

Vinnsla og vöruþróun
Processing and Product
Development

Líftækni
Biotechnology



Matvælaöryggi
Food Safety



Lífvirk efni við lírfueldi lúðu og þorsks

Jónína Þ. Jóhannsdóttir
Rannveig Björnsdóttir
Eydís Elva Þórarinsdóttir
Kristjana Hákonardóttir
Laufey Hrólfsdóttir

Vinnsla og vöruþróun

Skýrsla Matís 38-08
Desember 2008

ISSN 1670-7192

Titill / Title	Lífvirk efni við lirfueldi lúðu og þorsks / Bioactive products in production of halibut and cod larvae		
Höfundar / Authors	Jónína Þ. Jóhannsdóttir, Rannveig Björnsdóttir, Eydís Elva Þórarinsdóttir, Kristjana Hákonardóttir, Laufey Hrólfsdóttir		
Skýrsla / Report no.	38-08	Útgáfudagur / Date:	Desember 2008
Verknr. / project no.	1303-1778		
Styrktaraðilar / funding:	AVS og Matvælasetur HA		
Ágrip á íslensku:	<p>Markmið verkefnisins var að leita leiða til þess að bæta lifun og gæði lirfa þorsks og lúðu og nota til þess umhverfisvænar aðferðir. Markmiðið var einnig að opna fyrir möguleika á nýtingu ufsapeptíða sem aukið gæti verðmæti ufsa. Niðurstöður fyrra verkefnis í lúðueldi voru lofandi og bentu til þess að hentugast væri að meðhöndla lirfur með peptíðum í gegnum fóðurdýr auk þess sem nauðsynlegt væri að rannsaka frekar styrk meðhöndlunar. Í tengslum við verkefnið hefur verið þróuð og sett upp ný aðstaða í fóðurdýraræktun hjá Fiskey hf. til rannsókna á mismunandi meðhöndlunum fóðurdýra og stuðla þannig að auknum stöðugleika í framleiðslu lúðuseiða.</p> <p>Framkvæmdar hafa verið endurteknar tilraunir með lífvirkum efnum í ræktun hjóldýra og virtust þau þola vel ákveðinn styrk efnanna. Helstu niðurstöður tilrauna á fyrstu stigum þorskeldis benda til þess að meðhöndlun með ufsapeptíðum skili sér í góðum vexti, áberandi hraðari þroska innri líffæra og mun lægri tíðni galla í lirfum. Þó er ljóst að rannsaka þarf frekar áhrif mismunandi styrks meðhöndlunar.</p> <p>Sterkar vísbendingar eru um að IgM og lysozyme séu til staðar í þorsklirfum fljótlega eftir klak eða mun fyrr en áður hefur verið haldið fram auk þess sem meðhöndlun virtist örva framleiðslu þeirra. Meðhöndlun með ufsapeptíðum virðist ekki hafa áhrif á samsetningu bakteríuflóru lirfa en ákveðin tegundasamsetning greindist í meltingarvegi lirfa í kerjum þar sem lifun og gæði lirfa voru best. Gefur þetta vísbendingar um að ákveðin tegundasamsetning bakteríuflóru sé þorsklirfum hagstæð.</p> <p>Verkefnið er styrkt af AVS og Matvælasetri Háskólans á Akureyri.</p>		
Lykilorð á íslensku:	<i>Lífvirk efni, ufsapeptíð, þorsklirfur, lúðulirfur, ónæmisörvun, bakteríuflóra</i>		
Summary in English:	<p>The main goal of this project was to increase viability and quality of cod and halibut larvae before and during the first feeding period by using bioactive products. The aim was also to increase the exploitation and value of pollock. The findings of previous projects in halibut culture were promising and indicated that treating live feed is a suitable method to carry bioactive products to the larval intestines during first feeding but the intensities of treatment needed to be further investigated.</p> <p>New facilities have been developed in relation to the project for research in the live feed culture at Fiskey Ltd. to promote increased stability in the production of halibut fingerlings.</p> <p>Repeated experiments have been conducted in the culture of rotifers and results indicates good tolerance towards treatment with bioactive products in certain intensities. The overall results of the project indicated that pollock peptides may promote increased growth and quality of cod larvae during first feeding.</p> <p>The results also indicate the presence of IgM and lysozyme early post hatching but it has not been observed in cod larvae of this size before. Furthermore, results also indicate that hydrolysates from pollock can stimulate the production of these factors in cod larvae. Treatment using pollock peptides, did not affect the bacterial community structure of live feed or cod larvae, however a similar structure was observed in larvae from the most successful production units different from other tanks. The results therefore indicate a bacterial community structure that may be preferable to the cod larvae.</p> <p>The project was funded by the AVS fund and the University of Akureyri “Matvælasetur”</p>		
English keywords:	<i>Bioactive compounds, pollock peptides, cod larvae, halibut larvae, immunostimulation, bacteria</i>		

EFNISYFIRLIT

1. INNGANGUR	1
2. FRAMKVÆMD	3
2.1. Lífvirk efni	4
2.2. Meðhöndlun fóðurdýra með lífvirkum efnum	5
2.3. Meðhöndlun þorsklirfa með ufsapeptíðum	5
2.4. Meðhöndlun lúðulirfa með ufsa peptíðum	7
3. NIÐURSTÖÐUR	8
3.1. Kortlagning bakteríuflóru á fyrstu stigum þorskeldis	8
3.2. Meðhöndlun með lífvirkum efnum á fyrstu stigum þorskeldis	8
3.2.1. Hjóldýr.....	9
3.2.2. Lirfur.....	10
3.3. Meðhöndlun á fyrstu stigum lúðueldis	14
4. UMRÆÐA OG ÁLYKTANIR	14
5. AFRAKSTUR VERKEFNISNS	16
6. ÞAKKARORÐ	16
7. HEIMILDIR	17

1. INNGANGUR

Mikil þróun hefur verið í íslensku þorskeldi undanfarin ár en hnignun stofna og hátt markaðsverð síðustu árin hafa valdið því að aukinn áhugi manna beinist að þorskeldi. Mikið hefur dregið úr þorskveiðum Íslendinga undanfarna áratugi og er því litið á þorskeldi sem vænlega leið að því marki að Íslendingar haldi hlutdeild sinni á þorskmörkuðum í framtíðinni (Gunnarsson *et al.*, 2007). Þorskeldi á Íslandi hefur þó ekki gengið sem skyldi og eru mikil afföll á fyrstu stigum eldisins umtalsvert vandamál í þorskeldi í dag. Við þorskseiðaframleiðslu í tilraunaeldisstöð Hafrannsóknastofnunar á Stað í Grindavík er algengt að lifun sé frá 0-10% frá klaki og fram að þeim tíma þegar mögulegt er að bólusetja seiðin, eða u.þ.b. 14 vikum eftir klak (Steinarsson 2004). Fyrstu tvo til þrjú mánuði eftir klak eru þorsklirfur eingöngu háðar ósérhæfða ónæmiskerfinu til að verjast örverum og sýklum þar sem þær hafa ekki þróað með sér sérhæfða ónæmissvörun (Magnadóttir *et al.*, 2004).

Megin flöskuhálsinn í eldi sjávarfiska er því á fyrstu stigum eldisins, þ.e. frá klaki og þar til að lirfan er orðin að seiði. Því er mikilvægt að auka afkomu og stuðla að efldum gæðum lirfa á þessum fyrstu og viðkvæmu stigum eldisins, en talið er raunhæft að unnt sé að ná fram 30-40% lifum í þorskseiðaframleiðslu. Ýmsar ástæður liggja að baki þessum miklu afföllum og má þar nefna bakteríuálag, svelt, sundmagagalla, vansköpun, mengun svo og sveiflur í hitastigi og seltu (Steinarsson 2004). Rannsóknir sýna jafnframt að örverufræðilegt álag í eldisumhverfi lirfa hefur mikil áhrif á lifun lirfa og seiða á fyrstu stigum eldisins (Olafsen 2001) en ýmsir hópar tækifærissýkla eru að jafnaði til staðar en þeir nýta sér meðal annars óþroskað ónæmiskerfi lirfa til að ná þar fótfestu (Vadstein *et al.*, 2004).

Lirfurnar eru því illa í stakk búnar til að bera kennsl á aðskotahluti eins og bakteríur, en ósérhæfð/meðfædd vörn er þó til staðar og veitir nokkra vernd gegn bakteríum. IgM er náttúrulegt mótefni hjá fiskum, framleitt á ýmsum þroskastigum sem ósérhæft mótsvar gegn ýmsum þáttum. IgM er m.a. að finna í slímhúð og hefur það breiða sérhæfni gegn framandi sameindum (Magnadóttir *et al.*, 2006). Hæfileiki náttúrulegra mótefna til að bindast við ýmsar tegundir mótefnavaka gerir það að verkum að þau eru mikilvæg ósérhæfð vörn gegn sýkingum (Lalor & Morahan 1990). IgM er einnig að finna í sermi þorsks en sýnt hefur verið fram á að styrkur IgM í þorski eykst með hækkandi aldri og þegar fiskurinn er sýktur (Magnadóttir *et al.*, 1999). Ekki er nákvæmlega vitað hvenær í þroskaferli þorsks IgM kemur fyrst fram en IgM hefur ekki greinst í lirfum 1-57 dögum eftir klak (Magnadóttir *et al.*, 2004).

Náttúruleg mótefni geta einnig virkjað hjástoðarkerfið (*complement system*) sem er kerfi sameinda og leiðir virkjun lykilsameinda til eyðingar sýkingarvaldandi baktería. Þáttur C3 gegnir lykilhlutverki í ósérhæfðri ónæmissvörun og tekur einnig þátt í virkjun sérhæfðrar ónæmissvörunnar. Þessi sameind gegnir því lykilhlutverki í bæði ósérhæfðu og sérhæfðu ónæmissvari (Miki Nakao 1998). Borin hafa verið kennd á C3 í lúðulirfum (Lange *et al.*, 2004a, Lange *et al.*, 2004b). Lysozyme er hluti af ósérhæfðum vörnum gegn sýklum en lysozyme er ensím með bakteríudrepandi virkni og hefur það greinst í mörgum fisktegundum (Magnadóttir *et al.*, 2006). Lysozyme klýfur ákveðin sykrutengi í vegg bæði Gram jákvæðra og Gram neikvæðra baktería en getur einnig virkað sem áthúðunarþáttur (*opsonization factor*) sem virkjar bæði hjástoðkerfið og átfrumur. Þetta ensím er m.a. að finna í slímhúð, eitilvef og plasma flestra fiska (Lie *et al.*, 1989, Yousif *et al.*, 1994).

Þar sem eldisvökvi hér á landi er yfirleitt af góðum gæðum, er talið ólíklegt að mikil afföll á lifrustigi eldis sjávarfiska megi rekja til gæða eldisvökva. Hins vegar sýna rannsóknir að lifandi fóðurdýr lifra bera mikinn fjölda baktería með sér og eru þau því talin vera helsta smitleið baktería í lifrueldi (Björnsdóttir & Smáradóttir 2003). Ýmsar leiðir hafa verið reyndar til þess að halda örverufjölda í fóðurdýrum í skefjum en lögð er mikil áhersla á að draga úr efna- og lyfjanotkun í fiskeldi og nota frekar umhverfisvænar aðferðir til að auka afkomu og gæði lifra (Serrano 2005). Ein leið til þess er notkun lífvirkra efna en meðhöndla má fisklifur með þeim í gegnum fóðurdýr eða beint í gegnum eldisvökvann. Meðhöndlun í gegnum eldisvökva er þó talin síðri leið vegna óhreininda sem myndast þá í kerjunum (Jóhannsdóttir *et al.*, 2007). Lífvirk efni geta haft mismunandi virkni sem sóst er eftir og má þar nefna bakteríuhamlandi- og/eða drepani virkni sem leiðir til fækkunar á bakteríum í fóðurdýrum eða eldisumhverfi lifra, probiotic virkni sem m.a. stuðlar að auknum fjölda æskilegra hópa baktería á kostnað óæskilegra og loks ónæmisörvandi virkni sem eykur ónæmissvar lifra og eflir varnir þeirra gegn því lífræna álagi sem fyrir er í eldisumhverfi þeirra (Jóhannsdóttir *et al.*, 2007).

Aukin athygli hefur á liðnum árum beinst að lífvirkum peptíðum úr fiski en þekkt er að hýdrólýsöt fiskpróteina eru auðmeltanleg og næringarfræðilega æskileg m.a. vegna aminosýrusamsetningar þeirra (Kristinsson & Rasco 2000). Auðvelt er að koma smáum peptíðum í fóður og sýna rannsóknir að fiskpeptíð hamla m.a. vexti baktería með því að rjúfa frumuhimnur þeirra (Olafsen 2001). Í verkefninu „Notkun lífvirkra efna í lúðueldi“ voru m.a. skoðuð áhrif lífvirkra peptíða á lúðulifur þar sem peptíðunum var ýmist bætt í ræktir

fóðurdýra eða eldisumhverfi lirfa með það að markmiði að auka gæði lirfa og afkomu í eldinu með umhverfisvænum aðferðum (Jóhannsdóttir *et al.*, 2007). Í verkefninu voru m.a. gerðar tilraunir með lífvirk peptíð unnin úr kolmunna, þorski og ufsa, og í ljós kom að meðhöndlunin hafði ekki afgerandi áhrif á örveruflóru eldisins en meðhöndlun lirfa í startfóðrun með ákveðnum styrk peptíðanna gæti mögulega haft jákvæð áhrif á afkomu, vöxt og gæði lirfa. Vísbendingar voru um að meðhöndlun með of háum styrk peptíðanna leiddi til eituráhrifa og hefði neikvæð áhrif m.t.t. vaxtar og myndbreytingar lirfa. Meðhöndlun með „réttum“ styrk peptíðanna er því lykilatriði. Rannsóknir á ósérhæfðri ónæmissvörun lúðulirfa sem meðhöndlaðar voru með ufsa peptíð-hydrolysati, leiddu í ljós að C3 og lysozyme var að finna í lirfum allt frá lokum kviðpokastigs en framleiðsla á IgM hófst ekki fyrr en um 28 dögum eftir að startfóðrun hófst (Hermannsdóttir 2008). Þessar rannsóknir sýndu enn fremur að meðhöndlun lirfa með ufsapeptíðunum leiddi til aukinnar framleiðslu bæði C3 og lysozyme samanborið við lirfur í viðmiðunarhóp og er þetta vísbending um ónæmisörvandi áhrif meðhöndlunar með ufsapeptíðum í gegnum fóðurdýr lirfa.

Verkefnið var styrkt af AVS og Matvælasetri HA og var unnið í framhaldi af verkefninu “Lífvirk efni í lúðueldi “ sem styrkt var af Líftæknineti í auðlindanýtingu (2005-2007) og Háskólasjóði KEA (2006). Afmarkaðir hlutar verkefnisins voru unnir af þremur BS nemendum sem útskrifuðust af Líftæknibraut Viðskipta- og raunvísindadeildar HA vorið 2008 (Eydís Elva Þórarinsdóttir, Laufey Hrólfsdóttir og Kristjana Hákonardóttir). Nánari lýsingar á framkvæmd og niðurstöðum er að finna í BS ritgerðum nemendanna.

2. FRAMKVÆMD

Í tengslum við verkefnið var sett upp ný aðstaða í fóðurdýraræktun Fiskeyjar hf. sem auðveldar allar rannsóknir á meðhöndlun fóðurdýranna. Settir voru upp 3 stórir stáltankar sem hver rúmar yfir 30L af fóðurdýraræktum og eru aðstæður því svipaðar hefðbundinni ræktun fóðurdýra í stöðinni og eykur þessi nýja aðstaða því áreiðanleika niðurstaðna tilrauna. Hönnun og uppsetning aðstöðunnar var alfarið í höndum starfsmanna Fiskeyjar.

Í upphafi verkefnisins voru tekin sýni af fódurdýrum og lirfum úr framleiðslueiningum Hafró í því markmiði að kortleggja bakteríuflóru á fyrstu stigum þorskeldis en það hafði ekki verið gert áður. Sýni voru tekin vikulega af fódurdýrum og lirfum allt frá 2 dögum eftir klak (dph) fram að 37 dph. Þetta var gert í því markmiði að kortleggja “eðlilegt” ástand til þess að unnt væri að átta sig á breytingum sem verða við mismunandi meðhöndlun. Sýnin voru rannsökuð m.t.t. fjölda og tegunda ræktanlegra baktería svo og samsetningar heildarflóru baktería með PCR-DGGE aðferð. Aðferðum við ræktun og greiningu bakteríuflóru er lýst í Björnsdóttir *et al.*, (2008).

Í verkefninu voru framkvæmdar tvær aðskildar tilraunir þar sem meðhöndlað var með ufsapeptíðum á fyrstu stigum þorsk- og lúðueldis. Einnig voru framkvæmdar endurteknar tilraunir við ræktun hjóldýra þar sem meðhöndlað var með mismunandi styrk ufsapeptíða eða kítósan fásykra í mismunandi langan tíma (tilraunir í artemíuræktun voru framkvæmdar í fyrra verkefni: Matís verkefnaskýrsla #51-07). Tilraunir í þorskeldi og hjóldýraræktum voru framkvæmdar í tilraunaeldisstöð Hafró að Stað við Grindavík en tilraunir á fyrstu stigum lúðueldis voru framkvæmdar í seiðaeldisstöð Fiskeyjar hf. á Hjalteyri við Eyjafjörð. Tekið skal fram að tímasetning tilrauna í eldinu er háð hrygningartíma fiska og umfang tilrauna miðast við framboð á hrognum á hverjum tíma.

2.1. Lífvirk efni

Lífvirk efni sem rannsökuð voru í þessu verkefni voru ufsapeptíð hydrolysát framleitt af Iceprotein ehf á Sauðárkróki (framleidd í verkefninu “Notkun lífvirkra efna í lúðueldi”) og kítósan fásykrur frá Genís hf. Ufsapeptíð hydrolysatið var framleitt úr ufsaflökum með vatnsrofi við basískar aðstæður og þar sem notuð voru niðurbrotsensím (Kristinsson og Rasco 2000). Kítósan afurðin sem notuð var í verkefninu var 40% DD og því unnin í mörgum þrepum (framleiðslunúmer G060703). Rannsóknir sýna að þessi afurð hefur ýmis konar lífvirk áhrif í mönnum og voru ónæmisörvandi áhrif ástæða þess að afurðin var valin til rannsókna í þessu verkefni.

2.2. Meðhöndlun fóðurdýra með lífvirkum efnum

Tilraunir á hjóldýraræktun voru framkvæmdar á tímabilinu júní til september 2007. Endurteknar tilraunir voru gerðar með notkun lífvirkra efna, kítósan fáskykra og ufsapeptíða í ræktun hjóldýra þar sem meðhöndlað var með mismunandi styrk efna í mismunandi langan tíma. Tilraunir voru framkvæmdar í 5-10L stöðugri hjóldýrarækt þar sem dýrin eru meðhöndluð með hefðbundnum hætti auk þess sem lífvirkum efnum var bætt út í ræktirnar á mismunandi hátt:

- lífvirk efni leyst upp og bætt út í eldisvökva ræktanna í 200ppm styrk. Meðhöndlað í 30 mín, 60 mín og 17 klst.
- lífvirkum efnum bætt út í auðgunarefni fyrir hjóldýraræktir, ýmist einu sinni eða tvisvar á sólarhring í mismunandi styrk (100ppm, 67ppm eða 60ppm styrkur efnanna).
- lífvirkum efnum bætt út í þörungabykkni (200 ppm) sem bætt var út í hjóldýraræktir tvisvar á sólarhring.

Hjóldýr voru skoluð vel áður en meðhöndlun hófst og einnig við sýnatöku. Þetta var gert til þess að fjarlægja bæði lífvirku efnin svo og óhreinindi af yfirborði dýranna. Við lok tilrauna voru ræktirnar síðar í gegnum 50-60µm síu, dýrunum síðan komið fyrir í 20-30ml af hreinum sjó, súrefni bætt við og sýnum komið fyrir á ís. Sýni voru síðan flutt með flugi til Akureyrar þar sem úrvinnsla fór fram á rannsóknastofu Matís/HA að Borgum.

2.3. Meðhöndlun þorsklirfa með ufsapeptíðum

Tilraunir á fyrstu stigum þorskeldis voru framkvæmdar á tímabilinu janúar – febrúar 2008 og notuð voru hrogn sem fengin voru undir lok hrognatímabilsins frá IceCod í Höfnum. Fyrirkomulag tilrauna og sýnataka var skipulagt í samstarfi við sérfræðinga Hafró sem sáu alfarið um framkvæmd og sýnatökur á meðan tilraunir stóðu yfir, auk þess sem þeir lögðu mat á afkomu og gæði lirfa við lok tilraunar.

Lirfur voru meðhöndlaðar með ufsapeptíðum í gegnum fóðurdýr (hjóldýr). Niðurstöður tilrauna í hjóldýra- og artemíuræktum gáfu vísbendingar um að meðhöndlun í styrkleikanum 200 ppm í 30 mín fyrir gjöf gæfi góða raun og var sú aðferð notuð.

Tilraunin var framkvæmd í þrítekningu þar sem lirfum úr tveimur hrognakerjum var komið fyrir í 9 tilraunasílóum (6.000 lirfur/síló) og meðhöndluð með mismunandi hætti:

- Ker 1-3: Hefðbundin meðhöndlun allt tímabilið
- Ker 4-6: Fóðurdýr meðhöndluð með ufsapeptíðum og gefin lirfum 1x á dag (morgungjöf) 3x í viku. Á öðrum tímum voru lirfunum gefin fóðurdýr sem meðhöndluð voru með hefðbundnum hætti og var önnur meðhöndlun lirfa með hefðbundnum hætti.
- Ker 7-9: Fóðurdýr meðhöndluð með ufsapeptíðum og gefin lirfum 2x á dag (morgun- og kvöldgjöf) 3x í viku. Á öðrum tímum voru lirfunum gefin fóðurdýr sem meðhöndluð voru með hefðbundnum hætti og var önnur meðhöndlun lirfa með hefðbundnum hætti.

Sýni af lirfum og fóðurdýrum voru tekin 2 dögum eftir klak (dph) og síðan vikulega út tímabilið. Sýni voru rannsökuð m.t.t. fjölda ræktanlegra baktería og samsetningar heildarflóru baktería auk þess sem valdar voru a.m.k. 5 lirfur úr hverju sýni af 28 og 42 daga gömlum lirfum til rannsókna á völdum þáttum ósérhæfðrar ónæmissvörunar (IgM og lysozyme). Við lok tilraunar (42 dph) voru lirfur vigtaðar og lengdarmældar auk þess sem lagt var mat á gæði lirfa (hnakkagallar og aðrir gallar) og afkoma reiknuð.

Fjöldi og greining ræktanlegra baktería var ákvarðaður með ræktun á næringarættum, Marine Agar (MA; Difco) og Thiosulphate Citrate Bile Sucrose agar (TCBS; Difco). Valdir voru af handahófi 12 stofnar úr hverju sýni og þeir flokkaðir í hópa m.t.t. svörunar í völdum prófum (KOH prófi, Gram litun, Cytochrome oxidasa, Katalasa, MOF prófi (oxun/gerjun), næmi fyrir O/129 Vibriostatic compound, vaxtar með og án NaCl (2%) svo og vaxtar með og án Novobiosine (0.2%)). Heildarflóra baktería var greind með sameindafræðilegum aðferðum (PCR-DGGE) og hlutaraðgreiningu á 16S rDNA geni baktería (framkvæmt af Matís-Prokaria). Nánari aðferðalýsingar er að finna í BS ritgerð nemanda (Þórarinsdóttir 2008) og í Björnsdóttir *et al.*, (2008).

Staðsetning og tilvist IgM og lysozyme var ákvarðað með mótefnalitun á frystiskornum vefjasneiðum þar sem notuð voru sérhæfð mótefni framleidd í kanínu; kanína α -þorsk IgM (gjöf frá Dr. M.B.Schröder við Sjávarútvegháskólann í Tromsø) og kanína α -þorsk lysozyme (gjöf frá Dr. B. Magnadóttur á Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum).

Frekari lýsingar á aðferðum er að finna í BS ritgerð nemenda (Laufey Hákonardóttir og Kristjana Hrólfsdóttir 2008) og í Hermannsdóttir *et al.* (2008).

2.4. Meðhöndlun lúðulirfa með ufsa peptíðum

Í fyrra verkefni (“Lífvirk efni í lúðueldi”) voru framkvæmdar tilraunir þar sem lúðulirfur voru fôðraðar með artemíu sem auðguð var með ufsapeptíðum (Hermannsdóttir, 2008). Niðurstöður þessara tilrauna bentu til þess að meðhöndlun hefði neikvæð áhrif á vöxt og afkomu lirfa og grunur lék á að notaður hafi verið of hár styrkur peptíðanna eða að meðhöndlun hafi staðið of lengi yfir en meðhöndlað var í báðum fôðurgjöfum frá upphafi til loka startfôðrunar lirfa. Niðurstöður gáfu þó jafnframt vísbendingar um að meðhöndlun örvaði framleiðslu lykilþátta í ósérhæfðri ónæmissvörun lúðulirfa (Jóhannsdóttir *et al.*, 2007). Tilraunir voru því endurteknaðar í þessu verkefni og var meðhöndlað með ufsapeptíðum í minni styrk auk þess að meðhöndlað yrði í styttri tíma (fyrstu u.þ.b. 20 dagana í startfôðrun).

Tilraunir voru settar upp í seiðaeldisstöð Fiskey hf. í október 2008 (flýttur hrygningarhópur 2009). Kviðpokalirfur úr einu sílóu voru fluttar í þrjú startker og var í tveimur keranna fôðrað með hefðbundnum hætti en lirfur í þriðja kerinu fôðraðar með artemíu þar sem ufsapeptíðum (200ppm, 200mg/L artemia) hafði verið bætt út í ræktir 30 mín fyrir gjöf. Gefin voru meðhöndluð fôðurdýr einu sinni á dag (morgungjöf), þrjá daga vikunnar frá upphafi fôðrunar.

Fyrirhugað var að taka sýni vikulega af lirfum og fôðurdýrum sem meðhöndluð væru með ufsapeptíðum og til samanburðar sýni af lirfum og fôðurdýrum þar sem meðhöndlun væri með hefðbundnum hætti. Rannsaka átti sýni með tilliti til fjölda ræktanlegra baktería og tegundasamsetningar bakteríuflóru auk þess sem lirfur yrðu rannsakaðar með tilliti til ónæmissvörunar með aðferðum sem lýst er af Hermannsdóttir (M.S. ritgerð 2008).

3. NIÐURSTÖÐUR

Í þessari skýrslu er gerð grein fyrir helstu niðurstöðum tilraunanna en nánari niðurstöður er að finna í BS ritgerðum nemenda sem unnu rannsóknahluta verkefnanna í tengslum við verkefnið (Þórarinsdóttir 2008; Hákonardóttir og Hrólfsdóttir 2008).

3.1. Kortlagning bakteríuflóru á fyrstu stigum þorskeldis

Bakteríuflóra á fyrstu stigum þorskeldis var kortlögð. Sýnum var safnað af fódurdýrum og lirfum á mismunandi tímamörkum í 5 eldiseiningum þar sem meðhöndlað var með hefðbundnum hætti. Niðurstöður rannsóknarinnar sýna að gæði fódurdýranna (hjöldýra) eru afar breytileg m.t.t. fjölda ræktanlegra baktería sem var á bilinu $9 \cdot 10^5$ til $3 \cdot 10^7$ bakt/al og fjöldi hugsanlegra *Vibrio* baktería var áætlaður á bilinu $5 \cdot 10^4$ til $5 \cdot 10^6$ bakt/ml.

Greining á 77 bakteríustofnum sem valdir voru af handahófi úr fódurdýrasýnum bendir til þess að ræktanleg bakteríuflóra fódurdýra samanstandi aðallega af 4 hópum baktería og að lítill breytileiki sé á samsetningu flórunnar í mismunandi sýnum (niðurstöður ekki sýndar).

Mikill breytileiki reyndist einnig vera í fjölda ræktanlegra baktería sem fylgir lirfum á fyrstu stigum eldisins. Heildarfjöldi eykst mikið frá upphafi startfóðrunar eða frá að meðaltali 4,3 bakt/lirfa 2 dögum eftir klak (dph) og upp í $2,6 \cdot 10^5$ bakt/lirfa 36 dph. Á sama tíma er fjöldi hugsanlegra *Vibrio* baktería að meðaltali 0,49 bakt/ lirfa 2 dph og fer upp í $1,6 \cdot 10^5$ bakt/ lirfa 36 dph. Niðurstöður greininga á ræktanlegum stofnum bendir til þess að bakteríuflóran sé mjög einhæf fyrstu dagana eftir klak en verði fjölbreyttari eftir að frumfóðrun hefst. Sex hópar baktería reyndust ríkjandi í ræktanlegum hluta flóru (niðurstöður ekki sýndar).

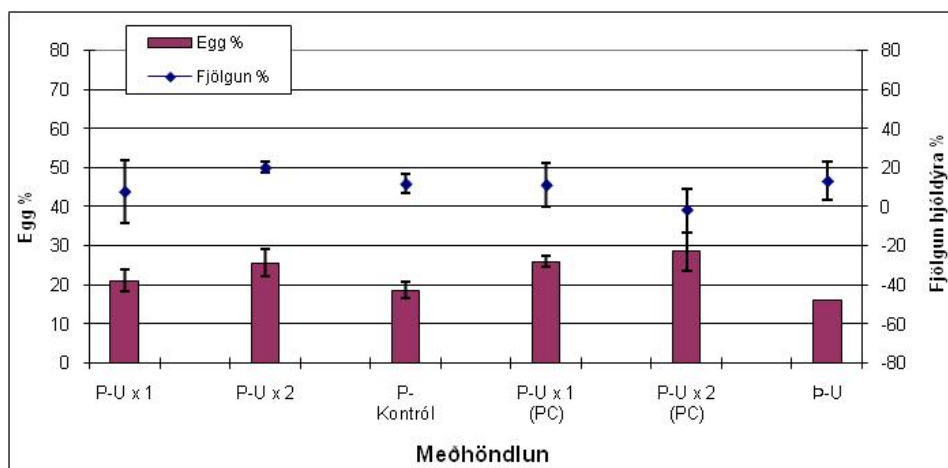
3.2. Meðhöndlun með lífvirkum efnum á fyrstu stigum þorskeldis

Hjöldýr voru meðhöndluð með ufsapeptíðum og kítósani en lirfur eingöngu með ufsapeptíðum (í gegnum fódurdýr). Áhrif meðhöndlunar voru skoðuð m.t.t. bakteríuálags og samsetningar bakteríuflóru, afkomu og framleiðni hjöldýra, afkomu og gæða lirfa svo og m.t.t. valinna þátta ósérhæfðrar ónæmissvörunar lirfa.

3.2.1. Hjöldýr

Helstu niðurstöður meðhöndlunar fódurdýra (hjöldýra) með kítósani og ufsapeptíðum leiddi í ljós að dýrin virtust þola vel meðhöndlun með þeim styrk sem rannsakaður var þó svo styrkur meðhöndlunar skipti nokkru máli. Efnin virtust ekki hafa hamlandi áhrif á vöxt baktería, hvorki m.t.t. fjölda ræktanlegra baktería eða samsetningar heildarflóru baktería (niðurstöður ekki sýndar).

Rannsókuð voru áhrif meðhöndlana á eggjaframleiðslu og fjölgun hjöldýranna og í ljós kom að bæði styrkur og tímalengd meðhöndlunar skipti verulegu máli. Svo virtist sem meðhöndlun með kítósani leiddi til minni eggjaframleiðslu en meðhöndlun með ufsapeptíðum með ákveðnum styrk gæti leitt til aukinnar eggjaframleiðslu samanborið við hefðbundna meðhöndlun (mynd 1).



Mynd 1. Áhrif meðhöndlunar með mismunandi styrk ufsapeptíða á eggjaframleiðslu og fjölgun hjöldýra sýnd með staðalfrávikum. Peptíðum var bætt út í hjöldýraræktir í blöndu við hefðbundin auðgunarefni (P-U) í 67ppm styrkleika einu sinni eða tvisvar á tímabilinu (x1, x2) og með eða án þess að hefðbundnum sóttþreinsiefnum væri bætt í ræktirnar (PC). Peptíðum (200ppm) var einnig bætt út í þörungabykkni sem hefðbundið er notað til fódrunar hjöldýra í ræktun (P-U).

Í framhaldi af þessum fortílaunum var ákveðið að meðhöndla fódurdýr með ufsapeptíðum í styrkleikanum 200 ppm í 30 mín. áður en fódurdýrin væru gefin lirlfum og var sú aðferð notuð í öðrum tilraunum á fyrstu stigum þorskeldis. Með þessum stutta meðhöndlunartíma fódurdýra má ætla að dýrin beri próteinin meira og minna óniðurbrotin í lirlfurnar.

3.2.2. Lirfur

Í þessum kafla eru teknar saman helstu niðurstöður meðhöndlunar lirfa með ufsapeptíðum. Frekari niðurstöður er að finna í BS ritgerðum nemenda (Þórarinsdóttir 2008; Hákonardóttir og Hrólfsdóttir 2008).

3.2.2.1. Afkoma og gæði lirfa

Lirfur voru fóðraðar á meðhöndluðum fóðurdýrum fyrstu vikunnar eftir klak (2-36 dph). Eftir 42 daga (42 dph) voru lirfur taldar upp úr kerjunum og afkoma reiknuð auk þess sem framkvæmdar voru lengdarmælingar og gallar skoðaðir í ~20 lirfu úrtaki úr hverju kerri.

Lifun reyndist mest hjá lirfum sem meðhöndlaðar voru 2x á dag þrjá daga vikunnar, eða að meðaltali 13,9% samanborið við 12,8% í kontrólhóp og 12,4% hóp þar sem meðhöndlað var 1x á dag þrjá daga vikunnar. Ekki reyndist þó vera marktækur munur milli hópa m.t.t. lifunar ($P>0,05$). Það skal þó tekið fram að best lifun í einstaka kerri fékkst þar sem meðhöndlað var 1x á dag en í einu kerri í þeim hópi fór rafmagn af sem leiddi til mikilla affalla og skekkti það meðaltalið verulega. Meðallengd lirfa í hópnum þar sem meðhöndlað var 1x á dag reyndist marktækt hærri samanborið við hópinn þar sem meðhöndlað var 2x á dag ($P<0,05$). Tengsl reyndust vera á milli lifunar lirfa og meðallengdar þar sem minni lifun var í þeim kerjum þar sem lengdin var mest. Bendir þetta til þess að aðgengi að fæðu geti hafa verið takmarkandi þáttur þó svo reynt væri að gefa ofgnótt fóðurs til jafns í öll ker.

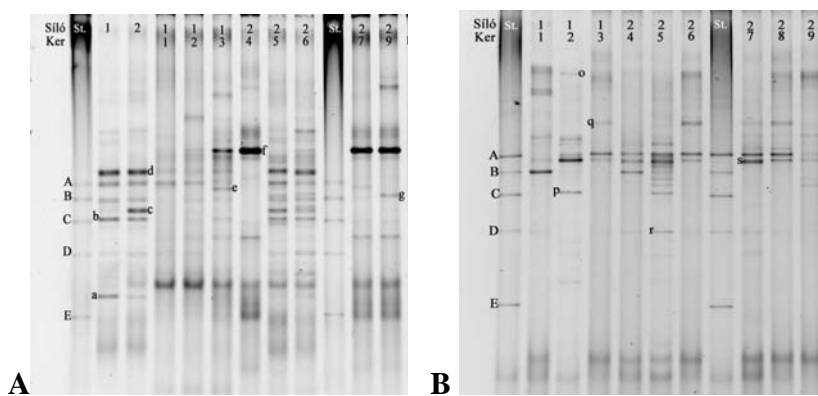
Útlitsgallar sem komu fram voru helst hausfetta, skökk seil, gaparar eða lítill sundmagi. Áberandi minna reyndist vera af göllum í meðhöndluðum lirfum eða 3-5% samanborið við 16% í kontrólhópi. Ennfremur kom í ljós við myndgreiningu á frystiskornum sneiðum lirfa að 28 dph reyndust meðhöndlaðar lirfur vera mun sterkbyggðari og líffæri þeirra mun betur afmörkuð samanborið við kontról lirfur þar sem vefurinn var mun sundurleitari. Þessi munur var ekki jafn greinilegur 42 dph þegar lirfur voru orðnar mun sterkbyggðari og líffærin afmarkaðri.

3.2.2.2. Bakteríuflóra

Meðhöndlun með lífvirkum efnum reyndist ekki hafa áhrif á fjölda baktería sem fylgir yfirborðssótthreinsuðum lirfum og var meðaltals fjöldi ræktanlegra baktería svipaður og í kontrólkerjum (niðurstöður ekki sýndar). Flokkaðir voru samtals 625 ræktanlegir stofnar úr

fóðurdýrum og lirfum og voru greindir 10 megin hópar baktería, þ.e. hópar sem innihéldu fleiri en 10 stofna hver. Samtals 368 stofnar flokkuðust í þessa 10 ríkjandi hópa en aðrir stofnar teljast minna ríkjandi þar sem þeir flokkuðust í hópa sem hver innihélt <10 stofna.

Greining heildarflóru baktería með PCR-DGGE sýnir nokkuð fjölbreytta flóru baktería í lirfum og virtist meðhöndlun með ufsapeptíðum ekki hafa áhrif á samsetningu flórunnar. Almennt virðist þó sem bakteríuflóran verði einhæfari þegar lengra líður á eldistímann (Myndir 2A og B).



Mynd 2. A: DGGE mynstur í lirfum úr sílóum 1 og 2 (2dph) og kerjum 1-9 (15 dph). B: DGGE mynstur í lirfum úr eldiseiningum 1-9 (42 dph).

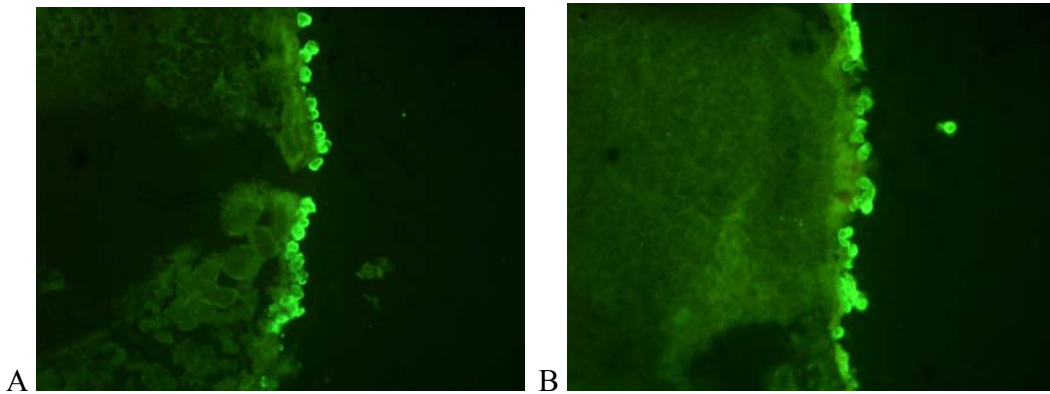
Merking segir til um upprunasíló og númer tilraunakers. Lirfur í kerjum 1-3 voru meðhöndlaðar á hefðbundinn hátt, í kerjum 3-6 voru lirfur fódraðar með meðhöndluðum fóðurdýrum 1x á dag og í kerjum 6-9 voru gefin meðhöndluð fóðurdýr 2x á dag. Á báðum gelum er einnig keyrður staðall (St) sem inniheldur hreinræktir bakteríustofna (A-E). Merkt bönd (a-s) eru bönd sem klippt voru út og afurðir sendar til tegundagreiningar með raðgreiningu.

Niðurstöður raðgreininga á afurðum sem skorin voru úr DGGE gelum sýndi mikið af *Vibrio* tegundum. Mynd 2 sýnir að bandamynstur er svipað (3-4 bönd) í þremur kerjum og um leið ólíkt því sem kemur fram í öðrum kerjum. Í ljós kom að afkoma lirfa var best í þessum þremur kerjum (Ker 3, 6 og 8 mynd 2b). Afurðir úr tveimur bandanna voru greindar sem *Vibrio* sp. og þriðja afurðin sem *Pseudoalteromonas elyakovlii*. Má því draga þá ályktun að þessi samsetning á bakteríuflórunni sé hagstæð fyrir afkomu lirfa á þessum fyrstu stigum þorskeldis.

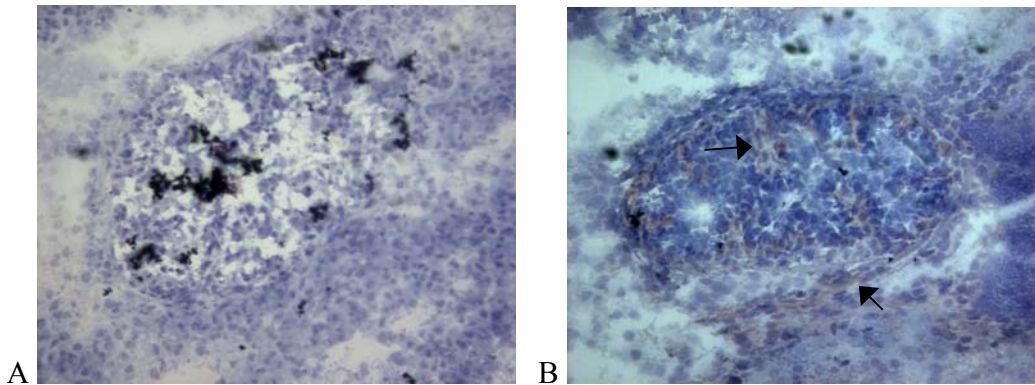
3.2.2.3. Ónæmissvörun

Rannsókuð voru áhrif meðhöndlunar með ufsapeptíðum á valda þætti ósérhæfðrar ónæmissvörunar þorsklirfa, IgM og lysozyme. Notuð voru sérhæfð mótefni gegn þessum þáttum og binding þeirra gerð sýnileg með HRP (Horseradish peroxidase) og flúormerkingu mótefna. Unnið var með þunnar sneiðar af frystiskornum lirfum og ávallt hafður neikvæður kontról til að meta sérhæfni mótefna í litun. Mat á niðurstöðum var framkvæmt með smásjárskoðun en ekki var unnt að magngreina svörun með þessum hætti og í sumum tilfellum því erfitt að meta mun á milli mismunandi meðhöndlana.

Helstu niðurstöður gefa sterkar vísbendingar um að bæði IgM og lysozyme séu til staðar í þorsklirfum fljótlega eftir klak (28 dph) (myndir 3 og 4). Ensímið var aðallega að finna í slímhúð á yfirborði lirfanna en einnig í forgirni. IgM var aðallega til staðar í hluta meltingarvegar (forgirni og þekjuvefur garna) svo og í slímhúð á yfirborði.



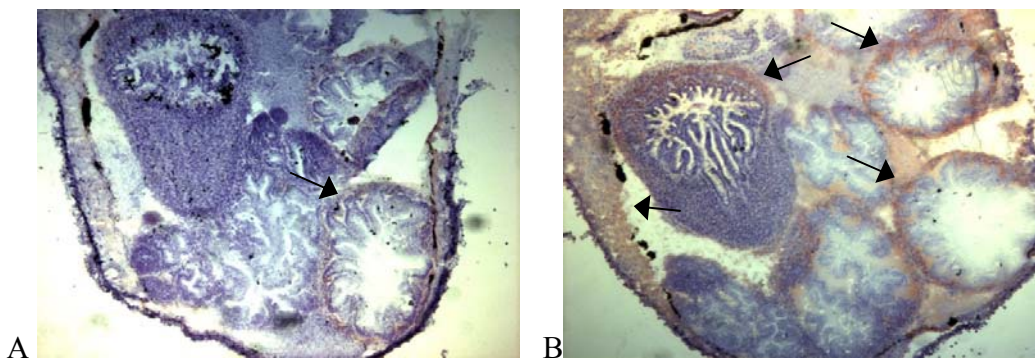
Mynd 3. Litun með flúrljómandi mótefnum gegn lysozyme á yfirborði ómeðhöndlaðrar lirfu (A) og lirfu sem meðhöndluð var 2x á dag (B) (28 dph). Myndir sýna 400x stækkun í smásjá.



Mynd 4. Litun með HRP merktum mótefnum gegn IgM í forgirni ómeðhöndlaðrar lirfu (A) og lirfu sem meðhöndluð var 2x á dag (B) 28 dph. Örvar benda á jákvæða svörun. Myndir sýna 400x stækkun í smásjá.

Mynd 4 sýnir að líffæri meðhöndlaðrar lirfu eru mun þéttari og afmarkaðri 28 dph auk þess sem IgM svörun var meiri í meðhöndluðum lirfum (rauður litur á mynd B).

Mun kröftugri svörun var í eldri lirfum (42 dph) eins og sýnt er á mynd 5. Lysozyme var þá helst í slímhúð á yfirborði lirfa (niðurstöður ekki sýndar) en IgM var fyrst og fremst í meltingarvegi (forgirni, maga, skúflöngum og þekjuvefjum garna) og á yfirborði lirfa.



Mynd 5. Litun með HRP merktum mótefnum gegn IgM í ómeðhöndlaðri lirfu (A) og lirfu sem meðhöndluð var 2x á dag (B). Sýni tekin 48 dph. Örvar benda á jákvæða svörun í meltingarvegi. Myndir sýna 100x stækkun í smásjá.

Mynd 5 sýnir að jákvæða svörun við IgM var að finna í bæði meðhöndluðum og ómeðhöndluðum lirfum 48 dph. Svörun var þó áberandi skýrari og útbreiddari í lirfum sem meðhöndlaðar voru með ufsapeptíðum 2x á dag samanborið við kontról.

Heilt yfir var áberandi meiri svörun í lirfum sem meðhöndlaðar voru með ufsapeptíðum samanborið við lirfur sem meðhöndlaðar voru með hefðbundnum hætti en eins og áður er

tekið fram gefur þessi aðferð ekki möguleika á magngreiningu svörunar en hins vegar er með aðferðinni unnt að staðsetja nákvæmlega þá svörun sem næst. Greinilegur munur var á svörun m.t.t. lysozýms í slímhúð á yfirborði meðhöndlaðra samanborið við ómeðhöndlaðra lirfa en minni munur var í meltingarvegi. Svörun m.t.t. IgM var áberandi meiri og útbreiddari í meðhöndluðum lirfum samanborið við ómeðhöndlaðar og gildi það bæði um lirfur sem meðhöndlaðar voru 1x og 2x á dag. Þessi munur kom skýrar fram 42 dph og var helst í meltingarvegi lirfa þar sem svörun var í þykkara vefjalagi í meðhöndluðum lirfum samanborið við ómeðhöndlaðar. Erfiðara var að meta mun á milli hópanna 28 dph þar sem líffæri kontról lirfa voru mjög sundurleit og því erfitt að staðsetja svörunina. Líffæri meðhöndlaðra lirfa voru áberandi betur afmörkuð.

3.3. Meðhöndlun á fyrstu stigum lúðueldis

Í eldisstöð Fiskeyjar hefur verið komið upp aðstöðu sem er nauðsynleg til að unnt sé að gera samanburð á mismunandi meðhöndlun fódurdýra í því markmiði að líkja sem best eftir hefðbundnum framleiðsluaðferðum. Markmið rannsókna á fódurdýrum er að bæta og stuðla að sem jöfnustum gæðum dýranna sem má vænta að skili sér í auknum stöðugleika við framleiðslu lúðuseiða. Þessi aðstaða var notuð við meðhöndlun artemiu í þessari tilraun.

Í tilrauninni voru lirfur meðhöndlaðar með minni styrk ufsapeptíða heldur en gert var í fyrri tilraun. Meðhöndlað var í einu startkeri og til viðmiðunar voru tekin sýni af lirfum í tveimur systkinakerjum, þ.e. kerjum með lirfum af sama uppruna. Eftir tvær vikur í frumfóðrun varð algert hrun í öllum kerjunum þremur. Niðurstöður benda því til þess að gæði lirfa á þessum tíma hafi almennt verið mjög lélegt eða að eitthvað í umhverfi lirfanna hafi valdið því að þær hafi hætt að taka til sín fæðu og því ekki náð að vaxa. Af þessum sökum er ekki hægt að álykta frekar um áhrif ufsapeptíða á fyrstu stigum lúðueldis.

4. UMRÆÐA OG ÁLYKTANIR

Megin markmið þessa verkefnis var að leita leiða til þess að bæta lifun og gæði lirfa lúðu og þorsks og nota til þess umhverfisvænar aðferðir. Markmiðið var einnig að opna fyrir nýja möguleika til nýtingar á ufsapeptíðum sem aukið gæti verðmæti ufsa sem er vannýtt hráefni.

Niðurstöður fyrri tilrauna um áhrif lífvirkra efna í lúðueldi gáfu lofandi niðurstöður og var því í þessu verkefni endurtekin meðhöndlun á fyrstu stigum lúðueldis auk þess sem áhrif efnanna voru könnuð á fyrstu stigum þorskeldis. Sjónum var fyrst og fremst beint að ónæmisörvandi áhrifum meðhöndlunar með ufsapeptíðum en einnig voru rannsökuð áhrif á ríkjandi bakteríuflóru eldisins.

Í ljós kom að vöxtur og lifun lirfa var yfir meðallagi sem kom frekar á óvart sökum þess að hrognin voru fengin í lok hrognatímabilsins þegar gæði hrogna eru alla jafna slakari. Vöxtur og gæði lirfa sem meðhöndluð voru með ufsapeptíðum var almennt betri en í ómeðhöndluðum hóp og líkur leiddar að því að það stafi af auknu framboði auðmeltanlegrar fæðu í formi viðbættra peptíða. Þó reyndist vöxtur og afkoma lirfa ívið betri þar sem meðhöndlað var með minni styrk efna (1x á dag) og bendir það til þess að gæta verði að styrk peptíðanna við meðhöndlun.

Mjög áhugavert þykir að meðhöndlun skilaði sér einnig í áberandi hraðari þroska innri líffæra auk þess sem greinileg örvun var á framleiðslu lykilþátta í ósérhæfðri ónæmissvörun lirfanna. Jafnframt sýna niðurstöður þessa verkefnis að IgM og lysozyme er að finna mun fyrr í þroskaferli lirfanna en áður hefur verið haldið fram.

Vibrio tegundir reyndust ríkjandi í lirfum og fódurdýrum þeirra og er það í samræmi við áður birtar niðurstöður um samsetningu bakteríuflóru á fyrstu stigum þorskeldis (Brunfold *et al.*, 2007). Auðgun fæðudýra lirfa með ufsapeptíðum virtist ekki leiða til breytinga á samsetningu bakteríuflóru fódurdýra eða lirfa en vísbendingar voru um að ákveðin tegundasamsetning bakteríuflóru væri þorsklirfunum hagstæð. Þannig kom í ljós ákveðin tegundasamsetning flóru í meltingarvegi lirfa í kerjum þar sem lifun og gæði lirfa voru best.

Af niðurstöðum að dæma er ljóst að mikilvægt er að rannsaka frekar áhrif mismunandi styrks peptíðanna, tíðni meðhöndlana og hvenær hentar best að hefja og ljúka fóðrun með peptíð-auðguðum fódurdýrum. Mikill áhugi er því fyrir því að halda þessum rannsóknum áfram og leitað er leiða til þess að fjármagna þær rannsóknir í útvíkkuðu samstarfi með m.a. Iceprótein hf. og norskum þorskseiðaframleiðanda.

5. AFRAKSTUR VERKEFNISNS

Nemendaverkefni:

- Þórarinsdóttir, E.E. 2008. Samsetning bakteríuflóru lirfa á fyrstu stigum þorskeldis. B.S. ritgerð. Viðskipta- og raunvísindadeild Háskólans á Akureyri. Maí 2008, 45 bls.
- Kristjana Hákonardóttir og Laufey Hrólfsdóttir. Áhrif meðhöndlunar með fiskpeptíðum á ósérhæfða ónæmissvörun í þorsklirfum. B.S. ritgerð. Viðskipta- og raunvísindadeild Háskólans á Akureyri. Maí 2008, 110 bls.

Kynningar:

- Thorarinsdóttir EE, Johannsdóttir J, Petursdóttir M, Steinarsson A and Bjornsdóttir R. 2008. Mapping of bacteria associated with first feeding cod (*Gadus morhua*) larvae. Veggspjald á „Cod farming in the Nordic countries 2008“, haldin í Reykjavík 30/9 - 1/10 2008.
- Johannsdóttir J, Hakonardóttir K, Hrolfsdóttir L, Hermannsdóttir R, Steinarsson A and Bjornsdóttir R. 2008. Detection and stimulation of IgM production in first feeding cod (*Gadus morhua*) larvae. Veggspjöld á alþjóðlegum ráðstefnum: „Fish Diseases and Immunology“, haldin í Reykjavík 6-9. sept 2008 og „Cod farming in the Nordic countries 2008“, haldin í Reykjavík 30/9 - 1/10 2008.

6. ÞAKKARORÐ

Aðstandendur verkefnisins vilja þakka AVS og Matvælasetri Háskólans á Akureyri fyrir rausnarlegt fjárframlag þeirra til verkefnisins. Einnig viljum við þakka nemendum sem unnu við mismunandi hluta verkefnisins svo og þeim starfsmönnum Matís sem komu að framkvæmd verkefnisins með ýmsum hætti, Maríu Pétursdóttir fyrir bakteríutalningar og greiningar og Sólveigu Pétursdóttir og öðrum starfsmönnum Matís-Prokaría fyrir raðgreiningu bakteríustofna. Starfsmönnum Akureyrarseturs Náttúrufræðistofnunar Íslands er þakkað gott samstarf við sameindafræðilegar greiningar á bakteríusýnum.

Fyrirtækin sem eru þátttakendur í verkefninu, Hafró og Fiskey hf., lögðu til aðstöðu til tilrauna sem framkvæmdar voru í eldinu og hefði ekki verið hægt að framkvæma þær tilraunir án þeirra. Starfsmenn þessara fyrirtækja fá kærar þakkir fyrir ómetanlega aðstoð og velvilja.

Mótefni sem notuð voru til rannsókna voru fengin að gjöf frá Dr. M.B.Scrøder hjá Sjávarútvegsháskólann í Tromsø og Dr. B.Magnadóttur hjá Tilraunastöð Háskóla Íslands að Keldum og eru þeim færðar kærar þakkir fyrir.

7. HEIMILDIR

- Björnsdóttir, R. & H. Smáradóttir. 2003. Stýring örveruflóru í startfóðurkerjum lúðulirfa. Akureyri: Rannsóknarmiðstöð Íslands.
- Björnsdóttir, R. Johannsdóttir J, Coe J, Smaradóttir H, Sigurgísladóttir S. & Guðmundsdóttir B.K. 2009. Survival and quality of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) in intensive farming: Possible impact of the intestinal bacterial community. *Aquaculture* 286:53-63.
- Brunvold, L. Sandaa R.A, Mikkelsen H, Welde E, Bleie H & Bergh O. 2007. Characterisation of bacterial communities associated with early stages of intensively reared cod (*Gadus morhua*) using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). *Aquaculture* 272:319-327
- Gunnarsson, V.I., A. Fiskeldishópur & A. Steinarsson. 2007. Þorskseiðaeldi. In Gunnarsson, V.I. (ed): Staða þorskeldis á Íslandi, samkeppnishæfni og stefnumótun rannsókna- og þróunarstarfs. Reykjavík: Sjávarútvegsþjónustan ehf.
- Hákonardóttir, K. & Hrólfisdóttir, L. Áhrif meðhöndlunar með fiskpeptíðum á ósérhæfða ónæmissvörun í þorsklirfum. B.Sc. ritgerð við Viðskipta- og raunvísindadeild Háskólans á Akureyri, maí 2008, 110 bls.
- Hermannsdóttir, R. 2008. Effect of bioactive product on innate immunity and development of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae. M.Sc. thesis Department of Business & Sciences, University of Akureyri, November 2008, 102 pp.
- Hermannsdóttir, R, J. Johannsdóttir, H. Smaradóttir, S. Sigurgísladóttir, B.K. Guðmundsdóttir & R. Björnsdóttir. 2008. IgM, C3 and lysozyme development and the bacterial community structure of first feeding Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae fed fish protein hydrolysates. *Submitted Fish & Shellfish Immunology* December 2008.
- Jóhannsdóttir, J., H. Smáradóttir, J. Coe, R. Hermannsdóttir, M. Pétursdóttir & R. Björnsdóttir. 2007. Notkun lífvirkra efna í lúðueldi. Matis ohf. *Verkefnaskýrsla Matís nr. 51-07*.
- Kristinsson, H.G. & B.A. Rasco. 2000. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40: 43-81.
- Lalor, P.A. & G. Morahan. 1990. The peritoneal Ly-1 (CD5) B cell repertoire is unique among murine B cell repertoires. *European Journal of Immunology*. 20: 485-492.
- Lange, S., S. Bambir, A.W. Dodds & B. Magnadóttir. 2004a. The ontogeny of the complement component C3 in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) - an immunohistochemical study. *Fish & Shellfish Immunology* 16: 359-367.
- Lange, S., A.W. Dodds & B. Magnadóttir. 2004b. Isolation and characterization of complement component C3 from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Fish & Shellfish Immunology* 16: 227-239

- Lie, Ö., Ö. Evensen, A. Sörensen & E. Frøysadal. 1989. Study on lysozyme activity in some fish species. *Diseases of Aquatic Organisms* 6: 1-5.
- Magnadóttir, B., B.K. Gudmundsdóttir, S. Lange, A. Steinarsson, M. Oddgeirsson, T. Bowden, I. Bricknell, R.A. Dalmo & S. Gudmundsdóttir. 2006. Immunostimulation of larvae and juveniles of cod, *Gadus morhua* L. *Journal of Fish Diseases* 29: 147-155.
- Magnadóttir, B., S. Lange, A. Steinarsson & S. Gudmundsdóttir. 2004. The ontogenic development of innate immune parameters of cod (*Gadus morhua* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 139: 217-224.
- Miki Nakao, T.Y. 1998. Structural and functional identification of complement components of the bony fish, carp (*Cyprinus carpio*). *Immunological Reviews* 166: 27-38.
- Olafsen, J.A. 2001. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture* 200: 223-247.
- Serrano, P.H. 2005. Responsible use of antibiotics in aquaculture. Rome: FAO. *FAO Fisheries Technical Paper. No. 469*.
- Steinarsson, A. 2004. Framleiðsla þorskseiða. Í Björn Björnsson og Valdimar I. Gunnarsson (Ritstj.), *Þorskeldi á Íslandi* (bls. 41-86). Reykjavík: Hafrannsóknarstofnun.
- Vadstein, O., T.A. Mo & Ö. Berg. 2004. Microbial interactions, prophylaxis and diseases. In Morkness, E., Kjörsvik, E. and Olsen, Y. (Eds.), *Culture of Cold-Water Marine Fish*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd. pp. 28-64.
- Yousif, A.N., L.J. Albright & T.P.T. Evelyn. 1994. In vitro evidence for the antibacterial role of lysozyme in salmonid eggs. *Diseases of Aquatic Organisms* 19: 15-19.
- Þórarinsdóttir, E.E. 2008. Samsetning bakteríuflóru lirfa á fyrstu stigum þorskeldis. B.Sc. ritgerð við Viðskipta- og raunvísindadeild Háskólans á Akureyri, maí 2008, 45 bls.