Kim, B. H., Ahn, C. Y., & Oh, H. M. (2011). Effect of nitrogen limitation on oleic acid biosynthesis in *Botryococcus braunii*. *Journal of Applied Phycology*, 23 (6), 1031-1037.
- De Martino, A., Meichenin, A., Shi, J., Pan, K. H., & Bowler, C. (2007). Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) accessions. *Journal of Phycology*, 43 (5), 992-1009.

- Eydal, A. (2003). Áhrif næringarefna á tegundasamsetningu og fjölda svifþörunga í Hvalfirði. *Hafrannsóknastofnun. Fjölrit*, 99, 34 bls.
- Gíslason, Á. (2002). Hvers vegna eru ein auðugustu fiskimið jarðarinnar í kringum Ísland? *Vísindavefurinn* 25.11.2002. <http://visindavefur.is/?id=2901>.
- Guðmundsson, K., Gíslason, Á., Ólafsson, J., Þórisson, K., Björnsdóttir, R., Steingrímsson, S.A., Ólafsdóttir, S., Kaasa, Ö. (2002). Ecology of Eyjafjörður Project. Chemical and biological parameters measured in Eyjafjörður in the period April 1992 - August 1993. *Hafrannsóknastofnun. Fjölrit*, 89, 129pp.
- Gunnarsson, K. (2003). Næringarefni, þörungasvif og kræklingur í Mjóafirði. Í: *Kristinn Guðmundsson ritstj.: Þættir úr vistfræði sjávar 2001 og 2002. Hafrannsóknastofnunin. Fjölrit*, 92, 31-33.
- Hafrannsóknastofnun. (2006). Vistfræðiskýrsla 2006. *Fjölrit*, 130.
- Hermansdóttir, R., Johannsdóttir, J., Smaradóttir, H., Sigurgísladóttir, S., Guðmundsdóttir, B. K., & Björnsdóttir, R. (2009). Analysis of effects induced by a pollock protein hydrolysate on early development, innate immunity and the bacterial community structure of first feeding of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae. *Fish & Shellfish Immunology*, 27 (5), 595-602.
- Jónsson, S. (1996). Ecology of Eyjafjörðu Project. Physical parameters measured in Eyjafjörður in the period April 1992 - August 1993. *Hafrannsóknastofnun. Fjölrit*, 48, 160pp.
- Jónsson, S. (2004). Sjávarhiti, straumar og súrefni í sjónum við strendur Íslands Í: Björn Björnsson, Valdimar Ingi Gunnarsson ritstj.: Þorskeldi á Íslandi *Hafrannsóknastofnun. Fjölrit*, 111, 9-21.
- Metting, F. B. (1996). Biodiversity and application of microalgae. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 17 (5-6), 477-489.
- Renaud, S. M., Thinh, L. V., & Parry, D. L. (1999). The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. *Aquaculture*, 170 (2), 147-159.
- Seto, A., Wong, H. L., & Hesseltine, C. W. (1984). Culture conditions affect eicosapentaenoic acid content of *Chlorella minutissima*. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 61, 892-894.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101 (2), 87-96.
- Svavarsson, H. G. (2010). Binding koldíoxíðs frá orkuverum með ræktun smáþörunga. *Tímarit Háskólans í Reykjavík*, 64.
- Tonon, T., Harvey, D., Larson, T. R., & Graham, I. A. (2002). Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. *Phytochemistry*, 61 (1), 15-24.
- Walne, P. R. (1974). Culture of Bivalve Molluscs. 50 Years' Experience at Conwy. *Fishing News (Books), West Byfleet*, 173 pp.
- Wan, M. X., Liu, P., Xia, J. L., Rosenberg, J. N., Oyler, G. A., Betenbaugh, M. J., Nie, Z. Y., & Qiu, G. Z. (2011). The effect of mixotrophy on microalgal growth, lipid content, and expression levels of three pathway genes in *Chlorella sorokiniana*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91 (3), 835-844.
- Yongmanitchai, W., & Ward, O. P. (1991). Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricorutum* under different culture conditions. *Appl Environ Microbiol*, 57 (2), 419-425.

## 7. VIÐAUKI

### Næringarlausnir.

#### 1. Conwy Medium (Walne, 1974)

NaNO<sub>3</sub> (Sodium Nitrate): 100.0gr  
Na-EDTA (EDTA disodium salt): 45.0gr  
H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (Boric Acid): 33.6gr  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O (Sodium Phosphate, monobasic): 20.0gr  
FeCl<sub>3</sub>•6H<sub>2</sub>O (Ferric Chloride, 6-hydrate): 1.3gr  
MnCl<sub>2</sub>•4H<sub>2</sub>O (Manganous Chloride, 4-hydrate): 0.136gr  
Vitamin B<sub>1</sub> (Thiamin HCl): 0.1gr  
Vitamin B<sub>12</sub> (Cyanocobalamin): 0.05gr  
Trace Metal Solution\*: 1ml  
Distilled water (to make): 1.000ml.  
(Note: use 1 ml Conwy medium/litre of seawater)

#### \*Trace Metal Stock Solution

ZnCl<sub>2</sub> Zinc Chloride: 2.1gr  
CoCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O (Cobalt Chloride, 6-hydrate): 2.1gr  
(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>•6H<sub>2</sub>O (Ammonium Molybdate, 4-hydrate): 2.1gr  
CuSO<sub>4</sub>•5H<sub>2</sub>O (Copper Sulphate): 2.0gr  
Distilled water 100ml  
(Note: acidify with 1 M HCl until solution is clear)

#### 2. Næring 1 (Friðbjörn Möller):

Trace elements and vitamins are first prepared as concentrated primary stock solutions. In this way, they may be stored for several months if stored at proper conditions. Trace elements are prepared as four different solutions, each stored in a separate container. To prepare one litre of each stock solution, the following quantities are required:

#### Trace element stock solutions

Sol. A: ZnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O (30g) + CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O (25g) + CoSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (30g) + MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O (20g)  
Sol. B: FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O (50g)  
Sol. C: Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O (25g)  
Sol. D: EDTA · 2H<sub>2</sub>O (50g)

To prepare the solution, put the components, according to the proportions indicated above, into one 1 L graded Pyrex® bottle and fill with distilled water (DW) to the mark. Deionized

water can also be used if distilled water is not available. When the components are fully dissolved, store at ambient temperature, avoiding exposure to direct light.

#### Vitamin stock solution

B12 Cyanocobalamin (0.1g)

B1 Thiamin (10g)

H Biotin (0.1g)

Place the indicated quantity of each vitamin into a sterilized 1 L graded Pyrex® bottle and fill to the required volume using sterilized DW. When fully dissolved, store in refrigerator (~4°C) and keep away from light. The B12 solution should preferably be stored in a dark or aluminium wrapped bottle.

### **3. T-næring (túrbó næring).**

1. 1 líter af kranavatni
2. 6 gr. graskornaáburður.
3. 6 töflur af B-súper Bvítamíni (Heilsa ehf.)
4. 6 töflur Múlti Mineral (Heilsa ehf. <http://www.heilsa.is/vorur/vitamin/baetiefni/vitamin-og-steinefni/nr/257/> )
5. 6. töflur Múlti Vít (Heilsa ehf. <http://www.heilsa.is/vorur/vitamin/baetiefni/vitamin-og-steinefni/nr/259/> )

Aðferð:

6 gr af graskorni eru leyst upp í 250 ml. af vatni.

6 töflur af B-súper eru leystar upp í 250 ml. vatni.

6 töflur af Múlti Mineral eru leystar upp í 250 ml. vatni.

6 töflur af Múlti Vít eru leystar upp í 250 ml. vatni.

Notaðar eru 500 ml. flöskur með tappa fyrir hverja lausn.

Flöskum er komið fyrir í hristara (shaker) í 24 tíma.

1. Lausn úr öllum flöskum er síuð í gegnum bakteríuheldan filterpappír (0.22 µm) yfir í 2 lítra geymsluflösku.

2. 1 x líter af vatni er bætt í tveggjalítra flöskuna til að búa til 2 lítra af næringu.

Best er að nota 1 - 1.5 ml. í hvern líter af sjó sem rækta á þörunga í.