

Verkefnaskýrsla
01 - 06



Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins

JANÚAR 2006

FORVARNIR Í FISKELDI

HLUTI A: Forvarnir í þorskeldi

HLUTI B: Flokkun örvera og probiotika tilraunir

Ritstjórar:
Hélène L. Lauzon
Rannveig Björnsdóttir

Forvarnir í fiskeldi

*Samantekt AVS verkefnisins
fyrir 18-mánaða tímabil: 2004-2005*

Ritstjórar:

Hélène L. Lauzon

Rannveig Björnsdóttir



Titill / Title	Forvarnir í fiskeldi		
Höfundar / Authors	A - Forvarnir í þorskeldi: <i>Hélène L. Lauzon (PhD nemi), Sigríður Guðmundsdóttir, Agnar Steinarsson, Eyjólfur Reynisson, Bjarnheiður K. Guðmundsdóttir, Margrét Bragadóttir, Bergljót Magnadóttir, Berglind Gísladóttir (MS nemi), Eva Yngvadóttir</i>		
	B - Flokkun örvera og probiotika tilraunir: <i>Rannveig Björnsdóttir, Heiðís Smáradóttir, H. Rut Jónsdóttir (MS nemi), Viktor Mar Bonilla, Eyjólfur Reynisson, Ágústa Guðmundsdóttir, Hólmfríður Sveinsdóttir (PhD nemi), María Pétursdóttir, Særún Ósk Sigvaldadóttir (BS verkefni)</i>		
Skýrsla Rf / IFL report	01 - 06	Útgáfudagur / Date:	Janúar 2006
Verknr. / project no.	1580 (A) & 1622 (B)		
Styrktaraðilar / funding:	AVS sjóður (R 41-04)		

Ágrip á íslensku:

Markmið verkefnisins er að auka samkeppnishæfni/hagkvæmni við stríðeldi þorsks og lúðu hérlendis með því að auka lifun hrogna/lirfa og stuðla að auknum vexti lirfa í startfóðrun. Verkefnið skiptist í tvo hluta: A-hluta sem nefnist *Forvarnir í fiskeldi* og B-hluta sem kallast *Flokkun örvera og probiotika tilraunir*. Í skýrslunni er fjallað um fyrstu niðurstöður úr báðum hlutum verkefnisins.

Helstu niðurstöður A-hlutans benda til þess að varasamt sé að einblína á heildartalningu örvera til að átta sig á velgengni eldiskerfa og því sé nauðsynlegt að afla þekkingar á samsetningu örveruflórunnar. Við kortlagningu á örveruflóru þorskeldisins var hrogna- og liffutímabilið skoðað. Efnamælingar við lúðueldi sýndu að afkomutölur samræmdust sérstaklega ammóníaksmagni í sjó. Mat á þránun fituríkra fóðrunarafurða gaf til kynna að þránun sé ekki stórt vandamál við fóðrun lirfa. Val bætibakteríanna var ákveðið út frá ákveðnu skímufurli og væntanlegri notkun við þorskeldi. Notkun bætibaktería við böðun hrogna og/eða lirfa var skoðuð en samfelld böðun frá hrognastigi áfram yfir lifrustigið tókst vel. Úrvinnsla gagna og frekari mælingar á ýmsum sýnum munu skýra betur hversu hagkvæm þessi meðferð var. Einnig var notkun bætibaktería í seiðaeldi könnuð. Ljóst er að þróun forvarnaraðferða er mjög tímafrek og vandasöm, og nauðsynlegt að vinna vel úr niðurstöðum áður en frekari ákvarðanir eru teknar.

Í B-hlutanum hefur verið þróuð aðferð til að kortleggja mynstur heildarörveruflóru með sameindafræðilegum aðferðum. Þessa aðferð er hægt að nota til greiningar heildarörveruflóru og bera saman við þá örveruflóru sem ræktast upp með hefbundnum aðferðum og er flokkuð m.t.t. lífefnafræðilegra eiginleika. Í þessum verkhluta hafa einnig verið gerðar rannsóknir á fylgni milli vaxtar/afkomu lirfa og þróunar örveruflóru, ásamt prófunum á áhrifum valinnar blöndu probiotika baktería á fyrstu stigum lúðu- og þorskeldis. Fyrstu niðurstöður benda til að fóðurdýr lúðulirfa (*Artemia*) sé mjög misjöfn að gæðum m.t.t. heildarfjölda baktería og fjölda *Vibrio* baktería. Niðurstöður benda jafnframt til að frekar einsleit bakteríuflóra sé til staðar í artemíu og startkerum en flóran sé fjölbreyttari í hrognakerum, ef litið er á ræktanlega bakteríuflóru. Meðhöndlun með PRO-blöndu virðist ekki vera að hafa mikil áhrif á afkomu lirfa en aftur á móti er hlutfall gapara fyrir neðan meðallag í PRO-meðhöndluðum kerum. Frekari niðurstöður verða kynntar í lokaskýrslu um B-hluta verkefnisins.

Lykilorð á íslensku:

Sjávarfiskaeldi – fyrstu stig eldisins - þorskur – lúða – forvarnir - bætibaktería – probiotika - örveruflóra – flokkun baktería - T-RFLP - efnaálag

Summary in English:

The aim is to contribute to increased competitiveness and success of marine aquaculture by increasing survival from hatching through the cod/halibut larval stage. This goal will be achieved by developing preventive methods to control chemical and biological parameters of importance, and therefore increase survival and contribute to better growth and development of larvae.

Part A : The preliminary results indicate that it is difficult to relate larval bacterial counts to the success of cod larval survival, and therefore necessary to determine the composition of the microbiota establishing in larvae and rearing systems. The isolation and identification of cod aquacultural microbiota has been done at the pre- and post-hatching period. Assessment of selected chemical parameters was performed at early stages of halibut farming. Evaluation of the degree of fat oxidation in fatty/enriched larval feeding components was carried out. The selection of protective/probiotic bacteria was based on a specific screening and their anticipated use in cod farming. Application of selected bacteria was tested *in vivo*, i.e. for surface treatment of eggs and/or larval bathing, and the continued use before and after hatching worked best. Application of the same bacteria was also tested with cod juveniles. Further analysis of samples and data is required before further decisions are taken.

Part B: A molecular method was introduced and developed to analyse the bacterial flora in environmental samples. The method is used to compare the pattern of total bacterial flora and cultivable flora that is analysed and grouped with respect to a number of biochemical properties. Survival of larvae was compared to changes in the bacterial flora. Furthermore, this part of the project includes studies on the effects of a selected mixture of probiotics during on the first developmental stages of halibut and cod farming. The preliminary results show that the quality of the larval feed (*Artemia*) varies considerably with respect to numbers of culturable bacteria. The bacterial flora in *Artemia* and first feeding tanks seems to be rather monotropic, while more heterotropic in the egg incubation tanks. The probiotic mixture does not seem to have any favourable effects on the survival of the larvae, but the percentage of deformed larvae is below average in tanks where treatment with probiotic bacteria was applied. Further results from part B of the project will be published in the final report (2006).

English keywords:

Marine aquaculture – first developmental stages - cod – halibut– preventive measures – protective cultures – probiotic - microbiota – bacterial classification - T-RFLP – chemical load

EFNISYFIRLIT

1. INNGANGUR	6
2. FRAMKVÆMD OG NIÐURSTÖÐUR.....	9
2.1 – A-Forvarnir í þorskeldi.....	9
2.2 – B- Flokkun örvera – probiotika tilraunir (lúða og þorskur).....	54
3. SAMANTEKT	63
3.1 – A-Forvarnir í þorskeldi.....	63
3.2 – B- Flokkun örvera – probiotika tilraunir (lúða og þorskur).....	65
4. ÞAKKARORÐ	67
5. HEIMILDIR.....	67

1. INNGANGUR

Mikil afföll verða á fyrstu stigum í fiskeldi og hingað til hefur ekki fundist einhlít skýring á þessu eða verið hægt að koma í veg fyrir þetta. Sjónir manna hafa í auknum mæli beinst að umhverfisþáttum og þá sérstaklega lífrænu álagi í eldisumhverfi lirfanna og þau vandamál sem það skapar. Lífræn efni bera með sér og safna að sér örverum og mikil hættu er á að lífræn efni sem bætt er í kerin og lífrænn úrgangur í kerum séu gróðrastía fyrir ýmsar tegundir baktería. Óæskilegar tegundir baktería geta því náð miklum fjölda á stuttum tíma og valdið skyndilegum og víðtækum afföllum á seiðum þegar minnst varir. Þorskeldisrannsóknir hjá Hafrannsóknastofnun sýna til dæmis að dauðsföll eru að meðaltali um 44% við klak en eru 16 vikum eftir klak orðin allt upp í 97% (Agnar Steinarsson, 2002).

Lítið er til af heimildum um hvernig framleiðsluvandamál eru leyst í stríðeldi sjávarfiska enda samkeppnin hörð á þessu sviði og miklir hagsmunir í húfi. Á fyrra tímabili eldisins er lirfa/seiði afar viðkæm/t fyrir umhverfislegum þáttum, sérstaklega óæskilegum örverum. Æskilegt er að minnka eða hætta notkun sýklalyfja. Ekki er unnt að framkvæma bólusetningu á lirfum, bæði sökum smæðar en einnig vegna þess að ónæmiskerfið verður ekki virkt fyrr en mörgum vikum eftir klak. Þróun ónæmiskerfis gerist mishratt eftir fisktegundum (Ellis, 1988). Þar að leiðandi er nauðsynlegt að finna leiðir og þróa aðferðir til að greina og bæta umhverfisþætti í eldinu, lífræna og ólífræna, á frumstigi eldisins, þ.e. frá klaki til loka lirfuskeiðs.

Notkun jákvæðra og/eða próbíótískra baktería gæti verið leið til að stýra líffræðilegu eldisumhverfi. Þannig mætti ná æskilegu jafnvægi sem yki lifun, vöxt og vellíðan lirfa og seiða. Með "próbíótísk" er átt við að lifandi baktería er notuð sem fæðubótarefni í þeim tilgangi að hafa jákvæð áhrif á viðkomandi einstakling með því að bæta örverufræðilegt jafnvægi í meltingarvegi hans (Fuller, 1989). Próbíótískar örverur þurfa að uppfylla eftirfarandi skilyrði: (1) mega ekki valda sýkingu hjá hýsli; (2) þurfa að hafa hamlandi áhrif á óæskilegar örverur; (3) geta annað hvort fest sig og/eða vaxið í hýslinum, sérstaklega í meltingarveginum, eða örvað ónæmiskerfi hans; (4) æskilegt að vera úr sama umhverfi. Notkun próbíótískra baktería er vel þekk hjá mönnum (t.d. LGG í

mjólkurvörum) og einnig í eldi dýra með góðum árangri (Fuller, 1989; Sissons, 1989; Montes & Pugh, 1993). Aðrar bakteríur, sem ekki hafa eiginleika til að festast í meltingarvegi, geta samt sem áður haft hamlandi áhrif á óæskilegar örverur og á þróun umhverfisflórunnar í eldi. Erlendar rannsóknir hafa sýnt fram á að náttúruleg örveruflóra fisks getur haft hamlandi áhrif á sjúkdómsvaldandi örverur (Westerdahl o.fl., 1991, 1994; Olsson o.fl., 1992; Austin o.fl., 1995; Bergh, 1995). Þannig ætti að vera mögulegt að einangra æskilegar bakteríur og nota þær til að stýra örveruflóru eldisumhverfisins og jafnvel hafa bein áhrif á lifun hrognna sem á meltingarveg lirfa og seiða. Notkun jákvæðra og probíótískra baktería (“bætibaktería”) er tvímælalaust með ákjósanlegri valkostum og er að vonum mikill áhugi fyrir þeirri lausn í eldi margra fisktegunda og skeldýra sem ætlaðar eru til manneidis. Þar sem hver eldiseining og hver einstök tegund eldis hefur sínar sérstæður er ljóst að umfangsmiklar rannsóknir liggja að baki þróun árangursríkra probíótískra aðferða. Af framansögðu má vera ljóst að nauðsynlegt er að finna nýjar leiðir og þróa árangursríkar aðferðir til að greina og bæta umhverfisþætti.

“**Forvarnir í fiskeldi**” er 3 ára verkefni (2004-2007) sem leggur áherslu á að finna leiðir og þróa aðferðir til að greina og bæta umhverfisþætti í lúðu- og þorskeldi á frumstigi eldisins, þ.e. frá klaki til loka lirlfuskeiðs, en á því tímabili eru afföllin hvað mest. Tímasetning tilraunirna er háð hrygningartímabili, sem er á vorin hjá þorski en þrisvar sinnum á ári hjá lúðu.

Verkefnið skiptist í 2 meginhluta: A– FORVARNIR Í ÞORSKELDI og B- FLOKKUN ÖRVERA – PROBIOTIKA TILRAUNIR (lúða og þorskur). Verkefnisstjóri A-hlutans er Hélène L. Lauzon á Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins (Rf). Aðrir þátttakendur þess hluta verkefnisins eru Tilraunastöð HÍ í meinafræði (Sigríður Guðmundsdóttir, Keldur) og Tilraunaeldisstöð Hafrannsóknastofnunarinnar (Agnar Steinarsson, Staður í Grindavík). Verkefnisstjóri B-hlutans er Arnar F. Jónsson hjá Fiskey ehf og aðrir þátttakendur eru Rf á Akureyri/Háskólinn á Akureyri (Rannveig Björnsdóttir), Náttúrufræðistofnun Íslands Akureyrarsetur (Viktor Mar Bonilla, NÍA), Raunvísindadeild Háskóla Íslands (Ágústa Guðmundsdóttir) og Hólaskóli (Helgi Thorarensen).

Í A-hlutanum er áherslan lögð á: aukna þekkingu á líf- og efnafræðilegum þáttum þorskeldisins í heild sinni, jákvæðum sem neikvæðum; skilgreiningu á þeim þáttum þorskeldisins sem hafa áhrif á afkomu og þroska þorsklirfa; greiningu æskilegra örvera, þróun og prófun forvarnaraðferða.

Í B-hlutanum er áherslan lögð á: þróun sameindafræðilegra aðferða (T-RFLP) til kortlagningar á mynstri örveruflóru á fyrstu stigum lúðueldis; samanburð á flokkun örveruflóru eldisins með sameindafræðilegum aðferðum annars vegar og ræktun á næringarætum og flokkun m.t.t lífefnafræðilegra eiginleika hins vegar; fylgni milli vaxtar/afkomu lirfa, og þróunar örveruflóru (mynstur og breytingar á því) og efnaálagi í eldinu; áhrif valinnar blöndu probiotika baktería á fyrstu stigum lúðu- og þorskeldisins og tjáning/virkni trypsíns á þessu viðkvæma stigi þorskeldisins.

Tímaáætlun fyrir verkefnið í heild samkvæmt AVS umsókninni árið 2005

A-hlutinn			AVS 2004				AVS 2005				AVS 2006			
			Mánuðir	1-3	4-6	7-9	10-12	13-15	16-18	19-21	22-24	25-27	28-30	31-33
Fundir			x				x				x			
Skýrslur			S1				S2				S3			
Verkþættir	Fjöldi mannmán.	Þátttakendur												
Verkþ. 0	3,5	Rf, Keldur, Staður	AVS 2003											
Verkþ. 1	3,5	Rf, Staður	AVS 2003 og 2004											
Verkþ. 2	1,5 + 0,75	Rf, Keldur												
Verkþ. 3	5	Rf, Keldur												
Verkþ. 4	8,5	Rf, Keldur, Staður												
Verkþ. 5	9,5	Rf, Keldur, Staður												
Verkþ. 6	4,5	Rf, Keldur												

B-hlutinn			AVS 2004				AVS 2005							
			Mánuðir	1-3	4-6	7-9	10-12	13-15	16-18	19-21	22-24			
Fundir			x				x							
Skýrslur			S1				S2							
Verkþættir	Fjöldi mannmán.	Þátttakendur												
Verkþ. 1	9,5	Rf-AK, NÍA												
Verkþ. 2	7	Rf-AK, NÍA												
Verkþ. 3	4	Rf-AK, NÍA												
Verkþ. 4	10	Rf-AK, NÍA, HÍ, Hólar												
Verkþ. 5	4,5	Rf-AK, NÍA, HÍ, Hólar												

2. FRAMKVÆMD OG NIÐURSTÖÐUR

2.1 – A-Forvarnir í þorskeldi

Þessi skýrsla lýsir ýmsum tilraunum og mælingum sem framkvæmdar voru í tengslum við þorskeldi frá vorinu 2004 til desember 2005. Einnig voru teknar sýni úr lúðueldi í samvinnu við B-hluta verkefnisins (Rf á Akureyri og Fiskey ehf.) til að meta efnaálagið í eldisumhverfinu frá hrognastigi til loka lírfuskeiðs (um 110 dagar frá klaki) auk sýna á eldri seiðum til að meta uppsöfnun málma.

Hér er greint frá þeim fimm verkþáttum A-hluta verkefnisins sem unnið var í á þessu tímabili, frá vori 2004 til desember 2005.

Verkþáttur 0: Kortlagning á örveruflóru þorskeldisins	
Upphaf: 1. mán. (apríl 2004)	Lok: 12. mán. → <i>framlengt til feb. 2006</i>
<p>Markmið: að kortleggja örveruflóru þorskeldisins í hefðbundnu kerfi í samanburði við ómeðhöndlað kerfi (Rf), auk þess að gera skipulega leit að sjúkdómsvaldandi bakteríum (Keldur) á fyrstu stigum eldisins.</p> <p>Áætlaður afrakstur: Öflun gagna til (i) mats á örveruálagi í þorskeldi, við óæskilegar og hefðbundnar aðstæður, og (ii) skilgreiningar á þáttum sem hafa áhrif á afkomu og þroska lírfa; auk einangrunar á bakteríum til frekari rannsókna í öðrum verkþáttum.</p> <p>Staða/breytingar: Vegna erfiðleika við fyrsta tilraun vorið 2004 var ákveðið að skoða einnig örveruflórana við tilraunina vorið 2005 til þess að gera gagnasöfnunina öflugri og víðtækari. Niðurstöðurnar liggja að mestu fyrir, en nánari greining valdra bakteríustofna úr seinni tilrauninni með 16S rDNA hlutaraðgreiningu verður framkvæmd í febrúar 2006. Þessar viðbótarupplýsingar eru mikilvægar til þess að komast betur að því hvaða örverur eru skaðlegar og hvaða áhrif mismunandi meðferð hefur á samsetningu örveruflórunnar. Valin sýni úr báðum tilraunum (2004 og 2005) hafa verið greind með T-RLFP aðferðinni en úrvinnslu er ekki lokið.</p> <p>Lýsing á tilraunum: Vorið 2004 var fyrsta þorskilraunin framkvæmd og samanburður gerður á eldiskerfum með og án efnameðhöndlunar, með það í huga að fá fram hefðbundnar og óæskilegar aðstæður. Mynd 1 sýnir tilraunaruppsetninguna. Dagsgömul frjóvguð hrogn</p>	

úr 6 lotum voru sameinuð og skipt til helminga. Fyrri helmingurinn (141 g) fékk hefðbundna meðferð (kontról), þ.e. hann var sótthreinsaður með glúteraldehýði (300 ppm í 5 mín.) og settur í 25 L síló eftir skolun með hreinum sjó. Hinn helmingurinn (149 g) var eingöngu skolaður (ómeðhöndlaður) og settur í annað 25 L síló. Rennsli eldisvökvans (sjór úr 30 m djúpum borholum) var um 0,5-1 L/mín og hitastigið 8°C. Á 11. degi voru kontrólhrognin sótthreinsuð og skoluð á ný og síðan sett í sama síló. Klakið hófst á 11. degi. Á 13. degi voru lirfurnar fluttar í 150 L síló (2 kontról: S7-S8 (6.000 lirfur per síló); 2 ómeðhöndluð: S9-S10 (4.000 lirfur per síló). Kontrólsílóin fengu lyfjameðhöndlun á d0-2-4-6-9-13-21, þ.e. 50 ppm neomycin var sett út í sílóin með rennsli á (0,5 L/mín.). Þörungabykkni var notað daglega til að skyggja eldisvökvann (2 x 2 ml per síló) og farið var að fóðra með lifandi auðguðum hjóldýrum (2 x 1 milljón per síló á dag) frá 3. degi. Auðguð artemía var gefin frá 21. degi (2 x 50.000 per síló á dag). Á 23. degi vildi svo óheppilega til að heitt vatn lak inn á sílóin og allar lirfurnar drápu. Fjöldi lirfa í S7, 8, 9 og 10 var þá kominn niður í 700, 300, 200 og 30 lirfur.

Vegna þessa óhapps var sýnatökunni haldið áfram í stórum eldiskerum (2 lirfuker: E13 og E24, 3.400 lítra), en þar voru jafngamlar lirfur af sama uppruna og í sílóunum. Þörungabykkni (*Nannochloropsis oculata*) var notað í kerin fram að degi 19 og fóðrað var með hjóldýrum frá 3. degi fram að degi 26 (hámark 140 milljónir á dag per ker), en fóðrun með artemíu hófst á degi 22 (hámark 70 milljónir á dag per ker). Fóðrun með þurrfóðri hófst á degi 22 og á degi 55 voru seiðin komin yfir á þurrfóður. Steinleir var notaður milli d19-43. Bæði kerin fengu neomycin lyfjameðferð á degi 35 (100 g í 2.500 lítra) og annað kerid (E13) fékk Interspectin lyfjaböðun á degi 55 (100 g í 2.500 lítra) vegna erfiðleika.

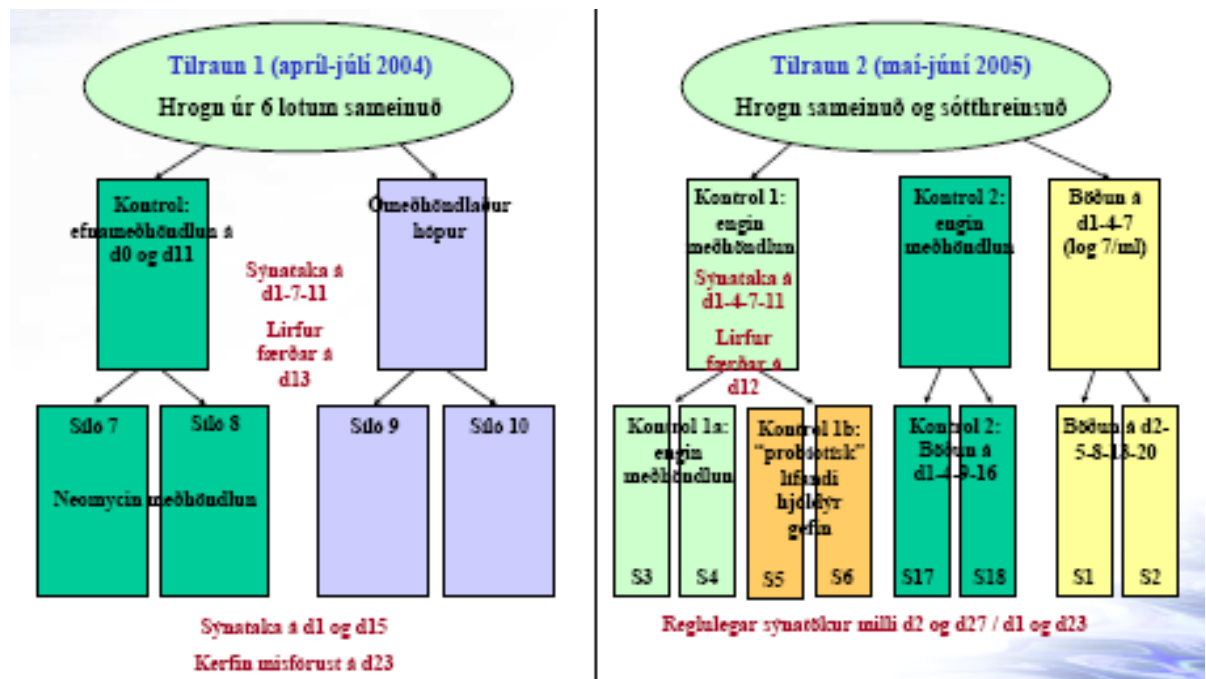
Sýni (n=48 hjá Rf en 21 hjá Keldum) voru tekin reglulega af sjó, hrognum og lirfum (meltingarveginum), ásamt ýmsum eldisþáttum: hjóldýr (fyrir og eftir auðgun, eftir neomycin-meðhöndlun), þörungabykkni, artemía (fyrir og eftir auðgun), steinleir (fyrir og eftir sótthreinsun með virkoni) og þurrfóður (Gemma 0,5). Eftirfarandi hefðbundar örverumælingar voru framkvæmdar: heildarörverutalningar við 15°C, fjöldi presumptive *Pseudomonas* tegunda, *Vibrio* tegunda og mjólkursýrubaktería. Valin sýni voru fryst vegna PCR mælinga (T-RFLP) til að geta metið heildarbakteríuflóru í samanburði við ræktanlegri bakteríuflóru.

Keldur: Alls voru 21 sýni tekin á 6 tímupunktum, sbr. lýsingu hér að framan. Sýni voru flutt

að Keldum í sterílu PBS með 1,5% salti og 0,1% peptóni (PBS-PS), skilin niður og þvegin í PBS-PS. Þá var sýninu skipt í tvennt og annar helmingurinn meðhöndlaður með sótthreinsandi efni í 60 sek. Notað var benzalkonklóríð (0,1%). Tilgangurinn var að losna við bakteríur af yfirborði sýnis. Sýni voru maukuð með því að þrýsta þeim gegnum sótthreinsað stálnet. Þeim var sáð á blóðagar með salti sem allar helstu sjúkdómsvaldandi bakteríur úr þorski vaxa á. Hverju sýni var sáð í 3 þynningum. Ræktað var á blóðagar með salti í 5 daga. Þá var fjöldi bakteríuþyrpinga talinn, helstu bakteríugerðum lýst, hreinstrikað og gerð Gram litun, oxidasa og catalasa próf auk O/129 og API-20 á völdum tegundum. Stofnar sem líktust sjúkdómsvaldandi bakteríum voru einnig prófaðar í kekkjunarprófum með sértækum mótefnum (BioNor). Alls voru 25 hreinræktaðir stofna settir til varðveislu í frystiæti ef frekari rannsóknar yrði þörf síðar. Haustið 2005 greindist sýking með *Yersinia ruckerei* (Yr), sem veldur rauðmunnaveiki, í þorskseiðum á Stað. Þar sem þessi baktería hefur ekki greinst áður í þorskeldi hérlendis (og einungis er til ein heimild erlendis frá) var ákveðið að rækta upp nokkur sýni, og gera kekkjunarpróf með mótefnum gegn Yr.

Vorið 2005 var önnur þorskilraunin framkvæmd og samanburður gerður á eldiskerfum með og án **bakteríumeðhöndlunar** á hrogna- og/eða lirlustigi. Einnig var notkun **probiotískra lifandi hjóldýra** könnuð. **Mynd 1** sýnir tilraunaruppsetninguna. Dagsgömul frjóvguð hrogn voru sótthreinsuð með glúteraldehýði (300 ppm í 5 mín.), skoluð með hreinum sjó og sett í tvö 25 L síló eftir skulun: H5 með 25,4 g af hrognum og H6 með 36,2 g. Rennsli eldisvökvans og hitastigið voru eins og árið 2004. Kontrólhópurinn (H6) fékk enga aðra meðhöndlun á meðan H5-hópurinn var baðaður með bakteríublöndu á dögum 1, 4 og 7. Þá var eldisvökvinn í sílóinu lækkaður í ca 5 L og böðun hrogna (lokabakteríustyrkur um log 6-7 CFU/ml eldisvökvans) stóð í 30 mín án rennslis. Klakið hófst á 11. degi. Á 12. degi voru lirlurnar fluttar í 150 L síló (2 bakteríumeðhöndluð: S1-S2 með 2100 lirlur per síló, og 4 kontról: S3-S4-S5-S6 með 2500 lirlur per síló). Ekkert lyf var notað í lirlusílóin árið 2005. Böðunin (lokabakteríustyrkur um log 6-7 CFU/ml eldisvökvans) í lirlusílóum S1 og S2 var framkvæmd á eftirtöldum dögum: 2-5-8-13-20; rennslið var stoppað í 2 klst á meðan á henni stóð. Frá 3. degi var þörungabykkni notað daglega til að skyggja eldisvökvann (2 x 2 ml per síló) og farið var að fódra með lifandi auðguðum hjóldýrum (2 x 1 milljón per síló á dag). Kontrólsílóin S5 og S6 fengu einungis probiotísk lifandi auðguð hjóldýr.

Ákveðið var að prófa einnig bakteríuböðun á nýklöktum lirfum sem hefðu ekki fengið böðun á hrognastigi. Lirfur (kontról) úr B-hluta verkefnisins voru notaðar og settar á S17-18 (4 daga yngri). Lirfur í sílóum S17 og S18 fengu sambærilega böðun og í sílóum S1 og S2 en á dögum 1-4-9 og 16. Tilrauninni var lokið á 27./23. degi lirfutímabilsins (S1 til S6/S17-S18). Sýni (n=85 hjá Rf) voru tekin reglulega af sjó, hrognum og lirfum (meltingarveginum), ásamt völdum eldisþáttum: hjóldýr (eftir auðgun/neomycin-meðhöndlun/skolun) og þörungabykkni. Sýni til bakteríuræktunar á Keldum voru ekki tekin vorið 2005. Sömu hefðbundnu örverumælingar voru framkvæmdar (sjá lýsingu fyrir tilraun 2004), nema fjöldi presumptive *Pseudomonas* tegunda var ekki metinn þar sem ætíð reyndist ekki nógu sérhæft fyrir eldisbakteríur. Valin sýni voru fryst vegna PCR mælinga (T-RFLP) til að geta metið heildarbakteríuflóru í samanburði við ræktanlegri bakteríuflóru.



Mynd 1. Tilraunarpsetningar við þorskeldi vorin 2004 og 2005. Tilraun 2 tilheyrir einnig verkþáttum 1 og 4 sem er lýst síðar í skýrslunni.

Heðfbundnar örverugreiningaraðferðir voru notaðar til að einangra tiltekna (æskilegar/ óæskilegar) bakteríur (um 450 stofnar árið 2004 og 210 stofnar árið 2005) til frekari rannsókna. Við kortlagningu á örverufræðilegu ástandi þorskeldisins voru einnig notaðar sameindafræðilegar greiningaraðferðir (hlutaraðgreining á 16S rDNA PCR afurðum úr 137 bakteríustofnum frá vorinu 2004 og T-RFLP greining á ca 200 sýnum).

Tilraun 1 (2004)

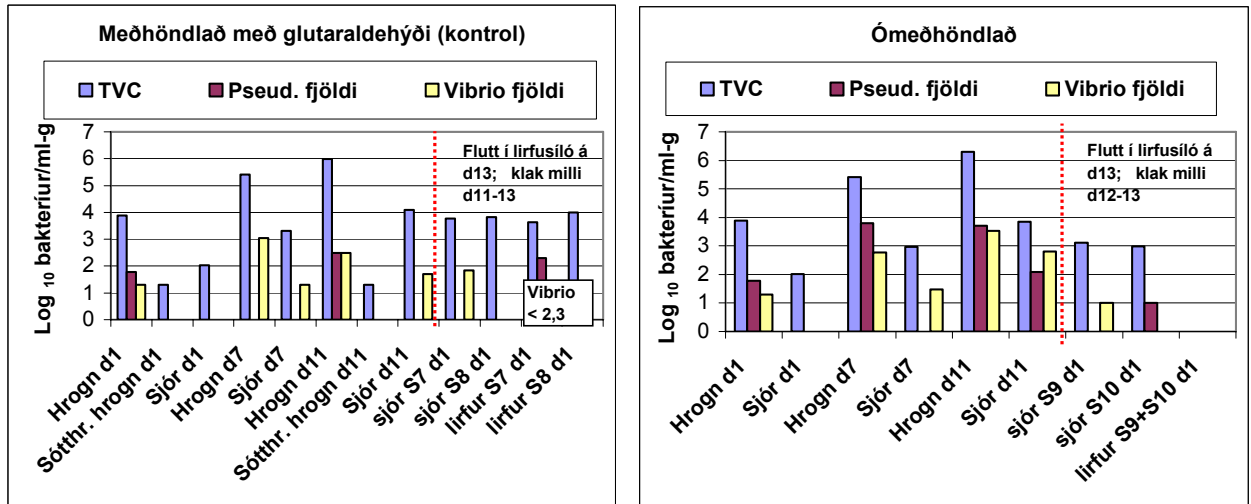
Við kortlagningu á örveruflóru þorskeldisins með hefðbundum aðferðum var heildarörverufjöldinn metinn en einnig voru helstu hópar baktería sem mætti búast við skoðaðir með notkun sérhæfðra æta til að geta metið hlutfall/mikilvægi þeirra á einfaldan hátt. **Mynd 2** sýnir þróun örveruflórunnar í hrognasílóum hvort sem hrognin fengu efnameðhöndlun á d1 og 11 (kontról) eða ekki (ómeðhöndlað til að fá fram óæskilega örveruflóru). Sótthreinsun á hrognum lækkaði heildarörverufjöldann (TVC) nær 1000-falt (3 log einingar) á 1. degi en um 10.000-100.000 falt á 11. degi tímabilsins. Bakteríur festast gjarnan á yfirborð hrogna, en hröð fjölgun átti sér stað fyrstu 7 daga óháð því hvort sótthreinsað var upphaflega eða ekki. Svipaður heildarörverufjöldi mældist í ómeðhöndluðum hrognum (d7-11) og í sjósýnum beggja hópanna. *Vibrio* fjöldinn var a.m.k. um 100-falt lægri en TVC, hvort sem hann var metinn í hrognum eða sjósýnum, en á 11. degi var hann hærri í ómeðhöndluðum hrognum og umhverfinu (sjó).

Talningarætið (modified CFC medium samkvæmt Stanbridge og Board, 1994) sem var notað til að meta fjölda *Pseudomonas* tegunda reyndist ekki vera nógu sérhæft fyrir örverusamfélagið sem er að finna í þorskeldi. Við nánari greiningu á einangruðum kólóníum kom í ljós að sumar þeirra voru gerjandi, eiginleiki sem finnst ekki hjá *Pseudomonas* tegundum. Þess vegna var ekki hægt að notafæra sér talningar úr þessum mælingum.

Einangraðar bakteríur úr hrognasýnunum (á dögum 1-7-11) uxu illa og margar drápuð snemma í greiningarferlinu, en út frá útliti kólónía var munur á samsetningu örveruflórunnar milli hópanna. *Pseudoalteromonas* tegundir fundust í upphafi og síðar í ferlinu hjá ómeðhöndluðum sýnum (hrognum og sjó), sem *Marinomonas* tegundir gerðu einnig í báðum hópum. En þetta verður að staðfesta með T-RFLP greiningu.

Heildarfjöldi örvera (TVC) og *Vibrio* tegunda í eldisvökvanum var svipaður (tæplega log 4/ml) fyrir og eftir flutning lirfanna í kontról hópnum en aðeins lægri eftir flutning þeirra sem fengu enga meðhöndlun. Eftir klakið tekur það yfirleitt 3 daga áður en þorsklirfan opnar munninn og þess vegna er það eðlilegt að finna fáar sem engar bakteríur í meltingarveginum á þessum tíma. Þar sem kontról-hrognin byrjuðu aðeins fyrir að

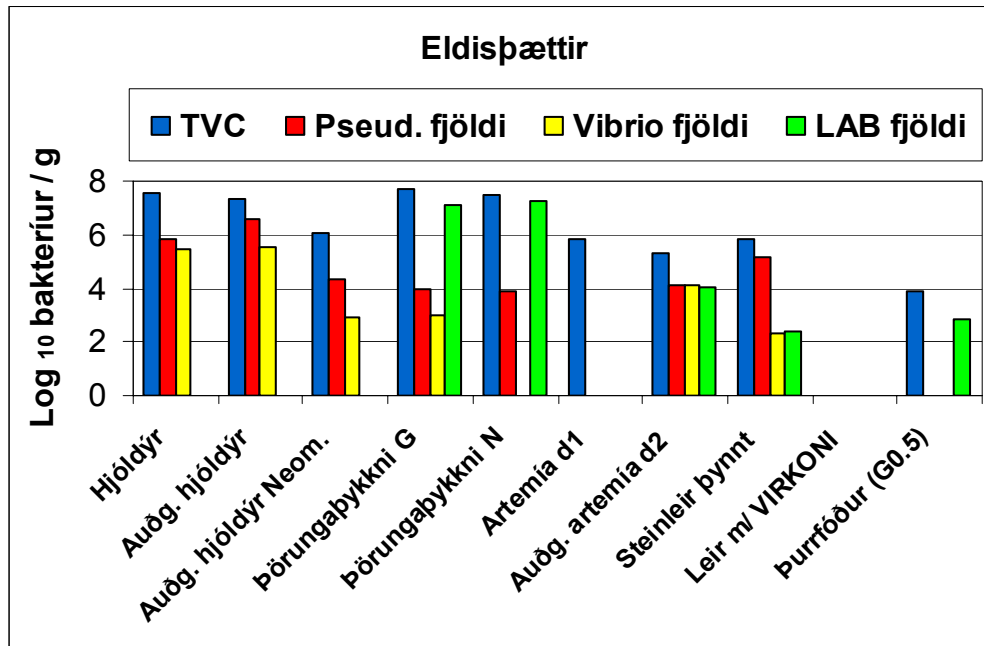
klekjast en ómeðhöndluðu hrognin, var meltingarvegur kontról-lirfanna nú þegar með bakteríur á 1. degi eftir flutninginn, eins og sést á mynd 2, þ.e. með svipaðan fjölda og í eldisumhverfinu. Ómeðhöndluðu lirfurnar voru aftur á móti ekki farnar að opna munninn því engar bakteríur fundust í þeim.



Mynd 2. Örverumælingar á hrognastigi í ómeðhöndluðu (hægri) og efnameðhöndluðu kerfi (vinnstri) og eftir flutning í lirfusílóin (S7 til S10)

Mynd 3 sýnir niðurstöður örverumælinganna í mismunandi eldisþáttum. Ræktun hjóldýra leiddi til mikils magns örvera en auðgun hjóldýra virðist hafa haft lítil viðbótaráhrif á örveruflórana. Neomycin var notað til að lækka örverufjöldann eftir auðgunina, en hann féll um tæplega 2 log/g og meðferðin hafði þannig væg “örverudrepani” áhrif hjá *Vibrio* tegundum. Fjöldi mjólkursýrubaktería (LAB) var ekki metinn í þessum hjóldýrasýnum. Hins vegar voru þörungabykknasýnin ríkjandi í mjólkursýrubakteríum, þar sem fjöldi þeirra var næstum því jafn hár og TVC. Merkingar “G” og “N” tákna “gömul” (átappað ílát í notkun) og “ný” (ónotuð) og mælingar sýndu að *Vibrio* mengun hafði borist í ílátið með þörungabykkni sem hafði verið í notkun. Örverufjöldinn í dagsgamalli artemíu var um log 6/g en *Vibrio* og LAB fjöldi var minni en log 2/g. Eftir 24-klst auðgun og skolun (10 mín.) artemíanna varð heildarfjöldinn aðeins lægri (log 5,3/g) en *Vibrio* og LAB fjöldi mældist um log 4/g. Steinleir er notaður til að skyggja eldisvökvann og eftir sóttreinsun með virkoni var örverufjöldinn ómælanlegur (< 1,3 log/g) í því. Fjöldi

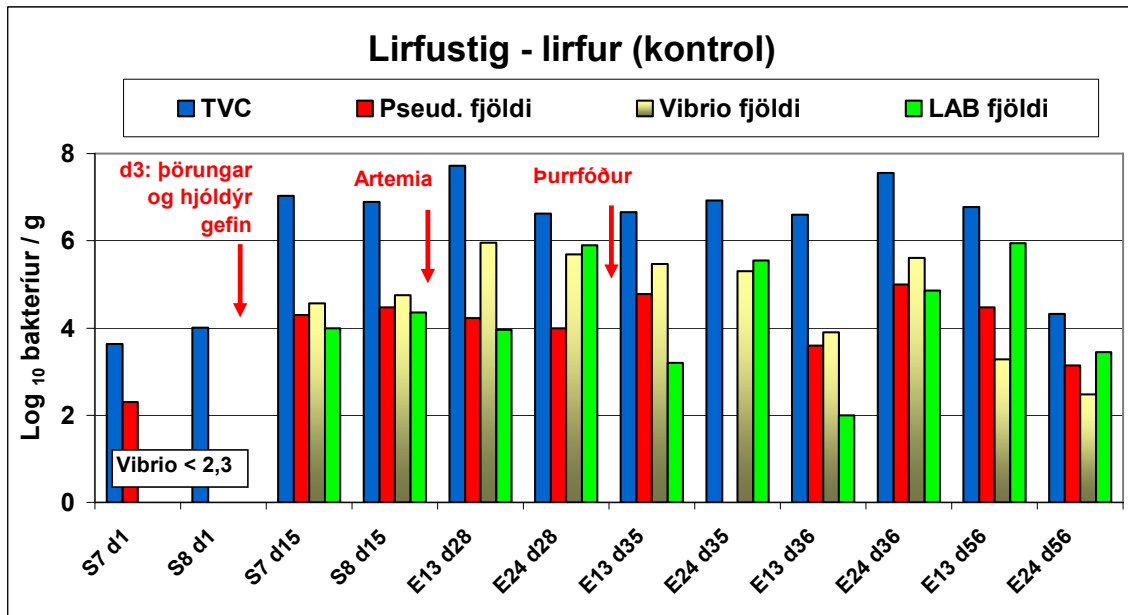
örvera í þurrfóðri (Gemma 0,5 frá Nutreco) var um log 4/g, með örveruflóru ríkjandi í Gram-jákvæðum bakteríum og um 20% mjólkursýrubakteríum.



Mynd 3. Örverumælingar í mismunandi eldispáttum

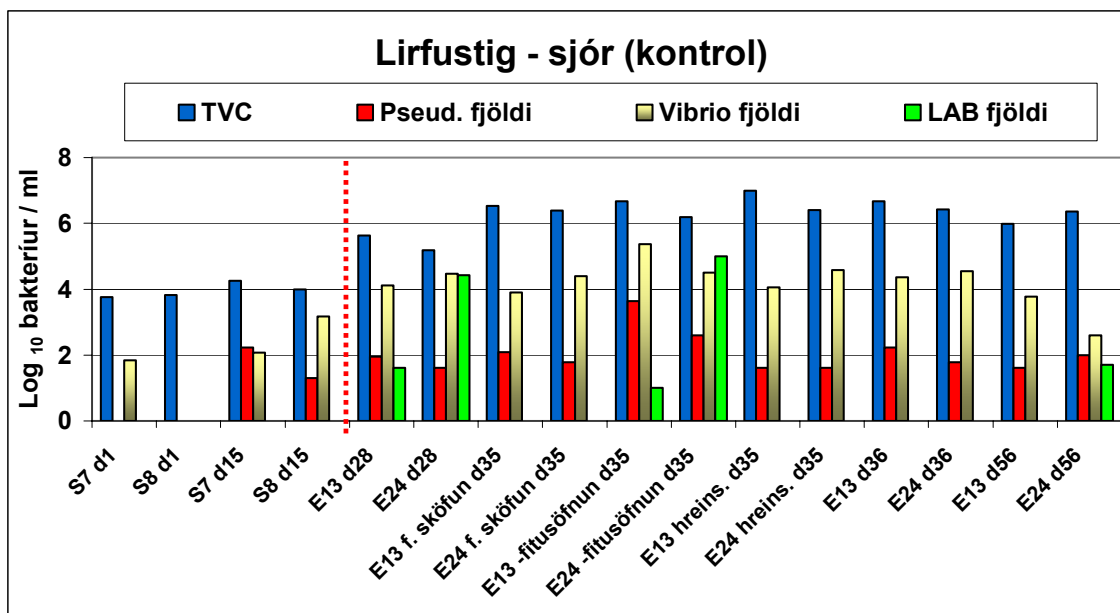
Mynd 4 sýnir hvernig örverufjöldinn jókst (aukning um 3 log/g á d15) í meltingarvegi kontról-lirfanna eftir að þörungargjöf og fóðrun með lifandi hjóldýrum hafði staðið í 12 daga. Fjöldi *Vibrio* tegunda og mjólkursýrubaktería (LAB) var rúmlega log 4/g. Örveruflóra lirfanna í kontról-hópunum var fjölbreytt á 15. degi, til að mynda fundust *Arthrobacter*, *Vibrio*, *Serratia* og *Microbacterium* tegundir. Þessar sömu tegundir var að finna eftir þurrfóðrun á d28, en þá komu einnig fram *Pseudoalteromonas* tegundir. Aðrir tegundir (*Enterococcus* og *Streptococcus* tegundir), sem fundust í þörungabykkni eða þurrfóðri, voru einnig til staðar í lirfunum. Eftir að artemíugjöfin var hafin jókst *Vibrio* fjöldinn sérstaklega (aukning um 1-2 log á d28), en fóðrun með þurrfóðri leiddi til lítillar lækkunar (d35). Vegna erfiðleika í kerri E13 þurfti að gefa lyfjameðferð til að tryggja lifun lirfanna. Við mælingar næsta dag kom í ljós að þessi meðferð hafði ekki augsjáanleg áhrif á heildarörverufjölda lirfanna (E13 d36) en *Vibrio* og LAB fjöldi þeirra lækkaði um 1-2 log /g. Athyglisvert er að benda á að lirfur E24 voru með háan LAB fjölda á d28-35-36, en ekki við síðastu sýnatöku á d56. Samt sem áður urðu lirfur E24 þyngrir (blautvigt d56 = 0,5 g) við hverja sýnatöku í samanburði við lirfur úr E13

(blautvigt d56 = 0,3 g) sem þurftu lyfjameðferð seint í ferlinum. Lækkun LAB fjölda á d56 gæti tengst hreinsunaraðferð sem var framkvæmd til að sótthreinsa utanliggjandi örverur á lirfunum, en of mikil sótthreinsun getur leitt til lækkunar á örverufjölda í ytri hluta meltingarvegsins. En eins og sést hjá lirfunum E24 á d56 voru allar talningarnar miklu lægri (um 2-3 log) en mátti búast.



Mynd 4. Örverumælingar á lirfum í meðhöndluðum kerfum (S7 og S8 = 150 L tilraunasló; E13 og E24 = stór ker)

Mynd 5 sýnir hvernig örverusamsetning eldisvökvans breyttist með tilkomu ytri eldisþátta. *Vibrio* fjöldinn í sjó jókst (um 1 log) eftir að fóðrun með lifandi hjóldýrum var hafin (d15) og enn frekar með artemíugjöf (d28, um log 4/ml). Á 28. degi var fjöldi mjólkursýrubaktería mælanlegur í eldisvökvanum þar sem þörungagjöf átti sér stað fyrir sýnatökuna. Frá 35. degi varð heildarörverufjöldinn nokkuð stöðugur, þ.e. rúmlega log 6/ml en *Vibrio* fjöldinn um 2 log lægri. Á þessum sýnatökudegi var kannað hvort hreinsunin í kerum hafði áhrif á hreinleika (“gæði”) eldisvökvans. Sjósýni voru tekin fyrir sköfun botnsins, á fitusöfnunarsvæðunum á yfirborði eldisvökvans og eftir hreinsun. Enginn áberandi munur fannst, en *Vibrio* og LAB fjöldinn var hærri þar sem fitusöfnunin átti sér stað. Neomycin meðferð í kerum E13 og E24 á d35 leiddi ekki til sjáanlegra breytinga í eldisvökvanum á d36, samkvæmt mælingunum sem voru gerðar.



Mynd 5. Örverumælingar á eldisvökva (sjó) í meðhöndluðu kerfi

Mælingar á sjúkdómsvaldandi bakteríum hjá Keldum – vorið 2004

Sjúkdómsvaldandi bakteríur fundust ekki í þessum sýnum. Nú er verið að rækta upp nokkra stofna úr safninu frá þessum tíma þar sem *Yersenia ruckeri* greindist á Stað haustið 2005 og grunur vaknaði um að hún kynni að hafa verið þar áður. Þessi sýni verða sett í kekkjunarpróf á næstunni og greint frá niðurstöðum í næstu skýrslu.

Sextán stofnar voru settir í O-129 greiningu. Af þeim voru 3 (nr. 16 (lirfur 16dph), 21 og 22 (leir)) sem sýndu algebra hindrun sem bendir til *Vibrio* eða *Photobacterium* tegunda. Þeir höfðu auk þess blóðrofsvirkni en kekkjuðu ekki mótefni gegn *Vibrio anguillarum/Listonella anguillarum*. Af 10 stofnum sem fóru í API-20 greiningu voru einungis 2 sem sýndu svörun í fleiri en 2 prófum svo ljóst er að þessi greiningaraðferð hentar illa til skoðunar á þeim stofnum sem hér ræktuðust.

Glutaraldehyð er notað á Stað til að sótthreinsa hrogn. Við ræktun komu fram nokkrar bakteríur á yfirborði óbaðaðra hrogna, en ekkert óx úr hrognum sem böðuð voru í glutaraldehyði. Í sýnum, sem voru tekin við upphaf klaks á baðaða hópnum var mjög lítil vöxtur, meðan mikill vöxtur var úr sambærilegu sýni úr óbaðaða hópnum.

Áhrif benzalkonklóríðs voru mismunandi eftir uppruna sýnanna. Ræktanlegar bakteríur hurfu úr lirfusýnum teknum 4, 17 og 31 dögum eftir klak en ekki úr sýnum teknum 38 dögum eftir klak. Álykta má að í fyrri 3 skiptin hafi áhrif benzalkonklóríð náð inn í meltingarveg en ekki á degi 38. Benzalkonklóríð hafði hins vegar ekki sjáanleg áhrif á ræktanir baktería úr hjóldýrum, artemíu, þörungum og fituflekkjum í kerum. Samsetning bakteríuflóru í lirfunum var því ólík því sem gerist í fæðudýrum, þörungum og fituflekkjum á eldiskerum.

Tilraun 2 (2005)

Myndir 6 til 9 sýna hvernig örveruflóran þróaðist í þeim 4 hópum (8 sílóum) sem voru skoðaðir vorið 2005. Þessi tilraun var framkvæmd í tveimur hrognasílóum (H5-6) og átta lirfusílóum (S1-6 og S17-18). Tilraunin var styttri en árið á undan (12 dagar fyrir klak og 23-27 dagar eftir klak) og þess vegna voru artemía og þurrfóður ekki notuð. Notkun lyfja í lirfusílóum var hætt og þess í stað var þetta náttúrulega umhverfi (H6 fært í S3 & S4) borið saman við “probiotic” meðhöndlun á mismunandi stigum: fyrir og eftir klak (H5 fært í S1 & S2), eingöngu eftir klak (S17 & S18) eða með notkun próbíótískra lifandi hjóldýra (H6 fært í S5 & S6). Þessi tilraun var einnig hluti af verkþætti 4. Afkoma hrogna var 57,7% hjá kontrol-sílóinu (H6) en 60,3% í sílóinu sem fékk böðunarmeðferð með bætibakteríum (H5).

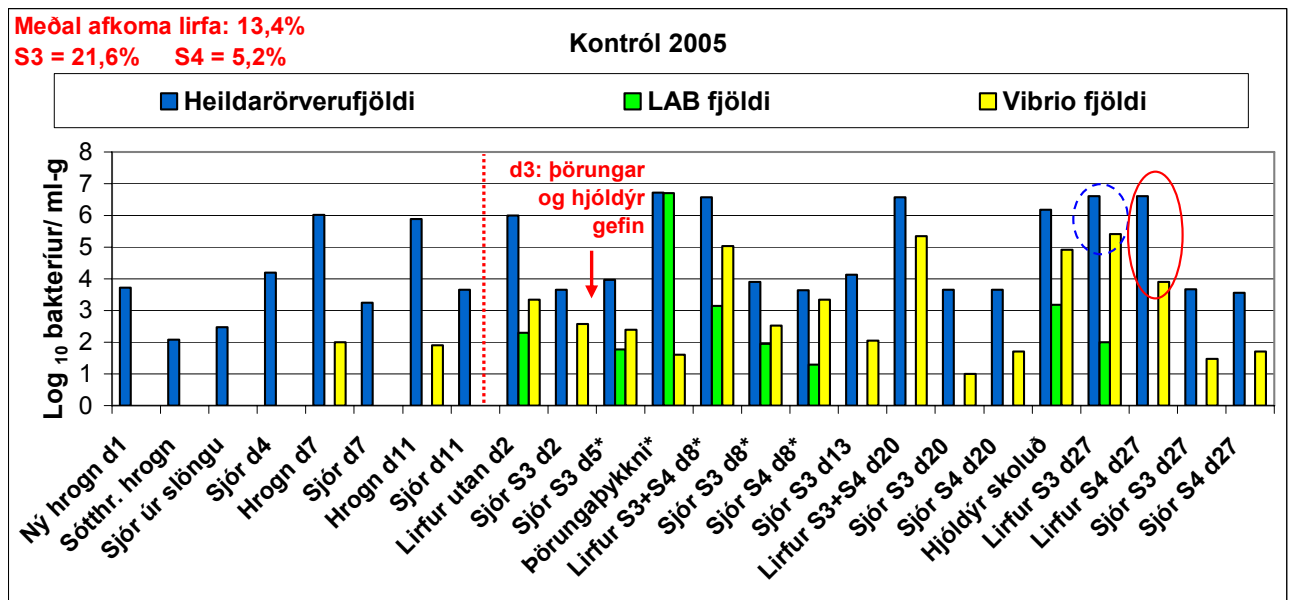
Tafla 1. Afkomutölur (%) í lirfusílóum sem fengu mismunandi meðferð

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S17	S18
	baðað f/e	baðað f/e	kontrol	kontrol	pro-fæða	pro-fæða	baðað e	baðað e
Upphafsfjöldi	2100	2100	2500	2500	2500	2500	2500	2500
Teknar lirfur f. 21/6 *	232	103	169	105	196	58	51	134
Alls lifandi (með *)	885	233	541	130	202	62	71	349
Afkoma (%)	42,1%	11,1%	21,6%	5,2%	8,1%	2,5%	2,8%	14,0%
Leiðrétt afkoma (%)	35,0%	6,5%	16,0%	1,0%	0,3%	0,2%	0,8%	9,1%

Leiðrétt afkoma er miðuð við að upphafstalan er lægri vegna lirfusýnatöku fyrstu 3 vikur tilraunarinnar.

Tafla 1 gefur afkomutölurnar fyrir alla lirfuhópanna. Þegar meðalafkoma lirfa (27 daga) er skoðuð kemur í ljós af hún var um **15% í kontrol-hópnum** en **34% í hópnum sem var meðhöndlaður með bætibakteríum fyrir og eftir klak**, og miklu lægri í hópnum sem fékk eingöngu meðhöndlun eftir klak (6,2%) og verst við notkun próbíótískra lifandi hjóldýra (5,7%). Reyndar var mikill munur innan hópanna sem gerir að vissu leyti túlkun

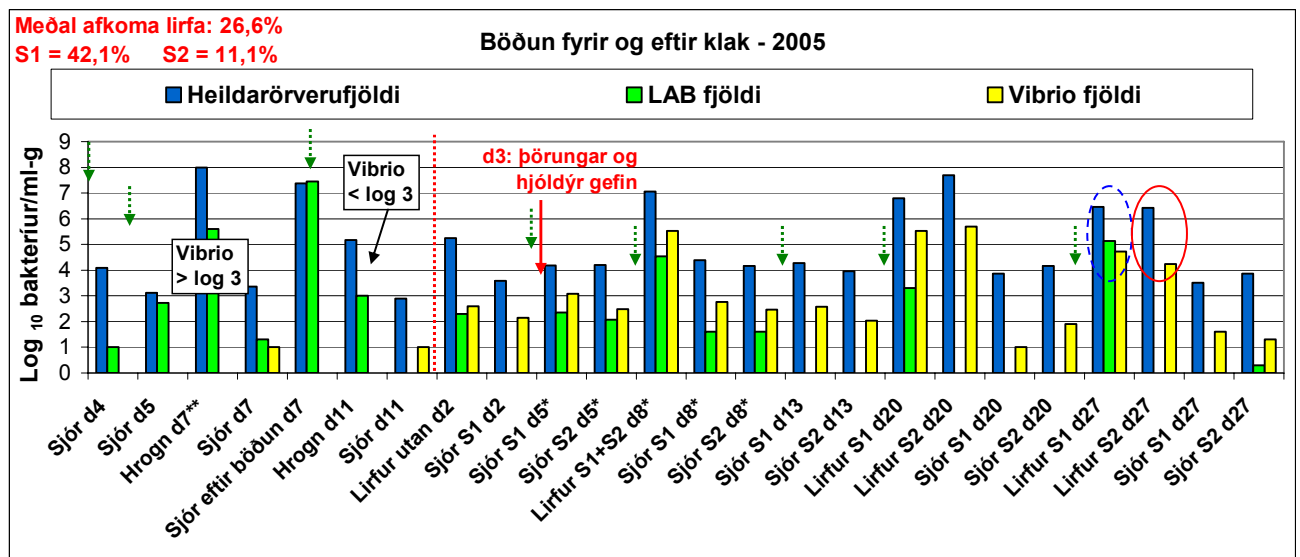
niðurstaðna erfiðari. Þessi velgengni endurspegladist einnig í vaxtartölunum, þ.e. eingöngu í þyngdarmælingunni (þurrkaðar lirfur): $656 \pm 41 \mu\text{g}$ (S1), $562 \pm 30 \mu\text{g}$ (S2), $550 \pm 17 \mu\text{g}$ (S3). Þyngd S1 lirfanna var marktækt hærri en hjá S2 ($p = 0,021$) og S3 ($p = 0,001$) lirfunum. Aftur á móti var enginn marktækur munur ($p > 0,05$) hvað lengdina varðar: $9,29 \pm 0,95 \text{ mm}$ (S1), $9,05 \pm 0,68 \text{ mm}$ (S2), $9,24 \pm 0,42 \text{ mm}$ (S3). Vegna of fárra lirfa í sílóum S4-5-6 á 27. degi var ekki hægt að meta lengd og þyngd í þeim hópum. Ekki voru sílóin 17 og 18 samanburðarhæf þar sem lirfurnar voru 4 dögum yngri (S18: $8,04 \pm 1,09 \text{ mm}$ og $424 \pm 91 \mu\text{g}$). Afkoma í sambærilegum kontról-hópunum (S27 og S28 á degi 23 úr B-hlutanum undir verkþætti 4) var 4,5% og 0%. Þetta sýnir að böðunin með bætibakteríum eingöngu eftir klak hafði einnig jákvæð áhrif.



Mynd 6. Örverumælingar í kontról-hópum á hrogn- og lirfustigi (S3 og S4)

Örverumælingarnar (**mynd 6**) sýna að sóttreinsun á hrognum lækkaði heildarörverufjölda eins og getið var við tilraunina árið 2004, og hröð fjölgun átti sér stað milli daganna 1 til 7 en síðan var nokkuð stöðugur fjöldi eftir það. Þetta átti líka við um þróun *Vibrio* tegunda. Heildarörverufjöldi í sjó var einnig stöðugur, en *Vibrio* fjöldi var alltaf 1-2 log lægri. Heildarörverufjöldi í lirfunum breyttist lítið milli daganna 8 og 27. Ekki var hægt að tengja góða afkomu í síló S3 við örverufjöldann, eins og samanburður á sílóum S3 og S4 sýnir. Samsetning örvera er líklega lykilatriði hér og frekari greiningar (16S

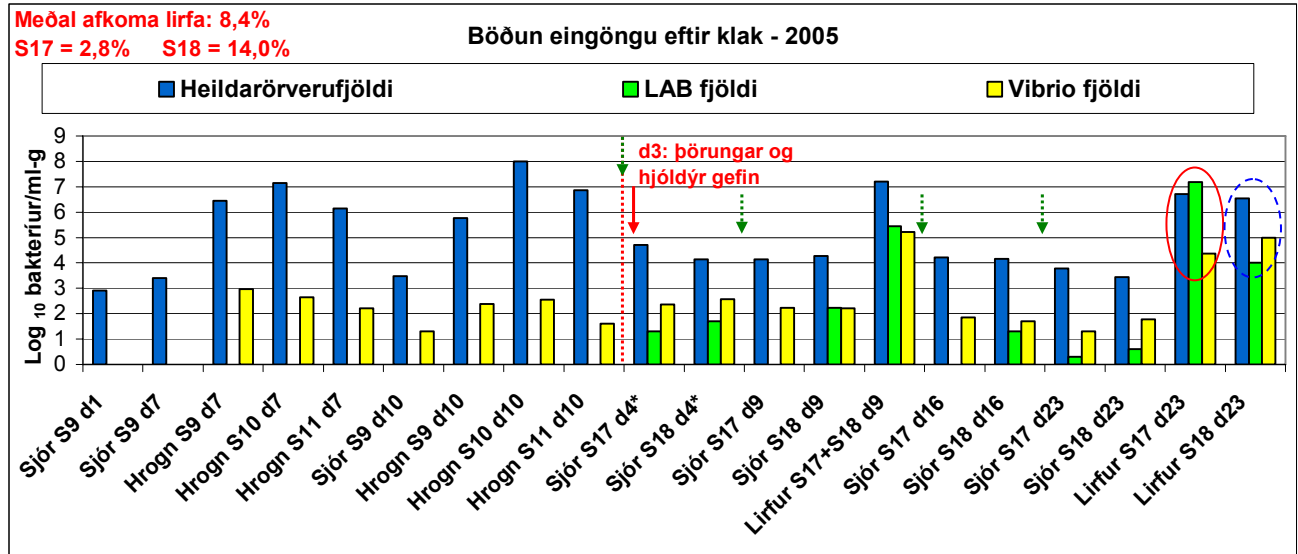
rDNA hlutaraðgreining og T-RFLP) munu leiða það í ljós. **Mynd 7** sýnir þróun örveruflórunnar hjá böðuðu hópnum. Böðun á hrognastigi átti sér stað á d1, 4 og 7, og líklega voru viðbættar bakteríurnar (LAB) til staðar í eldisvökvanum á dögnum 4, 5 og 7 (frekari greiningar til staðfestingar) en ekki á 11. degi þar sem 4 dagar voru liðnir frá böðuninni. Aftur á móti var LAB fjöldi vel mælanlegur á hrognum og lítið af *Vibrio* tegundum ($< \log 3/g$) á d11. Böðun á lirfustigi var á d2, 5, 8, 13 og 20. Heildarörverufjöldinn var lægri í böðuðum lirfum ($\log 5,2/g$) á dögnum 8 til 22 en í kontról-lirfunum ($\log 5,9/g$; **mynd 6**). Afkoman í S1 og S2 sílóum samræmdist ekki heldur heildarfjöldi örvera né *Vibrio* tegundanna, en ekki mældust mjólkursýrubakteríur í sílóinu sem gekk verr (S2).



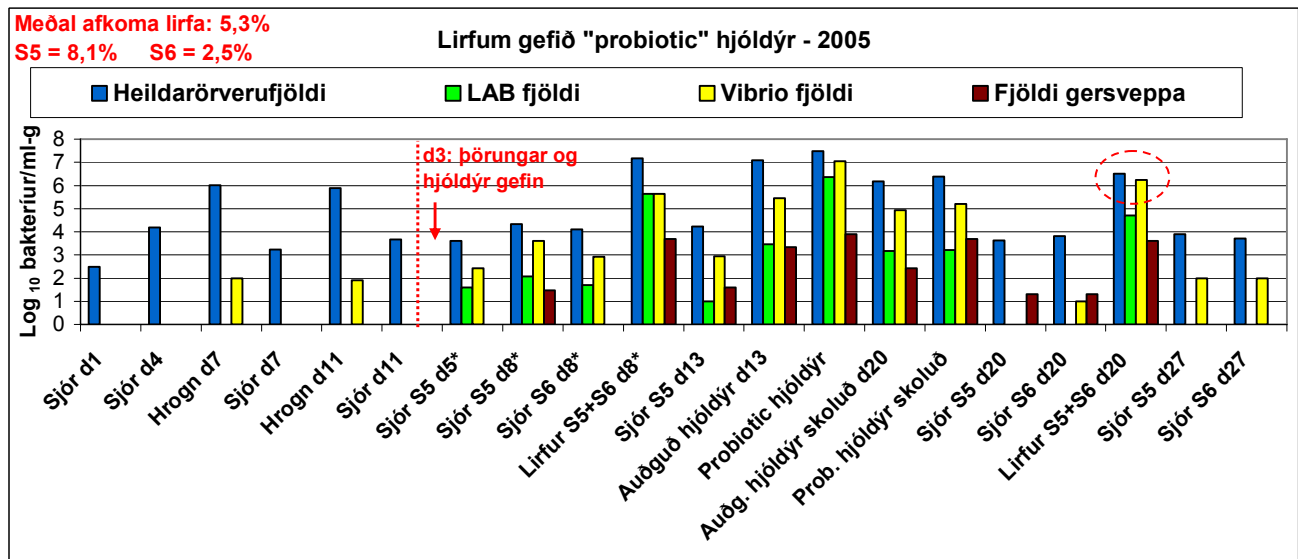
Mynd 7. Örverumælingar í böðuðum hópnum á hrogn- og lirfustigi (S1 og S2). Græn ör sýnir böðunardagana (hrognastig: d1-4-7; lirfustig: d2-5-8-13-20).

Mynd 8 sýnir tilraun með hrognum af öðrum uppruna en hjá öllum hinum hópnum. Böðun á lirfustigi átti sér stað frá klaki á d1, 4, 9 og 16. Mjólkursýrubakteríur fundust í eldisvökvanum á dögnum 9, 16 og 23 (S18). Heildarörverufjöldi í lirfunum breyttist lítið milli daganna 9 og 23 en breytilegt magn af mjólkursýrubakteríum mældist. Eins og áður er nefnt var afkoman ekki í samræmi við örverumælinganna. **Mynd 9** sýnir örveruþróun hjá hópnum sem fengu próbiotísk lifandi hjóldýr með 2 tegundir af mjólkursýrubakteríum og gersveppinn Levucell. Þessar lirfur voru af sama uppruna og

þær sem fóru í kontról-hópana. Heildarfjöldi örvera og *Vibrio* tegunda var þó hærri en það sem mældist í kontról-lirfunum (**mynd 6**). Líklegust skýring er þróun óæskilegrar örveruflóru í probiotískum lifandi hjóldýrum. Þetta á eftir að staðfesta með nánari greiningum. Örverufjöldi þessara hjóldýra og lirfa einkennist af háum *Vibrio* fjölda.



Mynd 8. Örverumælingar í böðuðum hópum á lirlustigi (S17 og S18). Græn ör sýnir böðunardagana (d2-4-9-16).



Mynd 9. Örverumælingar í probiotic-hópum (S5 og S6) sem fengu lifandi auðguð hjóldýr meðhöndluð með "probiotic" örverum

Verkþáttur 1: Mat á lífrænu/ólífrænu efnaálagi

Upphaf: 1. mán. **Lok:** 12. mán. → *framlengt til feb. 2006*

Markmið: að kanna efnaálagið við þorsk- og lúðueldi, m.t.t. ólífrænna efna sérstaklega á þeim tímapiðum sem mikil afföll verða, og samhliða sýnatökum vegna örverumælinga.

Afrakstur: Öflun gagna til mats á ólífrænu efnaálagi í lúðu- og þorskeldi og skilgreiningar á þáttum sem hafa áhrif á afkomu og þroska lirfa.

Staða/breytingar: Vegna erfiðleika við fyrstu þorsktílaun vorið 2004 var ákveðið að safna fleiri sýnum við tílaunina vorið 2005 til þess að gera gagnasöfnunina öflugri og víðtækari.

Sýnataka við lúðueldi (2004): Starfsfólk Fiskeyjar ehf safnaði sýnum í sérmeðhöndluð og merkt ílát samkvæmt eftirfarandi töflu. Á hrognastigi (13-14 dagar) voru 3 ker skoðuð (**K1-2-3**), en á kviðpokastigi voru sýnin tekin úr 1 síló (**Kontról**) auk þess var 1 síló með **endurnýtingarkerfi** metið í lok tímabilsins. Á startfóðrunartímabili voru 3 ker skoðuð: 2 kontról (K1-2) og 1 með **endurnýtingarkerfi**, en það misfórst seint á tímabilinu. Málmar voru mældir í artemíu og lirlfum til að meta uppsöfnun á fyrsta stigi, auk þess sem seiðin og þurrfóður voru rannsökuð eftir 2. mánaða þurrfóðrun.

Tímabil	Syni	Dagar	þurrefni	NH3	NO2-	H2S	málmar	TOP	TN	COD	O/F	redox
H	ósiður sjór	0		x	x	x	x	x	x			x
R	siður sjór	0		x	x	x	x	x	x			x
O	sjór-K1 (12-3)	9		x	x	x	x	x	x			x
G	sjór-K2 (13-3)	9		x	x	x	x	x	x			x
N	sjór-K3 (14-3)	9		x	x	x	x	x	x			x
A	sjór-K1 (12-3)	13		x	x	x	x	x	x			x
K	sjór-K2 (13-3)	13		x	x	x	x	x	x			x
E	sjór-K3 (14-3)	13		x	x	x	x	x	x			x
R												
L	ferskvatn	24					x	x	x			x
I	sjór-K (S10)	24		x	x	x		x	x			
R	lirlfur-Endurn.	51	vantar				x					
F	sjór-End.(S6)	51		x	x	x		x	x			x
U	lirlfur-K (S10)	51	vantar				x					
S	sjór-K (S10)	51		x	x	x		x	x			x
S	auðguð artemía	15		x			x	x				x
S	sjór-K1 (S21)	15		x	x	x		x	x			
T	sjór-End. (S1)	29		x	x	x		x	x	x	x	
A	sjór-K2 (S20)	35		x	x	x		x	x	x	x	
R	sjór-K1	31		x	x	x		x	x			
T	sjór-Endurn.	45		x	x	x		x	x			
K	sjór-K2	51		x	x	x		x	x			
E	sjór-K1	45		x	x	x		x	x			
R	lirlfur-K1	45	x				x					
	sjór-K2	65		x	x	x		x	x	x	x	
	lirlfur-K2	65	x				x					
	sjór-K1	62		x	x	x		x	x	x	x	
	lirlfur-K1	62	x				x					
W	alls ca:	130d										
E												
A	þurrfóður			x			x	x				
N	seiði 1	5,5-6 m		x			x					
I	seiði 2	5,5-6 m		x			x					
N												
G												

Eftirfarandi mælingar voru gerðar í eldisvökvanum: **ólífræn efni** sem hafa eiturverkan á lífverur, þ.e. ammóníak (NH₃), nítrít (NO₂⁻), vetnissúlfíð (H₂S) og málmar (Fe, Zn, Cu, Al), og **lífræn efni**: TOP (total phosphorus), TN (heildar köfnunarefni), fíta (O/F) og COD (chemical oxygen demand) og Einnig var oxunargeta mæld (redox). Alls voru 149 sýni rannsökuð.

Sýnatökur við þorskelldi (2004 og 2005): Sýnunum var safnað vorin 2004 og 2005 í sérmeðhöndluðum og merktum ílátum samkvæmt eftirfarandi töflu. Á hrognastigi (12-13 dagar) voru sjósýni tekin ú 2 sílóum, en á lirlustigi voru þau tekin ú ýmsum sílóum og stærri kerum fyrstu 30-60 daga eftir klak.

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

Málmar voru mældir í þörungabykkni, hjóldýrum, artemíu, þurrfóðri og seiðum til að meta uppsöfnun á fyrstu stigi. Sömu efnamælingar voru framkvæmdar eins og ofangreint, og sýnataka fór fram samhliða örverusýnatökunni sem er lýst í fyrri verkþættinum. Svifagnir í sjósýnum á lirlustigi voru einnig mældar vorið 2005. Alls voru 172 sýni rannsökuð, en niðurstöður sumra mælinga eru ókomnar og því heildar úrvinnsla ekki lokið. Fjallað verður um útkomuna í næstu skýrslu.

Mat á efnafræðilegu ástandi eldisins er mikilvægt því það mun leiða í ljós hvaða þættir skipta máli og hvað ber að forðast til að fyrirbyggja óásættanlega efnamengun í eldi. Mælingar við laxeldi á Íslandi hafa sýnt fram á mikilvægi eftirfarandi þátta: efnaálags vegna lífrænna efna í vatninu (svifagnir, uppleyst og agnabundið: COD, TN, TOP, olía og fita) og efna sem sannarlega hafa eitruverkan á lífverur (t.d. nítrít, vetnissúlfíð og uppleyst og agnabundið form málma og ammóníaks) (Auðunsson, 2002). Þeir málmar sem sérstaklega þarf að fylgjast með eru ál, járn, sink og kopar, en reynslan sýnir t.d. að

minnsta hækkun í kopar getur haft mjög afdrifarík áhrif á vöxt og lifun lúðu (óbirtar niðurstöður, G.A. Auðunsson). Samkvæmt Timmons o.fl (2002) eru viðmiðunargildi fyrir vatn í eldiskerfum eftirfarandi: **< 0,01 ppm (ál), < 0,15 ppm (járn), < 0,005 ppm (sink) og 0,03 ppm (kopar)**, miðað við alkalískt vatn, þ.e. > 100 mg/L). Eituráhrif þessara málma eru talin vera minni með meiri vatnshörku (Howarth & Sprague, 1978). Handy (2003) gerði grein fyrir að 0,01-0,15 ppm kopar í eldisvökvanum (mjúkt vatn) hafði mjög mikil eituráhrif á fiska.

Lífrænt álag er hættulegt þar sem það getur ýtt undir vöxt örvera. Óæskilegar tegundir geta því náð miklum fjölda á stuttum tíma og valdið skyndilegum og víðtækum afföllum á lirfum/seiðum. Einnig er uppsöfnun köfnunarefnasambanda (þ.e. **ammóníak og nítrít**) í eldiskerfum óæskileg vegna eituráhrifa þeirra á fiskinn. Niðurbrot köfnunarefnasambanda (aðallega prótein og kjarnasýrur) leiðir til myndunar á afoxuðum N-efnasamböndum, aðallega ammóníaki (NH_3) (Heales, 1985; Hopkins o.fl., 1993). Sjávardýr skilja ammóníak út í eldisvökvann aðallega í gegnum tálknin, roð og nýru sem leysist upp í eldisvökvanum (Spotte, 1979). Auk þessarar uppsprettu ammóníaks getur það flætt frá setlögum vegna ýmissa efnahvarfa. Í tilbúnu eldiskerfi vantar það ferli sem sér um að fjarlægja ammóníak í náttúrulegu kerfi og NH_3 getur safnast fyrir, en í endurnýjanlegu kerfi sjá ákveðnar bakteríur um að oxa NH_3 og mynda þannig nítrít sem áfram oxast í nítrat (nitrification). Þetta ferli tryggir minni hættu á eiturverkun vegna þess að flest vatna- og sjávardýr eru næm fyrir **eituráhrifum NH_3 og nítríts (> 1 ppm)** en þola meira magn nítrats (upp í 500 ppm) (Moe, 1993). Ýmis önnur viðmiðunarmörk hafa verið sett fram eins og neðangreindar heimildir sýna. Barnabè (1994) setti fram mörk þar sem enginn skaði fannst af völdum ammóníaks fyrir sjávarfiska frá 0 – 0,05 ppm, **en gildi hærra en 0,10 ppm var talið vera skaðlegt en var háð fisktegundum**. Alderson (1979) gerði grein fyrir hámarksmagni NH_3 (0,1 ppm við pH 7,9) sem hafði engin skaðleg áhrif fyrir sandhverfu. Einnig hefur verið mælt með að halda NH_3 gildi lægra en 0,1 ppm í tilapiueldi (20 g fiska) (El-Shafai o.fl., 2004).

Ýmsir þættir hafa áhrif á ferli köfnunarefnasambanda eins og t.d. fôður, fôðrunarmynstur, vatnsrennsli/skipti, dýpt eldiskerfisins og loftun ásamt öðrum stjórnunarháttum. Nítrít, sem er millistigsmyndunarefni í “nitrification” og “denitrification” ferlum, getur einnig safnast fyrir. Fáar bakteríutegundir geta oxað $\text{NH}_3 \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ á meðan fleiri tegundir geta tekið þátt í “denitrification”, sem er afoxunarferli nítrats ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow$

$\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$), m.a. *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Alcaligenes* tegundir (Focht & Verstraete, 1977). Nítrít hefur eituráhrif vegna þess að það bindst við hemoglobin í blóði sjávardýra sem veldur súrefnisþurrð í blóðinu. Styrkleikur Cl^- í eldisvökvanum er m.a. talinn vera mikilvægur þáttur í hversu skaðlegt nítrít getur verið (Svobodova o.fl., 2005). Umbreyting NH_3 yfir í nítrat er háð ýmsum þáttum, m.a. efnisstyrk, styrk uppleysts súrefnis, hitastigi, sýrustigi og fjölda virkra (nitrifying) baktería (Hargreaves, 1998). Hátt sýrustig eldisvökvans ($\text{pH} > 8,5$) vegna hás ammóníaksstyrks (0,1-1 ppm) hindrar oxun nítríts (Belser, 1979) og þannig getur nítrít safnast fyrir.

Hægt er að fylgjast með “denitrification” ferlinu í eldisvökvanum með mælingum á oxunargetu (redox potential, ORP). Lækkunin á ORP á sér stað í skrefum í afoxunarferli nítrats í N_2 . Samkvæmt Sillén (1965) mælist ORP um -200 mV þegar allt nítratið hefur verið afoxað í nítrít, en -325 mV ef N_2 hefur myndast að fullu. Afoxun sulfats í sulfíð gefur ORP undir -350 mV. En sulfíð eða H_2S hefur einnig mikil eituráhrif á lífverur (Spotte, 1979). Samkvæmt Timmons o.fl (2002) eru viðmiðunargildi fyrir H_2S í vatni í eldiskerfum $< 0,002$ ppm.

Viðmiðunargildi fyrir fosfór er $0,01-3$ ppm en <1 ppm fyrir köfnunarefni (nitur) (Timmons o.fl, 2002). Samkvæmt norskum stöðlum telst sjórinn vera í góðu ástandi þegar fosfórstyrkur er $< 0,021$ ppm (vetur) og $0,012$ ppm (sumar), en nítursstyrkur (TN) $< 0,295$ ppm (vetur) og $0,25$ ppm (sumar) (SFT, 1997). Trépanier o.fl. (2002) töluðu um að hlutfall N:P miðað við vigt ætti að vera um 10 til að tryggja öruggt kerfi. Þegar hlutfallið er 7 eða hærra verður P takmarkandi fyrir vöxt þörungna. En það eru vísbendingar um að lífræn efni og uppleyst fosfór geti haft áhrif á myndun eiturefna við blóma plöntusvifa (Holby & Hall, 1991). COD (chemical oxygen demand) er skilgreining á gerð lífræna efnisins og segir til um hversu mikið súrefni þarf til að brjóta þetta lífræna efni alveg niður.

Efnamælingar við lúðueldi

Mynd 10 sýnir þróun ammóníaks (NH_3) og nítríts styrks (NO_2^-) í eldisvökvanum fyrstu 130 daga við lúðueldi. **Mynd 11** sýnir samsvarandi niðurstöður mælinga á vetnissulfíði (H_2S) og **mynd 12** á fosfóri (TOP, total ortho-phosphate) og heildar köfnunarefnum (TN).

Hrognastig

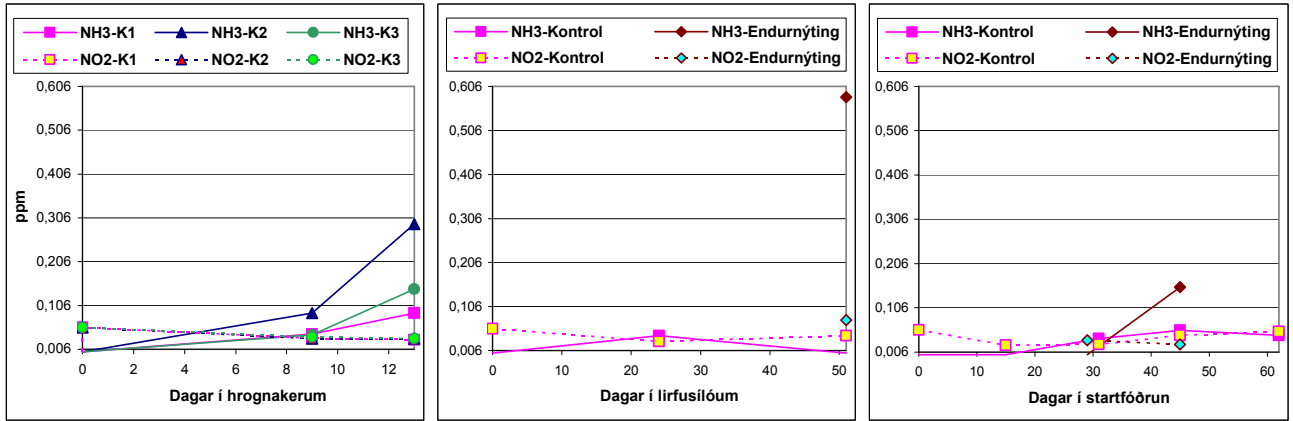
Á hrognastigi var mest aukning á ammóníaki í ker 2 og á 13. degi var það komið vel yfir 0,1 ppm sem er talið vera skaðlegt, á meðan ker 3 var rétt um það gildi en ker 1 undir því. Nítrít styrkur var vel undir hættumörkum í öllu ferlinu. H₂S mælingar sýndu frekar stöðugt ástand nema í ljós kom greinileg aukning á 9. degi í ker 2 (0,03 ppm) sem hafði hugsanlega áhrif á afkomu hrogna.. TOP og TN mælingar í kerum 2 og 3 sýndu hæstu gildin á 9.-13. degi (TOP um 2,5-3,4 ppm en TN um 10,3-14,7 ppm). Hámarksstyrkur sem mældist í ker 1 var á 9. degi: (0,93 ppm TOP og 4,1 ppm TN). Samt sem áður var hlutfall N:P svipað milli kera á seinni hluta tímabilsins, en frekar lágt (3,2 til 4,4; óæskilegt hlutfall < 7). Afkomutölur frá Fiskey ehf sýna að minnsta lifun var í ker 2 (46%) og ker 3 (58%) en öll hrogn lifðu af í ker 1. Þessar niðurstöður samræmast NH₃, H₂S, TOP og TN mælingunum.

Kviðpokastig

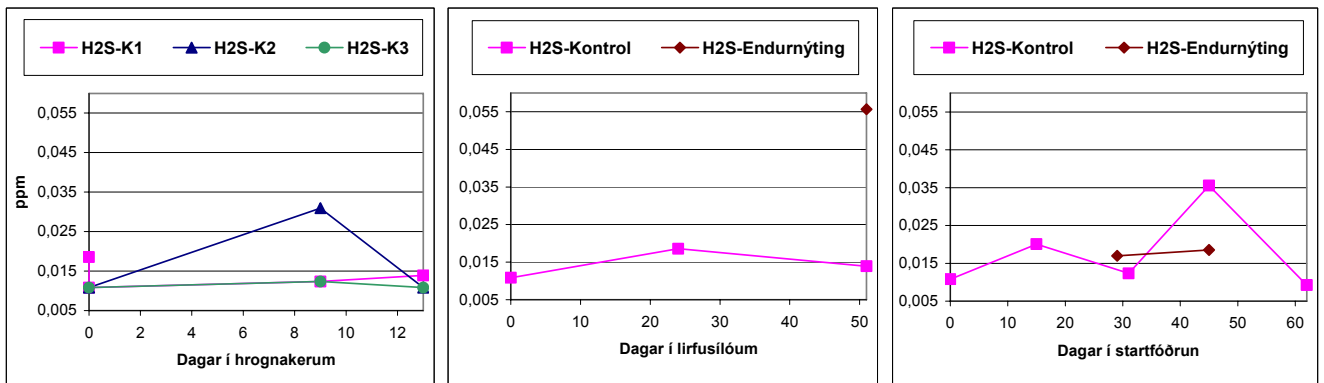
Mælingarnar á eldisvökva á kviðpokastigi (í lirlusílóum) gefa til kynna að nokkuð stöðugt ástand var að finna í hefðbundna kerfinu (kontról) og afkoma þess var 39% með **65% gapara** (vanskapaðar lirlur). Mælingarnar í síló með endurnýtingarkerfi við lok tímabilsins (d51) sýna hæsta magn ammóníaks (0,58 ppm), vetnissúlfíðs (0,06 ppm) og nítríts (0,08 ppm) á meðan á mælingum stóð, en styrkur TOP og TN var frekar lágur (0,37 og 1,2 ppm) á sama tíma. Hlutfall N:P var þá óæskilegt eða um 3,2. En þar var afkoman 32% með 60% gapara. Úrvinnsla sýna vegna oxunargetumælinganna er í gangi og mun klárast á næstum dögum.

Startfóðrun

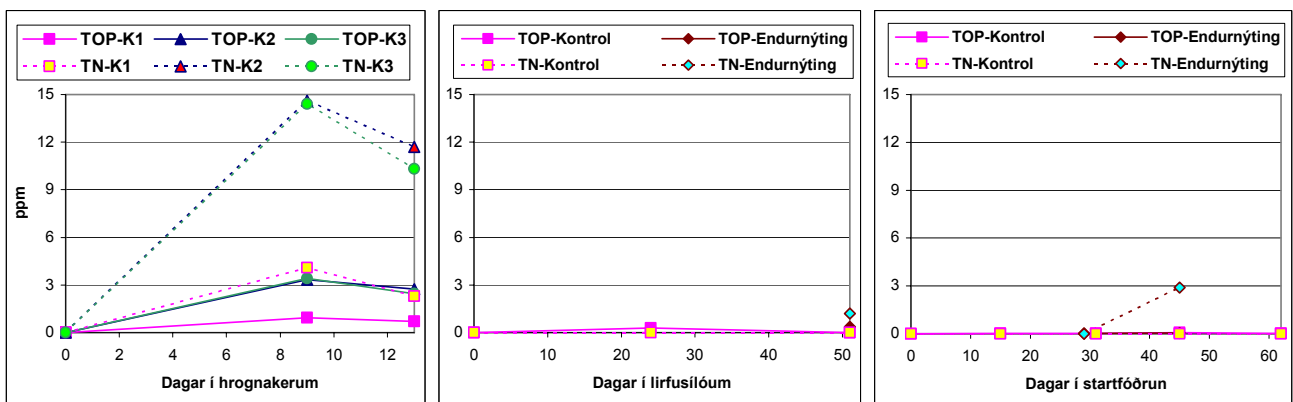
Á síðara stigi lirlueldisins (startfóðrun) fengust sambærilegar niðurstöður fyrir bæði kontról-ker sem voru skoðuð en niðurstöður úr startkeri 21 eru eingöngu sýndar á **myndum 10, 11 og 12**. Afkoma startkers 21 var 79% og 76% fyrir startker 20. Þessi velgengi tengist óhjákvæmilega stöðugleikanum sem efnamælingarnar bera vitni um. Einnig var mælt úr startkeri 1 með endurnýtingarkerfi, en á 45. degi mældist ammóníaksstyrkurinn (0,15 ppm) rétt yfir viðmiðunargildið og nokkru síðar drápu allar lirlurnar.



Mynd 10. Mælingar á ammóníaki og nítíti í eldisvökvanum frá hrognastigi til loka startfóðrunar (greiningarmörk = 0,006 ppm (NH₃) og 0,016 ppm (NO₂⁻))



Mynd 11. Mælingar á vetnissúlfíði í eldisvökvanum frá hrognastigi til loka startfóðrunar (greiningarmörk = 0,01 ppm)



Mynd 12. Mælingar á TOP (total ortho-phosphate) og TN (heildar köfnunarefni) í eldisvökvanum frá hrognastigi til loka startfóðrunar (greiningarmörk: TOP = 0,011 ppm og TN = 1 ppm)

COD og fita voru mæld í eldisvökvanum í startfóðrunarkerum um miðbik og í lok tímabilsins. Í kontról-kerum mældist COD: 293,73 mgO/L (d35) og 407,17 mgO/L (d62 og 65), en í kerinu með endurnýtingarkerfi mældist COD 308,13 mgO/L á 29. degi. Ekki náðist að taka sýni seinna á tímabilinu þar sem lirfurnar í kerinu drápu. Fitumælingar á eldisvökvanum sýna lægra magn fitu á degi 29 (endurnýtingarkerfi: 0,77 mg/L) og d35 (kontról: 0,87 mg/L) en við lok tímabilsins (ker 21 = 2,11 mg/L; ker 20 = 7,80 mg/L). Þetta hærra magn fitu gæti ýtt undir vöxt *Vibrio* tegunda sem nýta sér fitu gjarnan til fjölgunar.

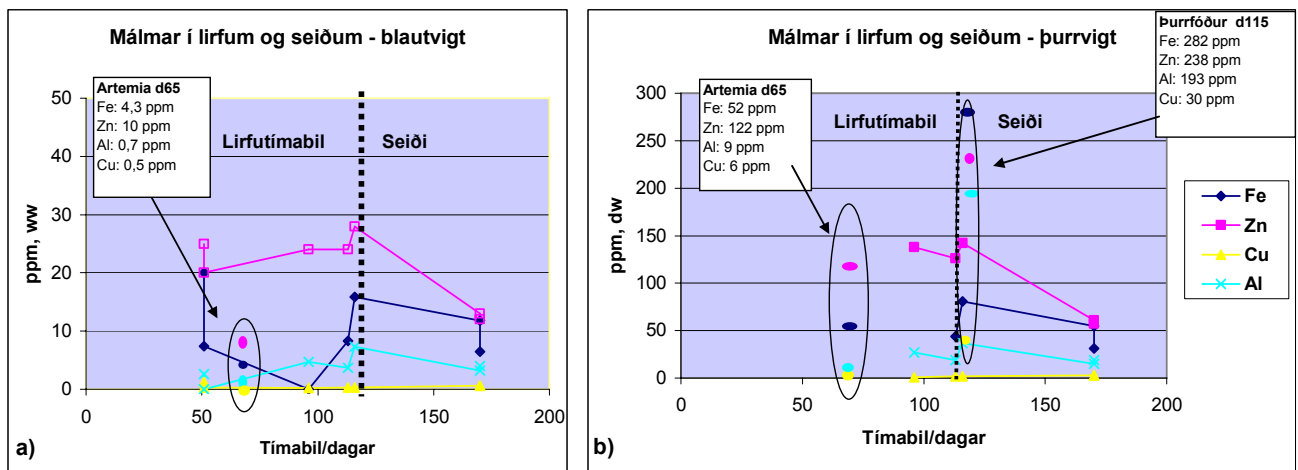
Mælingar á málmum í eldisvökvanun á hrognastigi (**tafla 2**) og svo í lirfum, seiðum og fóðrunarþáttum (**myndir 4a og b**) sýna að engin greinileg uppsöfnun átti sér stað á þessu 6-mánaða tímabili. Viðmiðunargildi málmanna í vatni eru gefin í töflu 2 (Timmons o.fl, 2002). Járn (Fe), kopar (Cu) og ál voru yfirleitt undir mælanlegum mörkum (0,03; 0,005 og 0,04 ppm) í eldisvökvanum en magn sinks mældist um tífalt hærra (0,01-0,08 ppm) en viðmiðunargildið (0,005 ppm). Upphafleg meðhöndlun/síun á sjó við inntakið hjá Fiskey ehf náði að fjarlægja járn og ál sem mældust í ósíuðum sjó. Aftur á móti var sink alltaf til staðar en engin skýring hefur fengist. Það er aftur á móti óskiljanlegt að kopar skyldi mælast í síuðum sjó en ekki upphaflega né í kerunum, og þess vegna telst líklegt að um villu við mælingu sé um að ræða.

Tafla 2. Mælingar á málmum í eldisvökvanum á hrognastigi

Tímabil	Sýni	Dagar	Fe	Zn	Cu	Ál
H	ósíaður sjór	0	0,11	0,01	< 0,005	0,1
R	síaður sjór	0	<0,03	0,05	0,01	<0,04
O	sjór-K1	9	<0,03	0,06	< 0,005	<0,04
G	sjór-K2	9	<0,03	0,05	< 0,005	<0,04
N	sjór-K3	9	0,12	0,02	< 0,005	<0,04
A	sjór-K1	13	<0,03	0,08	< 0,005	<0,04
K	sjór-K2	13	<0,03	0,01	< 0,005	<0,04
E	sjór-K3	13	<0,03	0,01	< 0,005	<0,04
R	ferskvatn		<0,03	0,05	< 0,005	<0,04
Viðmiðunargildi í vatni (ppm)			0,15	0,005	0,03	0,01

Niðurstöðurnar sýna að við lok kviðpokastigsins (d51) voru lirfurnar úr endurnýtingarkerfinu með meira magn af málmum (Zn 25; Fe 20; Cu 1,2; Ál 2,6 ppm, blautvigt) en í kontról-lirfunum (Zn 20; Fe 7,4; Cu 0,3; Ál <0,1 ppm) (**mynd 13a**). **Mynd**

13b sýnir málmamælingar á þurrvigtagrunni frá startfóðrunartímabili og gefur réttari mynd af uppsöfnuninni í lirfum/seiðum. Mælingar í artemíu, sem er lifandi fæðudýr, sýna að sink var hæst (122 ppm), en járn (52 ppm), ál (9 ppm) og kopar (6 ppm) fundust í lægra magni. Við lok tímabilsins sýna mælingar í lirfum/seiðum svipað magn og í fæðudýrum. Við næsta tímabilið (weaning) fengu seiðin þurrfóður Aglo-Norse (nr.2 frá Ewos), en samkvæmt innihaldslýsingunni er koparmagnið 5 ppm. En í raun mældist hærra magn kopars (30 ppm) í þurrfóðurssýninu og magn hinna málmanna var 282 ppm Fe, 238 ppm Zn og 193 ppm Ál. Þessi hái styrkur málmanna í fóðrinu olli ekki uppsöfnun í seiðunum eftir 2-mánaða fóðrun (d170). Þá hafði magn sinks í seiðunum lækkað verulega (úr 136-142 ppm niður í 57-61 ppm), á meðan lítil breyting var á styrk járn, kopars og áls.



Mynd 13. Mælingar á málumum í lirfum og seiðum miðað við blautvigt (a) og þurrvigt (b)

Verkþáttur 2: Skilgreining á þeim þáttum sem hafa áhrif á afkomu og þroska lirfa	
Upphaf: 7. mán.	Lok: 12. mán. → <i>framlengt til mars 2006</i>
<p>Markmið: að skilgreina þá þætti sem hafa áhrif á afkomu og þroska lirfa og kanna hvort þránun í fituríku fœðri á sér stað við núverandi aðstæður í þorsk- og lúðueldi á fyrstu stigum.</p> <p>Afrakstur: Öflun þekkingar og greining á þeim þáttum sem hafa áhrif á afkomu og þroska lirfa. Hér er ætlast til að fá heildarmynd af örveru- og efnaálagi þorsk/lúðueldisins til þess að geta metið hvaða örverutegundir og lífræn/ólífræn efni eru óæskileg. Einnig verður metið hvort og hvernig efnaálagið hafi áhrif á þróun örveruflóru. Þessar upplýsingar eru grundvöllur fyrir frekari þróun forvarnaraðferða. Einnig mat á þránunarstigi fituríkra fœðrunarafurða sem eru notaðar við íslenskar aðstæður.</p> <p>Staða/breytingar: Samantekt úr örveru- og efnaálagi í lúðu- og þorskeldi er ekki hafin vegna þess að niðurstöður sumra efnamælinganna eru nýkomnar eða ókomnar. Frekari úrvinnsla mun fara fram í mars 2006. Mælingum á þránun fituríkra afurða sem eru notaðar á fyrstu stigum lirlfueldis er lokið.</p> <p>Lýsing: Mismunandi sýni af fituríkum afurðum voru tekin hjá báðum eldistöðvum frá apríl til ágúst 2005: m.a. næringarblanda fyrir auðgun lifandi fæðudýra, lifandi fæðudýr fyrir fœðrun, þörungabykkni og þurrfœður. Áhrif aldurs afurðanna (geymslupols) á þránun var skoðuð. Helstu mælingar: hefðbundnar þránunarmælingar á lýsi, eins og peroxíð-gildi (1. stig fituoxunar), anisidin-gildi og TBA-gildi (2. stig fituoxunar), en stöðugleikapróf á fœðri með mælingu á súrefnisupptöku í Oxipres-tæki.</p> <p><i>Gerðar voru mælingar á eftirfarandi sýnum:</i></p> <p><u>Þykkni fyrir hjóldýraauðgun:</u> Protein Selco Plus (PS).</p> <p><u>Lýsisblanda (FF) fyrir artemíu-auðgun:</u> 1) Ný fita, 2) Gömul fita.</p> <p><u>Lifandi fæðudýr (fœðruð með mismunandi fœðri):</u> 1) Hjóldýr (PS+), 2) Hjóldýr (FF-lýsisblanda), 3) Artemía (Ný fita), 4) Artemía (Gömul fita), 5) Artemía (Multigain).</p> <p><u>Þörungabykkni fyrir lirlfueldi:</u> Instant Algae Nannochloropsis</p> <p><u>Fœður:</u> 1) Culture Selco Plus (hjóldýrafœður), 2) Wean-ex 500 (lirlfufœður), 3) Gemma micro 300 (fœður fyrir þorskeldi), 4) Minipro 1 (lirlfufœður-gamalt), 5) Minipro 3 (lirlfufœður-gamalt).</p> <p>Öll sýni voru geymd í myrkri og við 0 °C, þar til mæld, nema Wean-ex 500 og Instant Algae Nannochloropsis voru geymd við -24 °C. Allar mælingar voru gerðar í a.m.k. tvísýni. Aðferðirnar sem voru notaðar við þránunarmælingar voru samkvæmt Rf aðferðum.</p>	

Úttekt á þránun fituríkra fóðrunarafurða sem eru notaðar á fyrstu stigum lirfueldis

Mælingar á fódurdýrum

Niðurstöður þránunarmælinga á fódurdýrum sýndu að TBA-gildi, sem er 2. stigsefni í oxunarferli fitu, var talsvert hærra í hjóldýrum en í artemíu (**Tafla 3**). TBA-gildi var á bilinu 6-11 ($\mu\text{mól/kg}$) í hjóldýrum, en rúmlega 2 í artemíu. Enginn munur kom fram á artemíu eftir því hvort hún var fódruð, eða auðguð með nýrri eða gamalli fitu, eða þá Multigain fódri. Þránun, mæld sem TBA-gildi virtist vera meiri í hjóldýrum sem fódruð voru með Protein Selco Plus fódri (PS+), en með nýrri fitu (FF). Vatn var mælt í fódurdýrum fyrir TBA mælinguna, og reyndist artemía innihalda meira vatn en hjóldýr, eða á bilinu 90-92%, en hjóldýr um 87% vatn. Fita í hjóldýrum var um 2,5%, en var ekki mæld í artemíu. TBA-gildi er misjafnt eftir eðli og magni fitunnar sem er í sýnum, þannig er TBA-gildi hærra í feitum fiski eins og laxi, heldur en í mögrum fiski eins og þorski. TBA-gildi er einnig hærra í fjölómattaðri fitu, en í mettaðri fitu. TBA-gildi í hjóldýrum gæti því í eðli sínu legið á hærra bili en í artemíu, sem gæti stafað af hærra fituinnihaldi og lægra vatnsinnihaldi.

Tafla 3. Þránun (TBA-gildi) í fódurdýrum

Dýrategund	Fóður*	Vatn (%)	Fita (%)	TBA-gildi ($\mu\text{mól/kg}$)	staðalfrávik
Hjóldýr	PS+	87.8	2.4	10.9	0.3
	FF	87.2	2.8	6.3	0.5
Artemía	Ný fita	90.4		2.1	0.1
	Gömul fita	92.2		2.1	0.1
	Multigain	92.1		2.2	0.2

*PS+: Protein Selco Plus, FF: Fiskey fita (ný fita).

Tillaga um viðmiðunarmörk fyrir TBA-gildi í frosnum fiski hafa verið birt sem 18 $\mu\text{mól/kg}$ (Robles-Martinez o.fl. 1982). Artemía er augljóslega án þráa, miðað við þau mörk. Hjóldýr fódruð með PS+ voru með TBA-gildi 11, sem er vísbending um nokkra þránun, einkum ef borið er saman við TBA-gildið í hjóldýrum sem fódruð voru með nýrri fitu (FF) og mældust með tæplega helmingi lægra gildi, eða um 6 $\mu\text{mól/kg}$.

Mælingar á lýsisblöndu

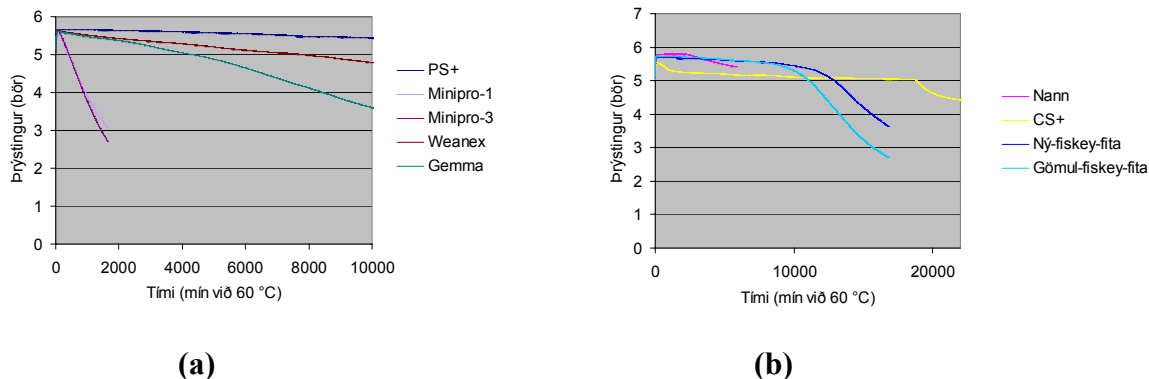
Mælingar á TBA-gildi og Oxipres stöðugleikaprófi voru gerðar á ómeðhöndluðum sýnum, en anisidin- og peroxíðgildi voru mæld í fituhluta sýnanna eftir skiljun í skilvindu. Niðurstöður TBA-gildis bentu til þess að nýja fitan væri meira þrá en gamla fitan, og þess vegna var ákveðið að mæla líka peroxíð- og anisidingildi. Peroxíð-gildi mælir fyrstu stig oxunar, en anisidingildi mælir myndefni á síðari stigum oxunar, eins og TBA-gildi. Anisidingildið gaf svipaðar niðurstöður og TBA-gildið, en þó var munur milli sýna ekki eins mikill, gömlu fitunni í hag (**Tafla 4**). Óformlegt lyktarskynmat benti hins vegar til þess að gamla fitan væri lakari að gæðum, og niðurstöður Oxipres stöðugleikaprófs við 60 °C, sýndu lengra hindrunartímabil fyrir nýju fituna, eða 96 klst á móti 66 klst fyrir gömlu fituna. Fitan er því stöðugri gagnvart þránun sem hindrunartímabilið er lengra. Lægra TBA- og anisidin-gildi fyrir gömlu fituna gæti bent til þess að fitan hafi verið talsvert þrá og myndefni oxunar farin að brotna niður, en það er vel þekkt ferli í hvarfgangi þránunar. Oxipres niðurstöðurnar benda líka til meiri stöðugleika nýju fitunnar, sem þó hafið hærri TBA- og anisidin-gildi. Þess ber þó að geta að þetta voru tvö aðskilin sýni, því gamla fitan var ekki úr sömu framleiðslulotu og nýja fitan.

Tafla 4. Þráamælingar í nýrri og gamalli lýsisblöndu (fitu)

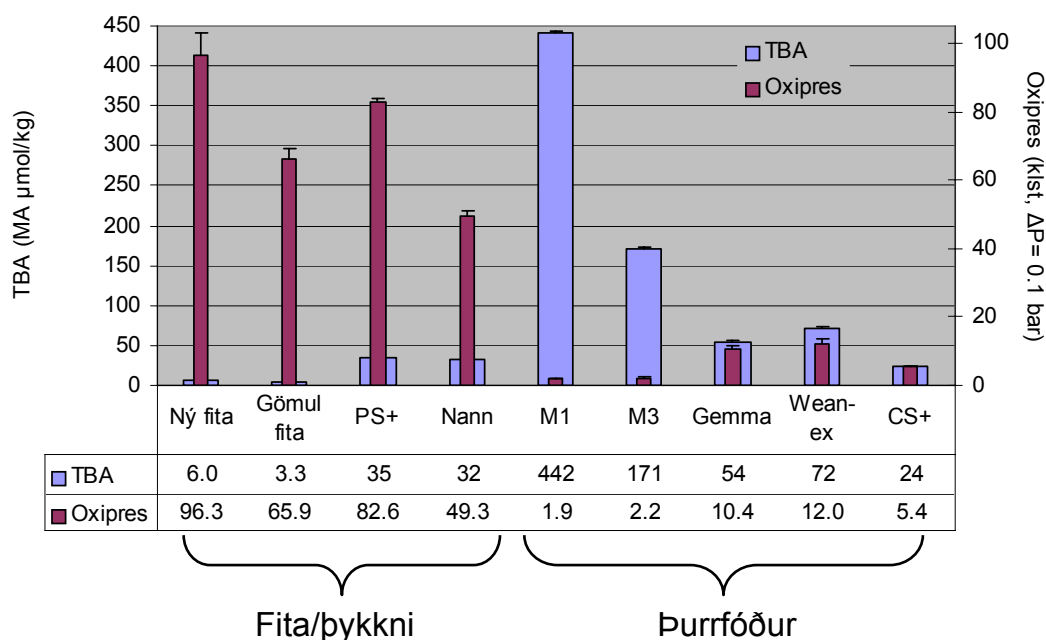
	TBA-gildi ($\mu\text{mól/kg}$)	Staðal-frávik	Peroxíð-gildi (meq/kg)	Anisidin-gildi	Staðal-frávik	Oxipres (klst)	Staðal-frávik
Ný fita	6	0.6	0.1	9.2	1.2	96	7
Gömul fita	3.3	0.2	0.1	6.1	1.9	66	3

Oxipres mælingar og TBA-gildi í fituríkum fóðurtegundum

Niðurstöður Oxipres stöðugleikaprófs á fóðri sýndu ekki dæmigerðan þránunarferil þar sem súrefnisþrýstingurinn fellur skyndilega (**Mynd 14-a**). Þessi ferill með skyndilegu þrýstingsfalli sást þó á lýsisblöndunum (ný og gömul fita) (**Mynd 14-b**). Til þess að einfalda samanburð milli sýna, er aðgengilegra að ákvarða tímabilið þegar þrýstingurinn hefur fallið um ákveðið gildi. Tímabilið þar til þrýstingur súrefnis hafði fallið um 0,1 bar var notaður, því þrýstingsfallið var þar línulegt hjá öllum sýnum (**Mynd 15**).



Mynd 14. Oxipres stöðugleikapróf á fódri (a) og lýsisblöndum/fljótandi sýnum (b)

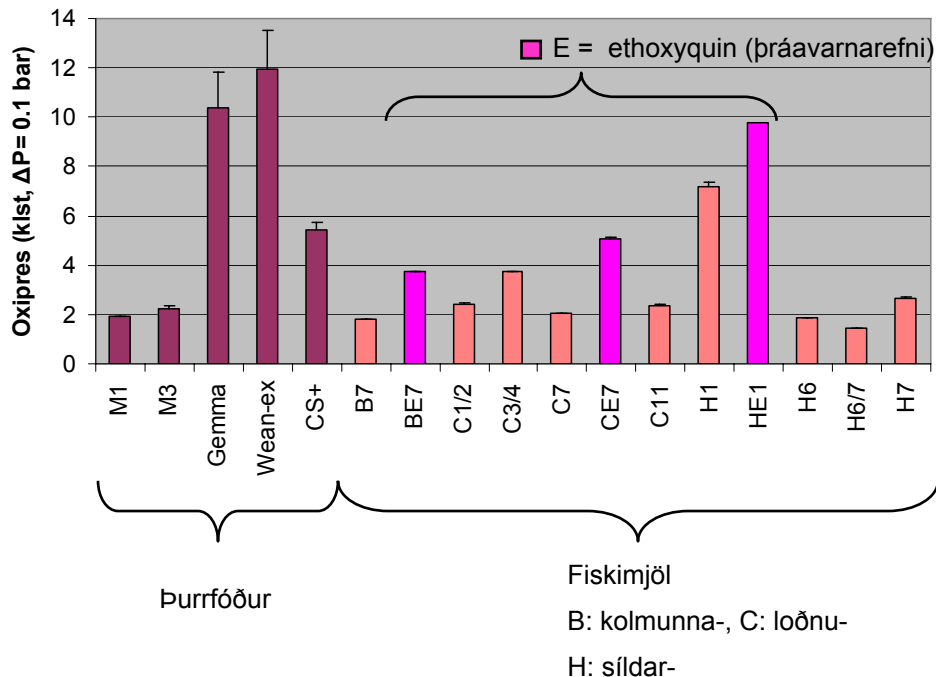


Mynd 15. Oxipres stöðugleikapróf (hindrunartímabil, klst) og TBA-gildi á fódri og fitu/pykkni. Skammstafanir PS+: Protein Selco Plus, Nann: Instant Algae Nannochloropsis (þörungapykkni), M1 og M3: Minipro 1 og 3, Gemma: Gemma micro 300, CS+: Culture Selco Plus (hjöldýrafóður).

TBA-gildi voru mjög há í fódursýnunum (54 - 442 $\mu\text{mol/kg}$), nema í CS+ sem var með 24 í TBA-gildi (Mynd 15). Fita/pykkni var með mun lægri TBA-gildi, eða 3-6 í lýsisblöndunum og rúmlega 30 í pykknunum. Oxipres hindrunartímabilið var að sama skapi hátt fyrir fitu/pykkni og lágt fyrir fódrið. Oxipres niðurstöðurnar sýndu lægsta hindrunartímabilið fyrir gamalt fóður (M1 og M3) eða um 2 klst, en rúmlega 5 klst fyrir CS+, 10 og 12 klst fyrir Gemma og Wean-ex, hvort um sig.

Samanburður á þurrfóðri og fiskimjöli

Til þess að átta sit á stöðugleika þurrfóðurs sem prófað var í þessari tilraun er gagnlegt að bera saman Oxipres niðurstöðurnar við mælingar sem gerðar voru á fiskimjöli í annarri rannsókn á Rf (**Mynd 16**).



Mynd 16. Stöðugleiki þurrfóðurs til samanburðar við fiskimjöl

Oxipres stöðugleiki M1 og M3 fóðursýna reyndist svipaður og flest sýni af fiskimjöli sem var ekki þrávarið með ethoxyquin. Hins vegar var þrávarið fiskimjöl stöðugra en M1 og M3. CS+ var stöðugra en óþrávarið mjöl, fyrir utan eitt óvenju stöðugt síldarmjöl (H1). Gemma og Wean-ex voru álíka stöðug eða stöðugri en það fiskimjöl sem var stöðugast (HE1). Það er rétt að taka það fram að CS+ og PS+ voru með viðbætt þráavarnarefni, svo og lýsisblöndurnar (FF, gömul og ný), önnur fóðursýni gætu einnig innihaldið þráavörn, en upplýsingar um það vantaði.

Ályktanir

Oxipres stöðugleikapróf virðist henta ágætlega til þess að meta stöðugleika á fódri og fituríkum afurðum, vegna þess að þetta próf sýnir mun á ferskum og gömlum sýnum. TBA-gildi gefur misvísandi niðurstöður fyrir fitu af lélegum gæðum, sem kemur fram í

lægri niðurstöðum á gamalli miðað við ferska fitu. TBA-gildi hentar mun betur til mælinga á ferskum sýnum eins og lifandi artemíu eða hjóldýrum, þar sem Oxipres væri óframkvæmanlegt, vegna mikils vatns í sýnum. Þessi úttekt á þránun fituríkra fôðrunarafurða sem eru notaðar á fyrstu stigum lírfueldis gefur til kynna að þránun sé ekki stórt vandamál við fôðrunina. Hins vegar mátti greinilega sjá þráaukningu í gömlum sýnum, sem bendir til þess að fylgjast þurfi vel með gæðum og geymsluþoli fôðursins.

Verkþáttur 3: Einangrun, greining og val æskilegra baktería	
Upphaf: 1. mán.	Lok: 10. mán. → <i>verkþættinum lokið</i>
<p>Markmið: að einangra/greina/finna bakteríur úr þorskeldinu sem hafa hindrandi eiginleika gagnvart óæskilegum bakteríum auk þess að kanna ýmsa aðra þætti (vaxtarhraða, festigetu, þol m.t.t. eldisaðstæðna) sem hafa áhrif á vöxt og virkni valdra baktería.</p> <p>Afrakstur: Væntalegar probíotískar bakteríur valdar m.t.t. festigetun þeirra í fiskmódel auk vaxtargetu/hindrandi eiginleika; aðrar æskilegar bakteríur valdar m.t.t. eiginleika, virkni og vaxtargetu þeirra í eldisumhverfinu; þessar völdu bætibakteríur eru forsendur fyrir verkþátt 4.</p> <p>Staða: Verkþættinum lokið.</p> <p>Framkvæmd: Þessi verkþáttur var að hluta til framkvæmdur samhliða verkþætti 0 vorið 2004. Einnig voru tekin sýni í október 2004 af eldri þorskseiðum og örveruflóra úr tálknum og meltingarveginum einangruð á mismunandi ætum (Rf og Keldur).</p> <p>3.1 - Einangrun og greining æskilegra baktería (Rf): Út frá hefðbundnum greiningum í verkþætti 1 á 1. ári verkefnisins voru 450 bakteríustofnar flokkaðir í 189 hópa. Einn fulltrúi hvers hópar var valinn til að kanna hindrandi eiginleika gangvart 3 sjúkdómsvaldandi bakteríum (úr safni Keldna). Einnig voru bakteríustofnar úr safni Keldna, K-1 og <i>Carnobacterium piscicola</i>, og franskur bakteríustofn <i>Carnobacterium divergens</i> V41 (ENITIAA) prófaðir. 39 stofnar sýndu mismikla virkni. Þetta hindrunarpróf var endurtekið á þessum 39 stofnum með það í huga að fá betri skilning á virkni þeirra, þ.e. hvort hindrunin væri vegna bakteríunnar sjálfar eða myndunar hindrandi efna (sýrustig mælt, efna- og siderophore myndun könnuð). Einnig var vaxtarhraði þessara baktería við mismunandi hitastig kannaður (8-15-22-30-35°C) til að sjá fyrir hvaða möguleika hver stofn hafði í eldisumhverfinu (t.d. kjörvaxtarhitastig). Eftir að</p>	

frumniðurstöður á 16S rDNA hlutaraðgreiningu lágu fyrir og út frá fyrrnefndum athugunum (virkni breidd/ spectrum og vaxtarhraða m.t.t. sjúkdómsvaldandi baktería), voru 11 bakteríur valdar til frekari rannsókna. Gagnkvæm áhrif (interaction/hindrun) milli valdra baktería (Rf) og blóðrofsvirkni (Keldur) voru einnig könnuð.

3.2 –Val æskilegra örvera (Rf og Keldur): Einn liður í að kanna ”probiotic” eiginleika valdra baktería var að nota svokallað viðloðunarpróf (adhesion test) sem var framkvæmt hjá KVL í Danmörku og á Keldum. Í slíku prófi er athugað hvort og í hve miklum mæli tiltekin bakteríutebundin festist við frumur í rækt. Þrenns konar frumulínur (CHSE, Bf og RTG-2) voru ræktaðar upp samkvæmt lýsingu frá KVL, þar sem EPC frumur voru prófaðar. Teknar voru 21-28 daga gamlar frumuræktir í flöskum og frumurnar losaðar sundur með trypsinmeðhöndlun. Sáð var í nýjar flöskur og frumur látnar festast og skipta sér yfir nótt við 25-28°C. Flöskurnar voru fluttar í 16°C og hafðar þar í 27 daga. Allar frumúlínurnar eru úr ferskvatnsfiski og eru ýmist þekjufrumur (epithelial cells) eða trefjafrumur (fibroblastic cells):

CHSE: chinook salmon embryo cells (*O.tshawytscha*)

RTG: rainbow trout gonad cells (*O.mykiss*)

Bf: bluegill fry (*Lepomis macrochirus*)

EPC: epithelioma papulosum cyprini (*Cyprinus carpio*)

Ekki hefur tekist að gera frumulínur úr þorskfiskum.

Fyrir viðloðunarpróf var útbúin lausn nýmeltra frumna (6×10^5 frumur/ml) og sáð í 200 mm² brunna á 24 brunna ræktunarbökkum (Nunc, Roskilde, Denmark) sem eru hafðir við 28°C yfir nótt og síðan í 2 daga við 16°C. Klukkustund áður en bakteríurnar eru settar á frumurnar, er frumuætið sogið úr brunnunum og sams konar æti, án sýklalyfja, er sett í þá.

Bakteríur eru ræktaðar í marine broth (Becton Dickinson, Broendby, Denmark) við 16°C yfir nótt. Næsta dag eru ræktirnar skildar niður við 10.000 rpm í 2 min. Botnfallið er leyst í frumuæti án lyfja og reynt að blanda sem næst 10^6 cfu/ml. Þetta krefst aftur fortírauna þar sem bakteríustofnarnir vaxa mis hratt og verða mis þéttir. Einum mL bakteríulausnar var bætt í hvern brunn og bakkinn hafður við 16°C í 1 klst. Þá var hver brunnur skolaður þrisvar með PBS til að fjarlægja lausar bakteríur. Frumuræktin var leyst í sundur með 0,2% (v/v) Triton-X100 (Merck), hirt í glös og tífoldar þynningarraðir útbúnar. Fjöldi lífvænlegra baktería var ákvarðaður með því að sá úr þynningarröðunum á marine agar. Fjöldi þyrpinga (colony forming units) var talinn eftir ræktun við 16°C í 7 daga. Viðloðunarhæfni var sett fram sem sú % baktería sem loddði við frumurnar miðað við heildarfjöldann sem fór í hvern brunn (títrerað var fyrir hverja baktería).

Tilraunir hjá KVL voru tvíteknar og meðaltal reiknað. Tilraunir á Keldum voru þríteknar en ekki tókst að staðla aðferðina þannig að hægt væri að reikna meðaltöl, en útkomum var raðað samkvæmt innbyrðis samengi, þ.e. 0, +, ++ og +++.

Rf kannaði svo nánar áhrif umhverfispáttá (sýrustigs, sýklalyfja, o.fl.) á vöxt og hindrandi eiginleika valdra baktería til að tryggja velgengni þeirra við fiskeldisaðstæður. Má nefna að vöxtur valdra baktería var metinn í Culture Selco 3000 (næring fyrir hjóldýr) við 30°C (*in vitro*) auk áhrifa neomycins á fjölda þeirra eftir ræktun. Valdir stofnar voru einnig prófaðir við raunverulegar aðstæður, þ.e. hjóldýrarækt í litlum einingum (800 ml).

Einangrun og greining æskilegra baktería: Eftirfarandi 11 bakteríustofnar voru valdir til frekari rannsókna. Stofn K1 frá Keldum var hafður með þó lítil virkni mældist.

Stofn #	Heiti	Gram	Kjörhiti (°C)	Hindrun og einkenni					Uppruni
				L139	Asa	Vs	pH	CAS	
279	<i>Arthrobacter bergerei</i> (99%)	+	22	-32		?	7,06	0	sjór S8
337	<i>Unid. Hailaer soda lake bact. F1</i> (98%)	+	30	aðeins	20	22	6,27	0	þörungabykkni
342	<i>Alkalibacterium olivoapovlitticus</i> (99%)	+	15-30	9	16	21	7,18	0	þörungabykkni
388	<i>Enterococcus sp.</i> (99%)	+	15-30	9	16	20	6,59	0	lirfur S8
394	<i>Enterococcus sp.</i> (99%)	+	22-30	-11	18	20	7,36	0	þörungabykkni
538	<i>Vibrio sp. Da-2</i> (98%)	-	22-30	18+		aðeins	7,31	3	lirfur E13
673	<i>Unc. Vagococcus clone</i> (99%)	+	22-30	-10	18	20	6,4	0	lirfur E13
683	<i>Enterococcus faecium</i> (98%)	+	22	-9	14	14	6,85	0	þurrfóður
716	<i>Vibrio sp. Da-2</i> (98%)	-	15-22	20		-14	7,18	3	lirfur E13
K1	<i>Vibrio logei-like</i>	-	15-22			aðeins	NA	3	þorskeldi (Keldur)
V41	<i>Carnobacterium divergens V41</i>	+	15-22	11	20	26	7,12	0	lax (Frakkland)

Skyldleikaprósentar við gagnagrunn (NCBI genabankann) er gefið í sviganum. Fisksjúkdómabakteríurnar sem notaðar voru við mat á hindrandi eiginleika einangraðra baktería voru víbrióveikibakterían *Listonella anguillarum* (F-139-03, L139) einangruð úr þorski, kýlaveikibróðurbakterían *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* (Asa), einangruð úr þorski (F19-99) og bakterían sem veldur Hitraveiki, *Vibrio salmonicida* (Vs) einangruð úr laxi (A8V-1-22). Hindrunin er gefin í mm (stærð eyðu á MA skál gagnvart viðkomandi fisksjúkdómabakteríum) og mínus gildi gefur til kynna að hindrunin var væg (ekki 100% eyða, sjáanlegur svolítill vöxtur). Stofnar 342 og V41 mynduðu hindrandi efni, en þeir ollu ekki verulegum sýrustigsbreytingum (pH > 7). V41 var með breiðustu virknina, en 342-388-394-673-(683) með aðeins minni virkni. Vaxtarhraðinn við lægra hitastig var mestur hjá Gram-neikvæðum bakteríum (538-716-K1-L139) en hjá Gram-jákvæðum bakteríum óx V41 hraðast við 8-15°C en stofnar 394, 683, og 279 uxu betur við 15°C en 8°C. Við hærra hitastig (30°C) uxu eftirfarandi stofnar hraðast: F-139-03 (mesti hraði), 683, 337, 394, V41, 388 og 279. Einnig var könnuð blóðrofsvirkni (hemolysis) ofangreindra stofna á blóðagar. Þrjár stofnanna voru með slíka virkni, 538, 716 og 673. Ekki er talið æskilegt að nota bakteríur með slíka eiginleika.

Gagnkvæm áhrif milli 15 bakteríustofna (11 sem eru í ofangreindri töflu ásamt eftirfarandi sjúkdómsvaldandi bakteríum: *Listonella anguillarum* (F-139-03), *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* (F19-99) *Vibrio salmonicida* (A8V-1-22) og *Vibrio wodanis* (B1)) voru könnuð til að meta hvaða stofna er hægt að nota saman í ”probiotic” blöndu. **Tafla 5** sýnir hindrandi eiginleika sumra bakteríanna gagnvart sjúkdómsvaldandi bakteríum og/eða öðrum bakteríum. Aðeins 1 bakteríustofn hindraði *V. wodanis* (B1) þó lítil virkni hafi fundist, en Vw stofninn hindraði mjög vel stofnana 394, 673 og 683, sem enginn hinna sjúkdómsvaldandi bakteríanna gerði. Þetta er mjög athyglisvert og þýðir að tilvist *V. wodanis* í eldisumhverfinu myndi líklega gera slíkar bakteríutegundir óvirkar, (m.a. *Enterococcus*) ef þær yrðu fyrir valinu sem bætibakteríur. Stofn 279 hefur greinilega hindrandi eiginleika gangvart sumum *Vibrio/Listonella* tegundum. Annars virðist vera hægt að nota flesta bakteríustofna í blöndu.

Tafla 5. Hindrandi eiginleikar* valdra bakteríustofna gangvart indikator-stofnum

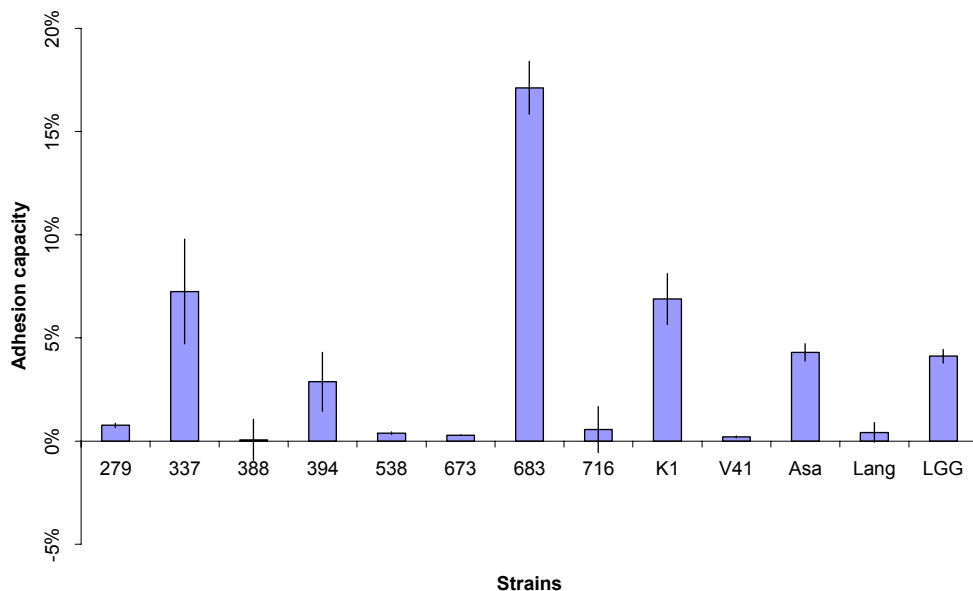
Hindrandi stofn	279	337	342	388	394	538	673	683	V41	716	K1	Asa	L139	Vs	Vw
I 279	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-
N 337	-	-	-	-	-	28	-	-	-	28	-	-	-	-	-
D 342	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I 388	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K 394	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60
A 538	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T 673	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40
O 683	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	52
R V41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S 716	28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T K1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O Asa	-	10	10	12	13	-	13	10	14	-	-	-	-	-	-
F L139	30	-	-	-	(+)	24	-	-	8	20	-	-	-	-	-
N Vs	-	19	10	12	14	-	12	12	16	-	-	-	-	-	-
N Vw	-	-	-	(10)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*Hindrandi eiginleiki metinn með stærð eyðu í mm á MA-skál með indikator-stofni. (+) merkir veik/mjög lítil hindrun.

Val æskilegra baktería

Niðurstöður viðloðunarprófanna: Alls voru gerðar tilraunir með 15 bakteríustofna. Á mynd 17 eru niðurstöður um viðloðunargetu fyrir 13 stofna sem prófaðir voru á EPC frumum hjá KVL. Á Keldum voru prófaðir 15 stofnar á 3 frumutegundum. Í töflu 6 er sýnd viðloðun 5 bætibakteríustofna. Þrír þeirra voru notaðir til prófana *in vivo* (394, 279 og V41) og niðurstöður fyrir 683 og K-1 eru einnig sýndar þar sem þeir höfðu mesta viðloðun á EPC

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



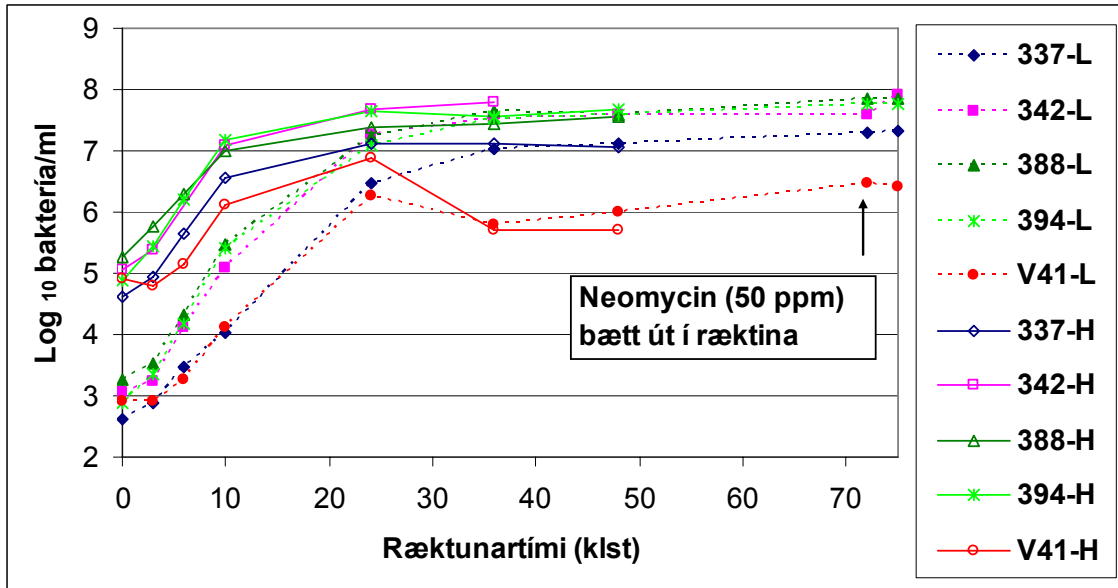
Mynd 17. Viðloðun 10 mögulegra bætibakteríustofna, 2 fiskisýkla (Asa og L139) og mjólkursýrubakteríu (LGG) á EPC frumur. Gert á KVL. Sýnt sem % af heildarfjölda baktería sem settar voru á frumurnar.

Tafla 6. Viðloðun 5 mögulegra bætibakteríustofna við fiskafrumulínur. Sýnd er innbyrðis viðloðunarhæfni.

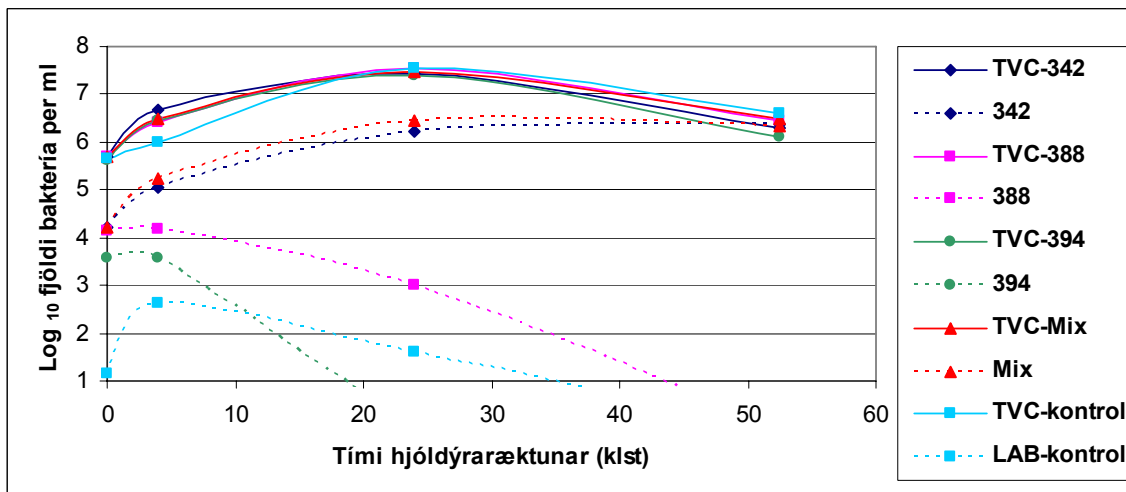
Baktería	Frumulína			
	CHSE	Bf	RTG	EPC (frá KVL)
683	+++	+++	+++	+++
K-1	+++	?	0	++
394	+++	+++	+++	++
279	+++	0	++	+
V-41	+++	+++	+++	0

Niðurstöður ýmissa prófana: Ýmsar athuganir voru gerðar áður en forvalið á æskilegum bakteríum (bætibakteríum) var mögulegt. Þær bakteríur sem áttu að vera notaðar við ræktun lifandi fæðudýra þurftu að uppfylla eftirfarandi skilyrði: vöxtur við 27°C við pH 7,5-8,5 og saltmagnið 2-2,5% auk þess að þola neomycin-meðferð (50 ppm), en þetta er umhverfið við hjóldýraræktunina. Þess vegna var Culture Selco 3000 (INVE) notað til að rækta valdar bakteríur og sjá hversu hratt þær fjölguðu sér við ofangreindar aðstæður (en 30°C). Könnuð voru áhrif sáningarmagns á vöxt bakteríanna í þessu ræktunarumhverfi. Eftir 72 klst ræktun var neomycin (50 ppm) bætt út í ræktirnar (L, lægra magn) og fjöldi bakteríanna metinn eftir 3 klst. **Mynd 18** sýnir hversu hratt bakteríurnar uxu við þau skilyrði sem líkjast hjóldýrarækt. Lægra magn bakteríanna var nokkuð fljótt (1-1,5 dag) að ná svipuðum fjölda og mældist hjá ræktunum með herra upphaflegt magn. Þrjár bakteríustofnar uxu hraðast, náðu mestum fjölda og þoldu vel neomycin: 342-388-394. Þær bakteríur voru valdar til prófunar við hjóldýrarækt á Stað í litlum einingum (*in vivo*) í mars 2005.

Tilraunauppsætningin var með eftirfarandi 5 hópum: kontról án bætibaktería, +342, +388, +394 og allar notaðar saman (mix); og hver hópur var endurtekinn 3 svar sinnum, þéttleiki hjóldýranna var 400/ml og heildarrúmmál ræktanna var 800 ml. Fylgst var með heildarfjölda örvera (TVC), *Vibrio* tegunda og mjólkursýrubaktería (m.a. stofnar 388 og 394). Erfiðara reyndist að fylgjast með fjölda stofnsins 342 þar sem engin góð sérhæfð æti voru þekkt, en æti sem innihélt neomycin (70 ppm) var þróað. Á **mynd 19** kemur í ljós að hár upphafsörverufjöldi (tæplega log 6/ml) var að finna í hjóldýrum og að lága upphafsmagn bættra mjólkursýrubaktería (log 3-4/ml) dugði ekki og þær mjólkursýrubakteríur drápust. Hugsanlegt er að stofn 342 hafi náð að fjölga sér (eins og sést á **mynd 19**) en ekki er hægt að útiloka tilvist annarra baktería á neomycin-ætinu. Það tókst illa að meta fjölda *Vibrio* tegunda þar sem fjöldinn var hærri (um log 7/ml eftir 24 klst) en gert var ráð fyrir í upphafi og féll í lokin (um log 5/ml eða lægri). Fjölgun hjóldýranna var mismumandi milli hópa og innan hópanna, sennilega vegna þess að tilraunakerfið var svolítið frábrugðið miðað við hefðbundin síló og erfitt að ná fram bestu aðstæðum. Af viðbættum bakteríum virtist stofn 342 standa best og fjöldi *Vibrio* tegunda þess hóps var undir log 5/ml eftir 53 klst hjóldýraræktun (niðurstöður ekki sýndar). Næst var ákveðið að skoða leiðir til að lækka upphaflegan örverufjölda í hjóldýrum. Hjóldýr eru viðhaldin lifandi allan vetur og þess vegna er einskonar húsflóra til staðar sem erfitt er að losna við.



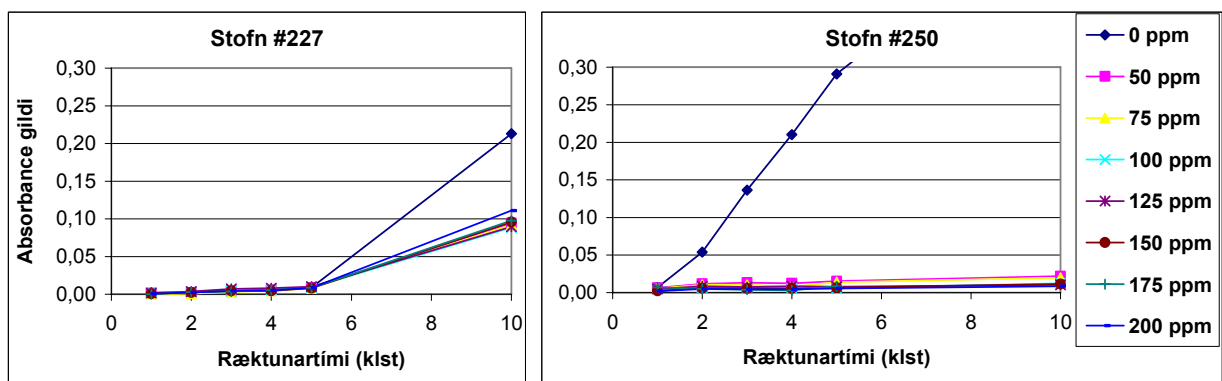
Mynd 18. Vöxtur valdra baktería í Culture Selco 3000 við 30°C og viðbættu neomycin



Mynd 19. Vöxtur valdra baktería við hjóldýrarækt án auðgunar

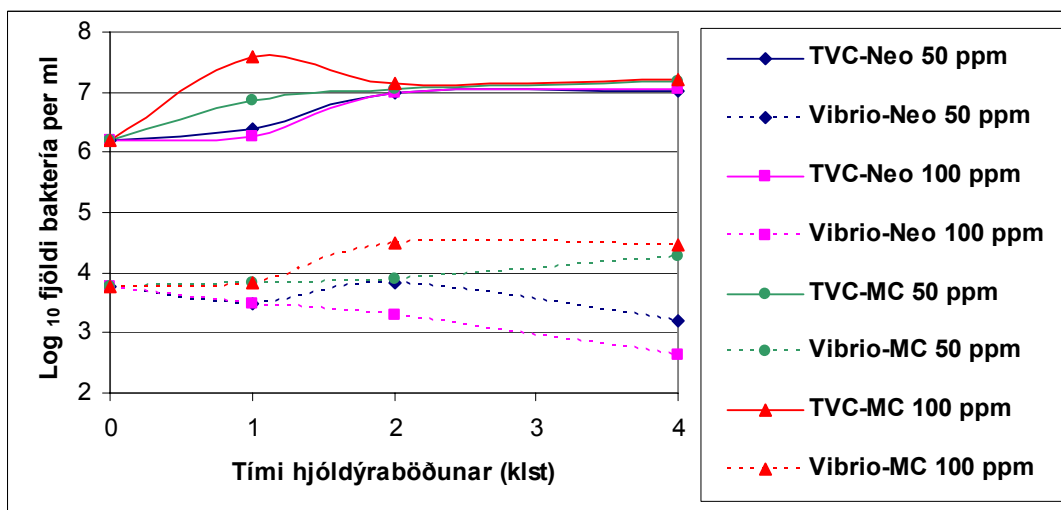
Neomycin hefur verið notað við hjóldýrarækt á Stað í Grindavík. Næst voru skoðuð áhrif neomycins (0-200 ppm) á vöxt nokkurra bakteríustofna sem voru einangraðir úr hjóldýra- (stofnar 227 og 250 sem eru *Flavobacterium* eða *Aeromonas*-like tegundir) og auðgaðri artemíurækt (stofnar 493 og 495 sem eru *Vibrio* tegundir) vorið 2004. Einnig var næmni tveggja sjúkdómsvaldandi baktería (*Vibrio salmonicida* A8V-1-22 (Vs) og *Vibrio wodanis* B1 (Vw) frá Keldum) gagnvart neomycin athuguð (**Mynd 20**). Þetta var kannað í holubökkum með Marine seyði við 26°C og ljósgleypnimælingar gerðar við 590 nm reglulega (0-10 klst). Sáningarmagn bakteríanna var um log 6-7/ml. **Mynd 20** sýnir einungis

niðurstöður fyrir hjóldýra bakteríustofna, þar sem neomycin hindraði algjörlega vöxt hinna bakterianna og sjúkdómsvaldandi bakteríurnar uxu erfiðlega við þessar aðstæður (frekar hátt hitastig fyrir Vs). *Flavobacterium* stofninn (227) þoldi alla styrkleika neomycins sem voru prófaðir eins og sést á myndinni, en hinn stofninn (250) óx ekki við lágsta magn neomycins (50 ppm) né hærra magn. Þetta gefur til kynna að notkun neomycins (50 ppm) sem meðferðar til að lækka heildarörverufjölda í hjóldýrum mun hafa áhrif á takmarkandi fjölda bakteríutegunda.



Mynd 20. Áhrif neomycins (0-200 ppm) við 26°C á vöxt valdra bakteríustofna (in vitro)

Mynd 21 sýnir hins vegar að Micro Control (Rich S.A.) hafði ekki æskileg áhrif á örverufjöldann í hjóldýraræktunum, og annars vegar að notkun neomycins virtist hægja á vexti heildarörveruflórunnar en hafði hindrandi áhrif á vöxt *Vibrio* tegunda. Ákveðið var að nota neomycin (50 ppm) til að meðhöndla hjóldýrin áður en hjóldýraræktunin var sett af stað (verkpáttur 4.2).



Mynd 21. Áhrif neomycins eða Micro Control (50-100 ppm) á örverufjölda í hjóldýrarækt

Út frá ofangreindum niðurstöðum og öðrum upplýsingum var ákveðið að prófa eftirfarandi örverur í verkþætti 4:

Val fyrir þróun probiotic lifandi fæðudýra (26-27°C):

- ✓ Stofn #04-342: *Alkalibacterium olivoapovliticus* (99%) úr þörungabykkni
- ✓ Stofn #04-683: *Enterococcus faecium* (98%) úr þurrfóðri
- ✓ Levucell: probiotic gersveppur (Lallemand)

Val fyrir böðunartilraunir á hrognum/lirfum (8-15°C):

- ✓ Stofn V41: *Carnobacterium divergens* V41 (Enitiaa, Frakkland)
- ✓ Stofn #04-394: *Enterococcus durans* (99%) úr þörungabykkni
- ✓ Stofn #04-279: *Arthrobacter bergerei* (99%) úr sjó (S8-kontról '04)

Verkþáttur 4: Notkun valdra baktería við þróun forvarnaraðferða	
Upphaf: 10. mán.	Lok: 21. mán. → <i>framlengt til apríl 2006</i>
<p>Markmið: að þróa forvarnaraðferðir m.t.t. eldisaðstæðna/þátta sem hafa áhrif á afkomu, þroska, streitu- og sjúkdómshætti þorsklirfa og m.t.t. eiginleika valdra jákvæðra baktería.</p> <p>Afrakstur: Þróaðar forvarnaraðferðir, m.t.t. eldisaðstæðna/þátta sem hafa áhrif á afkomu, þroska, streitu- og sjúkdómshætti þorsklirfa, sem verða sannprófaðar við lokatilraunir vorið 2006. Skilgreining “protective”/æskilegra baktería sem geta verið notaðar við stýringu eldisumhverfisins gegn óæskilegum bakteríum vs. “probiotískra” baktería sem geta gjarnan fest sig í meltingarvegi lirfa/seiða og þannig haft neikvæð áhrif á vöxt sjúkdómsvaldandi baktería.</p> <p>Staða/breytingar: Verkþáttinum 4.5 (<i>Sýkingartilraunir á lirfum með og án forvarnaraðferða</i>) var breytt í tilraun með seiðum í nóvember-desember 2005 til að meta betur eiginleika valdra bætibaktería. Verkþáttur 4 er sem sagt ennþá í vinnslu en stefnt er að ljúka honum í apríl 2006.</p> <p>Lýsing: Framkvæmdar voru <i>in vivo</i> tilraunir á lifandi fæðudýrum, hrognum og lirfum með notkun bætibaktería. Notaðar voru hefðbundnar og sameindafræðilegar aðferðir við mat á breytingum örveruflórunnar sem áttu sér stað. Ýmsum sýnum var safnað af Keldum og munu ákveðnar mælingar verða framkvæmdar þegar flestar niðurstöður af Rf mælingunum liggja fyrir.</p>	

4.1 - *Mögnun /ræktun æskilegra baktería (Rf)*: Leitað var eftir bestu ræktunarætum og aðferðum til að tryggja nægjanlegt magn bætibaktería í *in vivo* fortíraunum.

4.2 - *Þróun próbótískra lifandi fæðudýra (Rf og Staður)*: Reynt var að hafa áhrif á örveruflóru lifandi fæðudýra og samsetningu hennar. Þetta var gert með því að nota bætibakteríur og “probiotic” gersveppinn Levucell við ræktun/auðgun fæðudýra á mismunandi tímum og fylgst var með þróun örveruflórunnar og lifun/fjölgun fæðudýra. Vegna erfiðleika við þróunarvinnuna hefur þessi undirverkpáttur verið framlengdur (vorið 2006).

4.3 - *Fortíraunir á notkun æskilegra baktería við böðun hrogna / lirfa (Rf, Staður, Keldur)*
Þróun mismunandi aðferða til að stýra örveruflóru hrogna og lirfa. Nánari lýsing á tírauninni er gefin undir verkþætti 0 – Tilraun 2005. Skoðaður var möguleiki á samfelldri (S1-S2) og ósamfelldri (S17-S18) notkun bætibaktería við böðun hrogna og lirfa. Festingareiginleikar og stöðugleiki æskilegra baktería voru metnir með örverumælingum. Einnig voru lífeðlisfræðilegir þættir hrogna/lirfa skoðaðir ásamt lifun þeirra og örverufræðilegu ástandi, auk ónæmisfræðilegra þátta lirfa.

a) *Mælingar framkvæmdar af Rf*: örverumælingar á sjó, hrognum og lirfum (meltingavegur) og fylgst með lifun og þyngd/lengd lirfanna með aðstoð starfsfólks á Stað.

b) *Mælingar framkvæmdar af Keldum*: Sýni voru tekin sömu daga og hjá Rf, sjá mynd 1. Meðan lirfur voru mjög smáar þurfti að takmarka sýnatöku, einkum til próteingreiningar. Alls voru tekin 26 sýni (nokkrar lirfur í hvert skipti) í formalín til vefjameinafræði rannsókna. Meðhöndlun þeirra var þannig háttáð að þau má einnig nota til *in situ* PCR greininga. Til rafdráttar (2D) voru tekin 3 sýni og 9 sýni í RNAlater fyrir PCR greiningu. Þessi sýni eru varðveitt og hluti þeirra verður valinn til úrvinnslu með hliðsjón af heildarniðurstöðum úr þessum verkþætti. Lífspróttur baðaðra lirfa var metinn í seltuþolsprófi (Dherts próf). Tiltekinn fjöldi lirfa úr öllum tíraunahópum er settur í sjó með vaxandi saltstyrk (sjávarsalti bætt í) og fjöldi dauðra einstaklinga talinn eftir 20, 40, 60 og 90 mínútur.

4.4 - *Fortíraunir með notkun próbótískra lifandi fæðudýra (Rf, Staður, Keldur)*

Samanburður á notkun próbótískra (S5-S6) og hefðbundinna (S3-S4) lifandi fæðudýra. Nánari lýsing á tírauninni er gefin undir verkþætti 0 – Tilraun 2005. Mat á lifun, lífeðlis- og ónæmisfræðilegum þáttum lirfa og kortlagning örveruflórunnar ásamt mati á festingareiginleika og stöðugleika bætiörvera í meltingarvegi lirfa.

a) *Mælingar framkvæmdar af Rf*: örverumælingar á sjó, hjöldýrum og lirfum (meltingavegur) og fylgst með lifun og þyngd/lengd lirfanna með aðstoð starfsfólks á Stað.

b) *Mælingar framkvæmdar af Keldum*: Vísa í 4.3.b

4.5 - *Notkun æskilegra baktería við seiðaeldi: böðun seiða*

Ákveðið var að skoða notkun bætibakteríanna í sitt hvoru lagi við seiðaeldi haustið 2005 til að fá úr því skorið hvaða baktería væri æskilegust og hvort notkun þeirra hafði áhrif á ónæmiskerfi, líffæri og vöxt seiðanna, auk þess að kanna sérstaklega viðveru þeirra á roði, tálknum og meltingarvegi seiðanna. Um 30 g seiði voru sett í 8 ker (300L). Fjórir hópar voru skoðaðir: Þrjár mismunandi bætibakteríur (stofnar V41, 394, 279) og kontról, en 2 bakteríustyrkleikir (H-hærri og L-lægri) voru prófaðir. Böðunin með bætibakteríum var framkvæmd á d0-4-7-14-21, en sýni tekin á d0-7-12-28.

a) *Mælingar framkvæmdar af Rf*: örverumælingar á tálknum, roði, skúflanga, görnunum og sjó.
b) *Mælingar framkvæmdar af Keldum*: Blóðsýni voru tekin áður en meðhöndlun hófst, 5 talsins, og 5 úr hverjum 7 tilraunahópa á viku fresti eftir það, alls 110 sýni. Sermi var skilið frá blóðfrumum og fryst, ætlað til mælinga á anti-trypsin virkni, C3 mælingum og e.t.v. fleiri prófum. Bakteríurækt var gerð á nýra úr sömu fiskum til að kanna tilvist blóðborinna baktería. Auk þess voru tekin sýni í formalín fyrir vefjameinafræðilegar athuganir, 5-6 líffæri (tálkn, roð, hjarta, lifur, görn, nýra, milti) úr einum fiski, úr hverjum hópi, á hverjum sýnatökudegi. Á sama hátt voru tekin lifrarsýni í RNAlater til PCR greininga (líklega verður gerð greining á CRP og C3).

4.6 - *Úrvinnsla gagna og val forvarnaraðferða til frekari rannsókna (Rf, Keldur, Staður)*: ekki hafið – verður gert í mars-apríl 2006.

Mögnun og ræktun bætibaktería

Bakteríurnar, sem notaðar voru við hjóldýrarækt, voru ræktaðar í sérstöku ræktunarseiði við stofuhita í ca 48 klst. Viðhald bakteríustofnanna á Stað (Grindavík) var gert daglega og endurnýjun grunnræktarinnar var gerð vikulega af hálfu Rf til að útiloka mengun. Levucell SB20 var notað eins og það kemur frá framleiðandanum.

Bakteríurnar sem notaðar voru við böðunartilraunirnar voru ræktaðar á föstu æti. Vökvarækt (48 klst við 15°C) var notuð til að sá (0,5 ml) á agarskálar sem voru ræktaðar við 15°C í a.m.k. 4 daga. Fyrir notkun (böðun) var 5 ml þynningarvökvi (artificial seawater, 50%) notaður á hverja skál til að leysa ræktina. Tvær til 4 skálar voru notaðar fyrir hvern bakteríustofn við mismunandi böðunartilraunir. Magn baktería í uppleystri rækt var um log 10-11/ml og var það geymt vel kælt til notkunar.

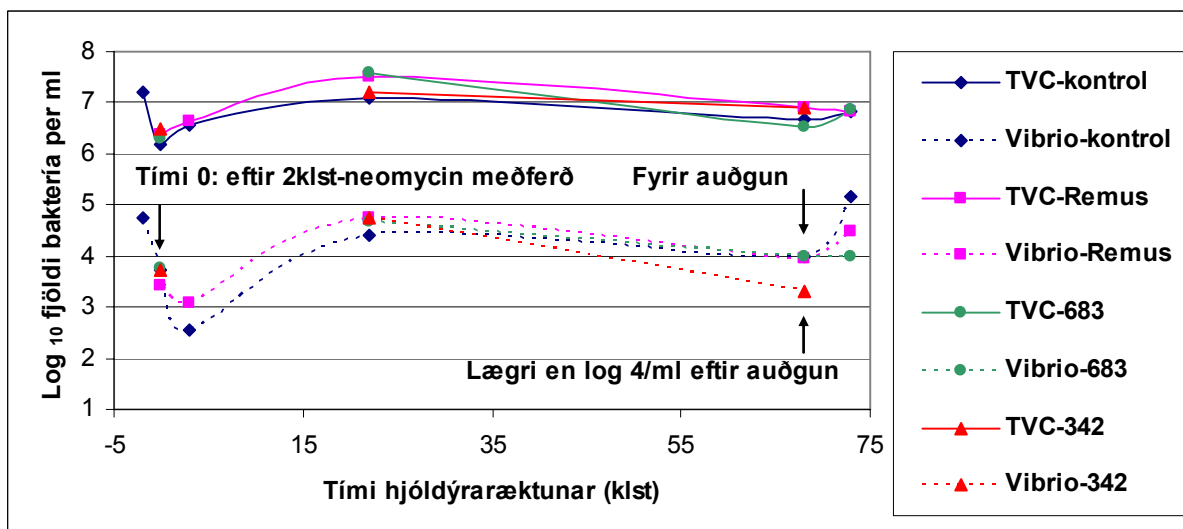
Þróun próbiotískra lifandi fæðudýra

Hjóldýrarækt

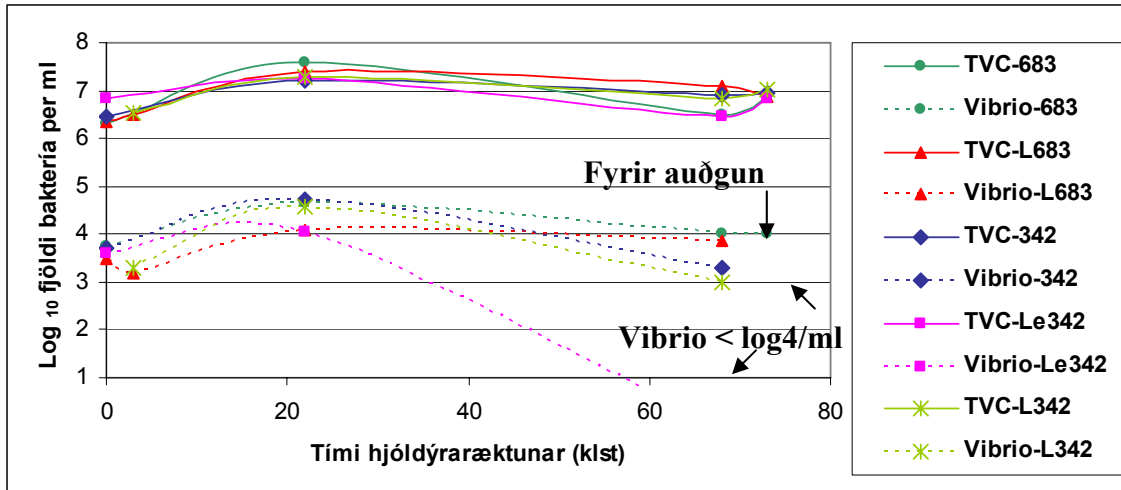
Eftir fyrstu hjóldýratilraun (án fituauðgunar) undir verkþætti 3 var önnur tilraun framkvæmd til að auðvelda val á æskilegum bakteríum við þróun próbiotískra lifandi fæðudýra. Þar voru stofnar #342 og 683 prófaðir, auk fáanlegrar “probiotic” blöndu (Remus, Avecom) og “probiotic” gersvepps (Levucell, Lallemand). Upphafstyrkur bætibakteríanna var log 4-5/ml, log 5-6/ml fyrir Levucell SB20 (L) en óþekkt fyrir Remus. Tilraunauppsetningin var með eftirfarandi 7 hópum: kontról án bætibakteríu, +342, +683, Remus, 342 +L, 342+Le (encapsulated Levucell SB10) og 683 +L og hver hópur var endurtekinn tvisvar sinnum; þéttleiki hjóldýranna var 500/ml við upphaf tilraunarinnar og heildarrúmmál ræktanna var 800 ml. Fylgst var með heildarfjölda örvera (TVC), *Vibrio* tegunda, mjólkursýrubaktería og

gersveppa. **Myndir 22 og 23** sýna þróun örveruflórunnar (meðaltalsgildi) í hjóldýraræktum sem fengu mismunandi bætibakteríur. Lítil munur var milli hópanna hvað varðar heildarörverufjölda (TVC) á ræktunartímabilinu, en *Vibrio* talningar gáfu til kynna að stofninn 342 hafði mest áhrif á lækkun þessarar bakteríutegundar (< log 4/ml eftir auðgun), og næst var það stofninn 683 (log 4/ml eftir auðgun vs. log 5/ml í kontról-hópnum). Notkun Levucell gersveppsins með stofn 683 (**mynd 23**) olli einnig lækkun á *Vibrio* fjöldanum eftir auðgun (< 4 log/ml). Það sem erfitt er að útskýra er að “líkleg” virkni bætibakteríanna tengist ekki vexti/lifun þeirra yfir hjóldýraræktunartímabilið. Fjöldi bætibakteríanna fór oftast lækkandi (niðurstöður ekki sýndar).

Fjölgun hjóldýranna gekk vel í öllum hópunum þrátt fyrir að erfitt væri að staðla aðstæðurnar fullkomlega (mismikil loftun). Við lok auðgunar var þéttleiki kontról-hópsins um 71% (meðaltal) meira en upphaflega. Mesta fjölgun (132-153%) var á hópnum með stofn 683 (+/- Levucell). Remus-hópurinn náði fjölgun upp á 96%. Fjölgunin hjá 342-hópnum var á bilinu 62-67%. Þessar niðurstöður samræmast ekki fjölda *Vibrio* tegunda sem mældist í þeim hópnum, þ.e. lægra magn *Vibrio* tegunda virðist ekki tryggja betri fjölgun (lifun) hjóldýranna.

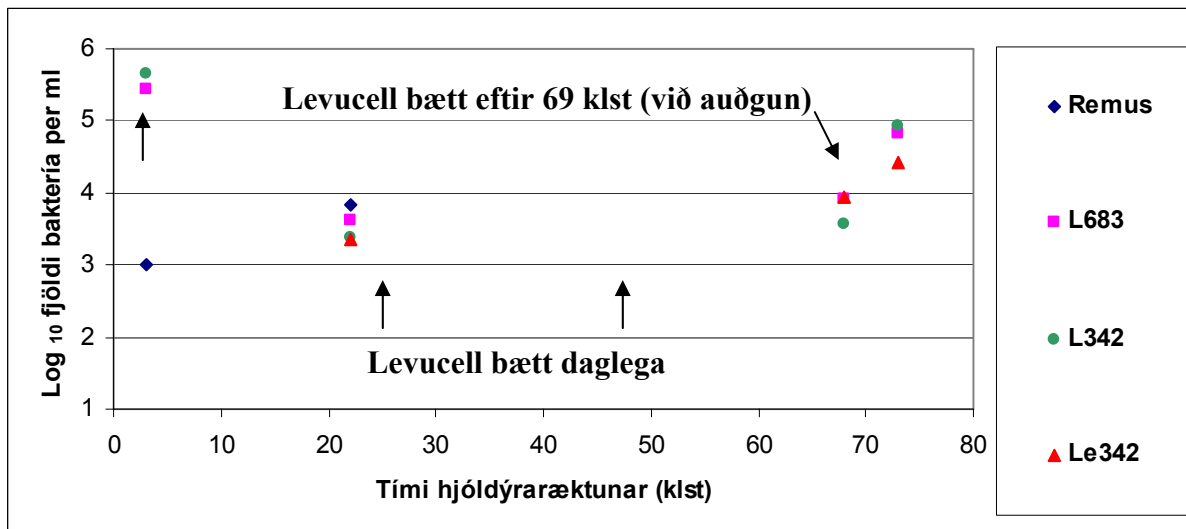


Mynd 22. Áhrif bætibaktería á örveruflóru hjóldýraræktanna fyrir og eftir auðgun



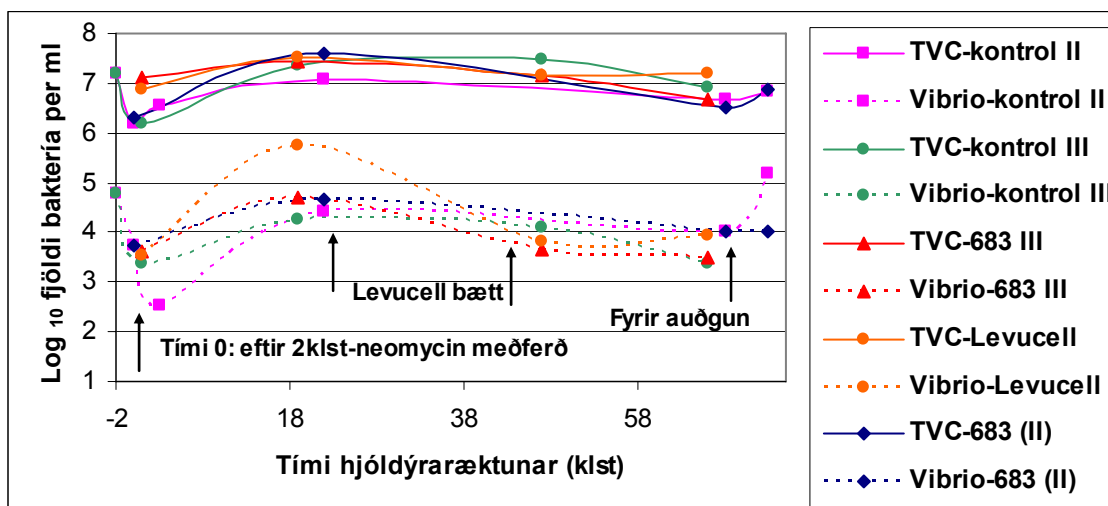
Mynd 23. Áhrif valdra bætibaktería með/án Levucell gersveppsins á örveruflóru hjóldýraræktanna fyrir og eftir auðgun

Mynd 24 sýnir hvernig fjöldi gersveppa þróaðist yfir hjóldýraræktunartímabilið, en Levucell var bætt við strax við upphaf tilraunarinnar og síðan daglega. Ekki mældist í upphafi í sýninu með Le (encapsulated Levucell) en líkleg skýring er að þetta form vörunnar hægir á “vöknun” (leysist hægar út í ræktina) gersveppsins. Það mældist svo sambærilega á hinum sýnatökupunktunum. Gersveppir mældust einnig í Remus-ræktinni snemma á tímabilinu. Ekki er vitað hvað Remus varan inniheldur, hugsanlega *Bacillus* tegundir og gersveppi.



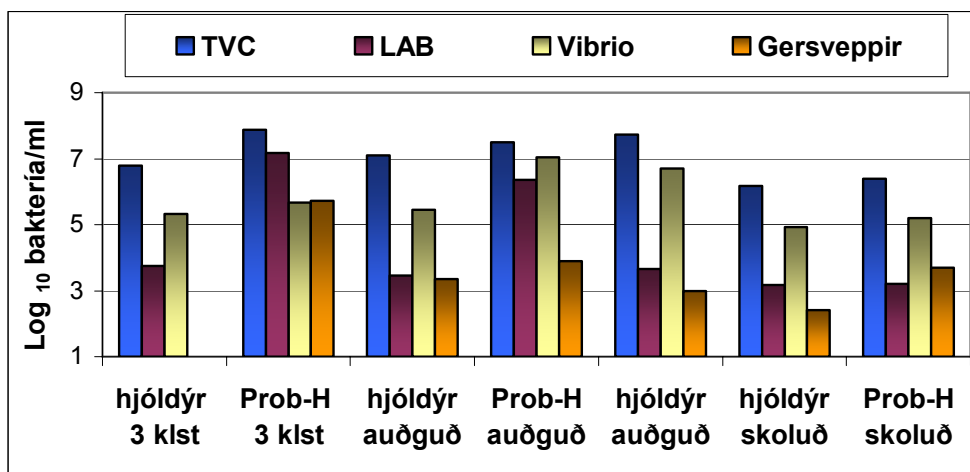
Mynd 24. Fjöldi gersveppa (DRBC æti) í hjóldýraræktunum fyrir og eftir auðgun

Síðasta hjóldýratilraun (III), sem var framkvæmd vorið 2005, hafði það markmið að endurtaka valda þætti úr fyrri tilraun til að staðfesta útkomuna. Tilraunauppsetningin var með eftirfarandi 3 hópum: kontról án bætibakteríu, +683 og +Levucell og hver hópur var endurtekinn tvisvar sinnum; þéttleiki hjóldýranna var 500/ml við upphaf tilraunarinnar og heildarrúmmál ræktanna var 800 ml. Upphafstyrkur bætibakteríanna var log 6-7/ml hjóldýraræktar og um log 6/ml fyrir Levucell SB20. Fylgst var með heildarfjölda örvera (TVC), *Vibrio* tegunda, mjólkursýrubaktería og gersveppa. Til samanburðar sýnir mynd 25 einnig niðurstöður úr fyrri tilrauninni (II). Hér var Levucell SB20 notað eitt og sér. Auðgun var ekki framkvæmd í þessari tilraun (III) en fjölgun hjóldýranna metin eftir 66 klst ræktun. Ekki virðist vera mikill munur milli þessara tveggja tilrauna m.t.t. örverumælinga, en herra heildarmagn örvera og *Vibrio* tegunda mældist oftast í sýnunum með Levucell. Upphafsfjöldi mjólkursýrubaktería í kontról-hópnum var um log 3/ml, en hann lækkaði yfir hjóldýraræktunartímabilið og var undir mælanlegum mörkum eftir 66 klst. Sömuleiðis varð lækkun á fjölda stofnsins 683 sem mældist ekki lengur við lok tilraunarinnar. Gersveppir voru settir út í hjóldýraræktunina á tímavarki 0-20-45 klst og mældust um log 4,4/ml eftir 66 klst. Hvað varðar fjölgun hjóldýranna við lok ræktunartímans voru meðalgildi eftirfarandi: 117% (kontról), 101% (Levucell) og 83% (stofn 683). Þetta er ágæt “uppskera” en samræmist ekki alveg fyrri tilraunum. Erfitt er að átta sig á hvað veldur þessum mismun. Örveruniðurstöðurnar geta í raun og veru verið villandi þar sem fjöldinn er gefinn per ml, en í hverjum ml eru mismargir einstaklingar (hjóldýr) með mismikið af örverum.



Mynd 25. Áhrif bætibaktería eða Levucell á örveruflóru hjóldýraræktanna fyrir og eftir auðgun

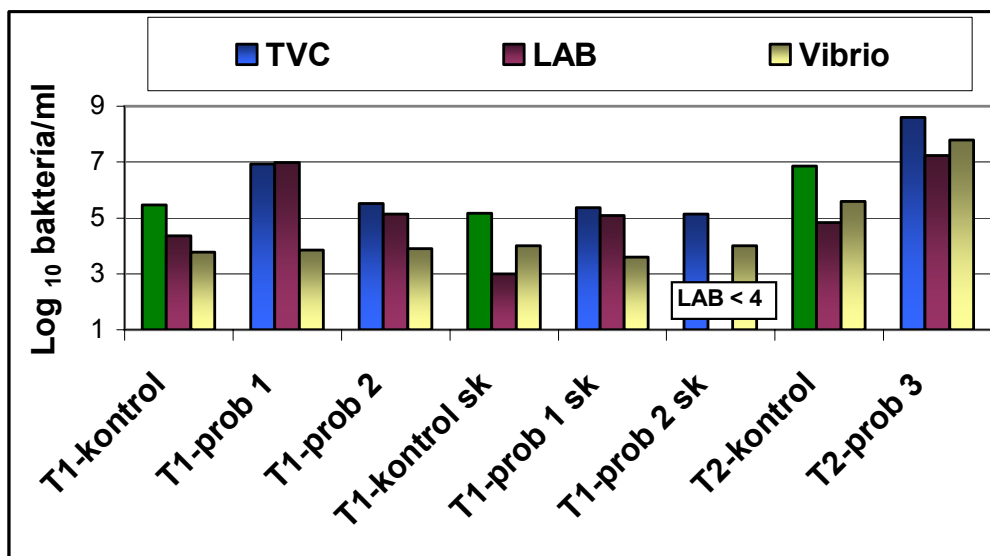
Fyrir aðaltilraunina vorið 2005 var **framleiðsla á próbíótískum lifandi hjóldýrum** reynd. Þar sem fjöldi bætibaktería hafði yfirleitt fallið með tíma við hjóldýraræktun, var ákveðið að bæta þeim rétt fyrir auðgun í sérilátum og dagsskammtur fyrir lirfusílóin S5 og S6 (sjá verkþátt 4.4 og tilraunauppsetningu/lýsingu undir verkþætti 1 – *Tilraun 2005*) framleiddur daglega. Tveir bakteríustofnar urðu fyrir valinu (#342 og 683) auk Levucell gersveppsins. Lokastyrkur bætibakteríanna var um log 6-7/ml hjóldýraræktar við upphaf auðgunar og magn Levucell sem var notað, 50 mg, samsvaraði um log 6 gersveppir/ml. Eins og sést á **mynd 26** voru gersveppir og/eða mjólkursýrubakteríur til staðar náttúrulega í hjóldýrum við eða eftir auðgun og skoluð. Þessar mælingar voru framkvæmdar á 4 mismunandi sýnatökupunktum og þannig er ekki hægt að tengja saman breytingar á örveruflórunni á mismunandi stigum hjóldýraræktunarinnar. Mælingarnar sýna að “probiotic” meðhöndlun hjóldýra getur leitt til mikils *Vibrio* fjölda eins og sést í nýlega auðguðum hjóldýrum (log 7/ml) í samanburði við kontról-hjóldýr (log 5,5/ml), en of mikið magn Levucell getur valdið því (Joël Gatesoupe, skriflegar upplýsingar). Lítil munur var reyndar á skoluðum hjóldýrum hvort sem þau höfðu fengið “probiotic” meðferð eða ekki, nema hvað gersveppafjöldinn var hærri í þeim sem fengu Levucell. Líklegt er að gersveppurinn hafði komið sér vel fyrir í meltingarvegi hjóldýrana. Örverumælingar á skoluðum hjóldýrum gefa til kynna hvernig örveru-samsetning er að finna á yfirborði og í meltingarvegi þeirra. Frekari rannsóknir á örveruflóru þessarra sýna munu leiða í ljós hvernig hún var samsett og hvort eða hvernig “probiotic” meðferðin hafði áhrif.



Mynd 26. Örverumælingar í hjóldýraræktum við auðgun (3klst), eftir (auðguð í 12 klst) og skoluð. Prob-H merkir hjóldýr sem fengu bætibakteríur og Levucell við upphaf auðgunar.

Artemíuauðgun

Svipaðar tilraunir voru framkvæmdar við artemíuauðgun. Fyrsta tilraunin (T1) skoðaði áhrif tímasetningar við auðgun, þ.e. hvort betra væri að setja bætibakteríurnar (stofnar 342 og 683) og Levucell í upphafi (24 klst við auðgun) eða á miðpunkti (12 klst við auðgun). Önnur tilraun (T2) kannaði þriðja möguleikann, þ.e. að setja fyrst bætibakteríurnar (24 klst við auðgun) og svo Levucell eftir 12-klst auðgun (á miðpunkti). Tekið skal fram að við skolun á artemíuræktum var einnig 5-föld þétting á þeim (5 sinnum fleiri einstaklingar per ml) og þannig var reynt að staðla magn fæðudýra í 1L rúmmáli. Mælingar úr fyrsta tilrauninni sýna að svipaður *Vibrio* fjöldi var milli sýna, þó hann var lægstur í Probiotic-1 meðferð eftir skolun (T1-prob1 sk) og með hátt magn af mjólkursýrubakteríum (log 5,1/ml) (**mynd 27**). Áhugavert er að benda á að heildarfjöldi örvera og mjólkursýrubaktería í “probiotic” hópunum lækkaði töluvert (tæplega 2 log) við skolun á meðan *Vibrio* fjöldi breyttist lítið. Örverusamsetning skolaðra sýna endurspeglar að öllum líkindum hvaða örveruhópa er að finna í ríkjandi mæli í meltingarvegi fæðudýranna. Ekki virtist gersveppurinn Levucell “festast” vel við meltingarveg artemíunnar þar sem fjöldi gersveppa var lægri (niðurstöður ekki sýndar) en það sem greint var hjá hjóldýrunum. Tilraun 2 sýnir að ekki tekst alltaf vel við auðgun (T2-kontról og T2-prob3) þar sem fjölgun örvera getur farið úr böndum. Frekari athuganir á “probiotic-1” meðferð verða gerðar vorið 2006 til að staðfesta velgengni hennar.



Mynd 27. Örverumælingar í auðguðum artemíuræktum (24 klst) fyrir og eftir skolun (sk). T1 merkir fyrsta tilraun en T2 önnur tilraun; prob1 = 24-klst probiotic meðferð, prob2 = 12-klst probiotic meðferð, prob3 = bætibakteríur í 24 klst en Levucell í 12 klst. TVC-kontról hópanna er merkt grænt.

Fortilraunir á notkun bætibaktería við böðun hrogna/lirfa

Greint var frá afkomutölunum við tilraunina vorið 2005 (**Tafla 1** í verkþætti 0) og í ljós kom að besta meðalafkoman ($20,7\% \pm 20,1$) var þegar bætibakteríurnar (V41+279+394) voru notaðar “samfellt” (á völdum dögum) fyrir og eftir klak (hrognasending #1). Lægri meðalafkoma ($5,0\% \pm 5,8$) fékkst ef böðunin fór eingöngu fram eftir klak (hrognasending #2). Eins og fráviksgildin gefa til kynna var mikill munur innan hópanna og erfitt verður að alhæfa um niðurstöðurnar með vissu. Samt sem áður sýnir samanburður við viðeigandi kontról-hópanna ($S3-S4_{\text{hrogn 1}} = 8,5\% \pm 10,5$; $S27-S28_{\text{hrogn 2}} = 2,3\% \pm 3,2$) að lifunin var að meðaltali hærri hjá hópunum sem fengu bætibakteríur. Hvað varðar afkomu hrogna virðist böðun með bætibakteríum hafa leitt til aðeins betri útkomu ($60,3\%$ vs. $57,7\%$ fyrir kontról-hrognin). Frekari rannsóknir á örveruflóru valdra sýna munu leiða í ljós hvernig hún var samsett og hvort eða hvernig bætibakteríu-meðferðin hafði áhrif.

Fortilraunir með notkun probíótískra lifandi fæðudýra

Í sömu afkomutöflunni kemur fram að fôðrunartilraunin með probíótískum lifandi hjóldýrum gekk alls ekki vel þar sem meðalafkoma lirfa (S5-S6) var $0,2\% \pm 0,1$. Líklegasta skýringin er að þróun slæmrar örveruflóru átti sér stað í þeim fæðudýrum sem fengu meðhöndlun með stofnum 342 og 683 með viðbættum Levucell gersveppum. Örverumælingarnar (sjá **mynd 26**) sýndu að *Vibrio* fjöldinn var alltaf hærri í probíótískum auðguðum hjóldýrum. Áhrif meðhöndlunar á örveruflórunni verða einnig skoðuð við frekari greiningar á PCR-sýnum. Nauðsynlegt er að vinna betur að þróun probíótískra lifandi hjóldýra ef á að nota slíka fôðrunaraðferð við aðaltilraunirnar næsta vor.

Rannsóknir á Keldum við klaktíð 2005 (8 síló-tilraun)

Seltuþolspróf

Þetta próf var gert tvisvar. Í fyrra sinnið (14/6, 20 daga eftir klak) kom ekki fram munur milli meðhöndlaðara (böðun með bætibakteríum eða fôður með bætibakteríum) og ómeðhöndlaðra hópa. Viku seinna var slíkur munur til staðar og reyndist seltuþol baðaðra hópa meira en óbaðaðra, sem kom skýrast fram í tvöföldum saltstyrk, **tafla 7**.

Tafla 7. Baðaðir lirfuhópar (síló 1+2 og 18) og samanburðarlirfur (síló 3+4) voru hafðir í mismunandi saltstyrk, O:32 ppm, A: tvöfaldur, B: þrefaldur og C: fjórfaldur, og dauði skráður við 20, 40, 60 og 90 mínútur.

21.6.2005	Hópar			% dauði		
Meðh	1+(2)	3+(4)	18	1+(2)	3+(4)	18
O 20 min	1/28	0/18		3,6	0	
A 20 min	0/26	0/25	1/20	0	0	5
B 20 min	4/29	4/28	4/24	13,8	14,3	16,7
C 20 min	26/28	27/29	12/12	92,9	93,1	100
O 40 min	2/28	0/18		7,1	0	
A 40 min	0/26	9/25	2/20	0	36	10
B 40 min	27/29	23/28	11/24	93,1	82,1	45,8
C 40 min	28/28	29/29	12/12	100	100	100
O 60 min	2/28	0/18		7,1	0	
A 60 min	8/26	10/25	3/20	30,8	40	15
B 60 min	29/29	28/28	21/24	100	100	87,5
C 60 min	28/28	29/29	12/12	100	100	100
O 90 min	3/28	1/18		10,7	5,6	
A 90 min	10/26	20/25	5/20	38,5	80	25
B 90 min	29/29	28/28	22/24	100	100	91,7
C 90 min	28/28	29/29	12/12	100	100	100

Niðurstöður seltupolsprófsins vekja vonir um að hægt sé að nota það til að meta lífsþrótt lirfa, a.m.k. eftir að a.m.k. 4 vikur eru liðnar frá klaki. Þetta verður þó að staðfesta með endurteknum athugunum. Síðar á árinu verður valið úr sýnum sem voru tekin í vefjameinafræði, PCR greiningu og próteingreiningu (2D rafdrátt) m.t.t. fyrirleggjandi niðurstaðna. Síðast nefnda aðferðin verður komin í notkun á Keldum á hausti komanda, en meistaraþrófsnemi mun fara til Aberdeen í ágúst til að læra aðferðina. Tæki hefur þegar verið keypt.

Notkun bætibaktería við seiðaeldi: böðun seiða - haustið 2005

Forniðurstöður: örveru- og vaxtarmælingar

Þessari tilraun er nýlega lokið og úrvinnsla gagna vegna örverumælinga ekki fullunnin. Einnig bíða ýmis sýni frekari greiningar með T-RFLP. Tilgangurinn var að meta hvort bætibakteríurnar, sem notaðar voru vorið 2005 í blöndu en **nú í sitt hvoru lagi** og við mismunandi styrk, var að finna eftir ákveðinn tíma (3-4 eða 7 daga) í eldiskerfinu, á eða í seiðunum og hvort slík meðhöndlun hafði áhrif á vöxt, líffæri og/eða ónæmisviðbrögð seiðanna. Sýni (n = 127) af tálknum, roði, skúflanga, görnunum og eldisvökvanum voru

rannsókuð úr 7 kerum (2 x 3 bætibakteríur (V41, 279 eða 394) + 1 kontról) yfir 28 daga tímabil, m.t.t. heildarfjölda örveru, *Vibrio* tegunda og mjólkursýrubaktería. Notuð voru þrjú seiði sameinuð í eitt sýni per ker við hverja sýnatöku á d0-7-14 og 28. Tveir bakteríustyrkir voru notaðir við böðun: lægra magn (L: um log 5/ml) og hærra magn (H: um log 6/ml). **Tafla 8** sýnir útreiknaðan vaxtarhraða seiða (upphaflega um 31 ±7 g) fyrir hverja meðhöndlun yfir 28 daga tímabil. Annað kontról var haft til viðmiðunar (kontrol 2) en engin seiði voru tekin úr því og minni/engin meðhöndlun/streituáhrif á seiðum hljóta að skýra vaxtarmuninn milli þessara tveggja kontról-hópa. Annars kom í ljós að hraðari vöxtur var hjá hópnum sem var baðaður með meira magni af stofni # 279. Áhugavert verður að skoða nánar niðurstöður þessarar tilraunar.

Tafla 8. Leiðréttur vaxtarhraði (SGR % per dag) og fóðurfaktor eftir mismunandi meðhöndlun

Hópur	V41-H	V41-L	394-H	394-L	279-H	279-L	Kontrol 1	Kontrol 2
SGR leiðrétt	0,64%	0,66%	0,53%	0,57%	0,83%	0,64%	0,63%	0,74%
FF	1,40	1,35	1,54	1,53	0,95	1,34	1,34	0,99

Útkoma úr ræktun - Keldur

Sáð var úr 5 nýrnasýnum úr hverju 7 kera á blóðagar með salti við upphaf tilraunar og þrisvar eftir það, alls um 110 sýni. Úr flestum þessara sýna óx ekki neitt, en úr nokkrum þeirra örfáar þyrpingar líkar K-1 bakteríu, auk tveggja annarra gerða þyrpinga. Kekkjunarpróf til greiningar á *Yersinia ruckerei* voru gerð á 4 dæmigerðum þyrpingum og reyndust þær allar neikvæðar. Þetta kom ánægjulega á óvart, þar sem *Yersinia ruckerei* var útbreidd í stöðinni í nokkrar vikur áður en þessi tilraun hófst.

Sýnataka fyrir PCR og 2D rafdrátt

Síðar á árinu verður valið úr sýnum sem voru tekin í vefjameinafræði og PCR greiningu.

Blóðsýni: próf á vessabundnum þáttum

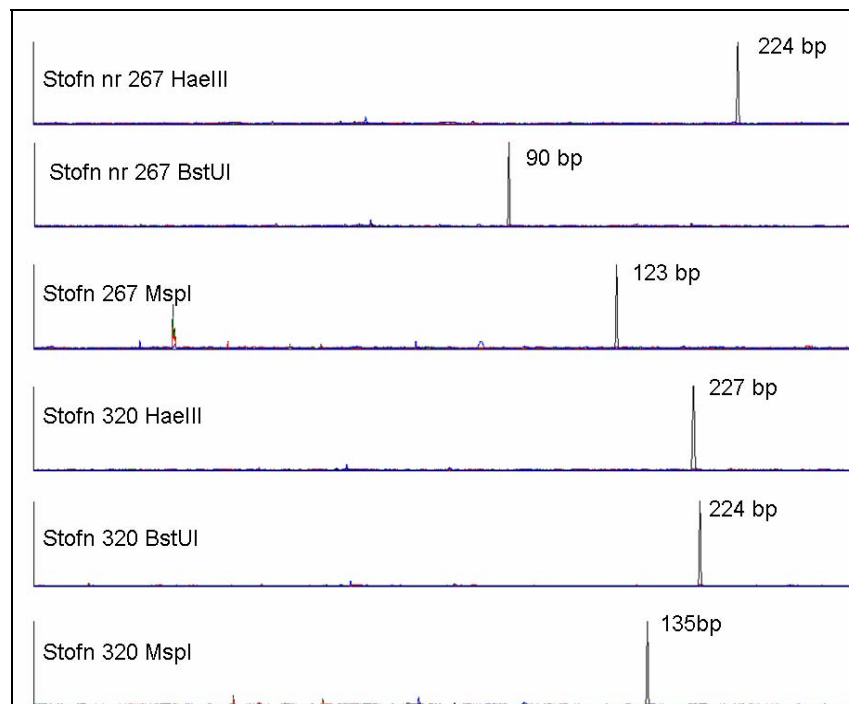
Verða gerð á yfirstandandi ári.

2.2 – B- Flokkun örvera – probiotika tilraunir (lúða og þorskur)

Þessi skýrsla lýsir framkvæmd og framvindu tilrauna sem framkvæmdar voru í lúðueldi og þorskeldi á tímabilinu febrúar 2004 til desember 2005. Hér er lýst í stórum dráttum því sem hefur verið gert en ýtarlegri skýrsla (lokaskýrsla) mun verða gefin út vor eða sumar 2006. Þróuð var og sett upp aðferð til greiningar á umhverfisflóru með sameindafræðilegum aðferðum og sem síðan var notuð til greiningar sýna í þessum verkhluta. Í þessum verkþætti eru könnuð áhrif blöndu probiotik baktería á umhverfisflóru og afkomu lirfa á fyrstu stigum lúðueldis. Einnig er gerð tilraun með notkun þessarar blöndu á fyrstu stigum lúðu- og þorskeldis. Sýni voru tekin á mismundi stigum eldisins úr eldiseiningum með og án PRO-meðhöndlunar og rannsökuð m.t.t. kortlagningu bakteríuflóru. Gerður er samanburður á bakteríuflóru sem einangruð er með hefbundnum greiningaraðferðum (ræktanleg flóra) og sameindafræðilegum aðferðum (mynstur heildarflóru). Hér er greint frá þeim fimm verkþáttum B-hluta verkefnisins sem unnið var við á þessu lokatímabili B-hluta verkefnisins (frá vorinu 2004 fram í desember 2005).

Verkþáttur 1: Þróun/uppsetning sameindafræðilegra aðferða til flokkunar umhverfisflóru	
Upphaf: 1. mán. (maí 2004)	Lok: 12. mán. → <i>framlengt til 18.mán</i>
Markmið: að þróa/setja upp sameindafræðilegra aðferða til greiningar umhverfisflóru.	
Áætlaður afrakstur: Þróuð og uppsett sameindafræðileg aðferð (T-RFLP) til notkunar við greiningar á mynstri örveruflórunnar við mismunandi aðstæður í öðrum verkþáttum verkefnisins.	
Staða: Þessi verkþáttur tók lengri tíma en áætlað var, líkt og greint var frá í framhaldsumsókninni 2005. Verkþættinum lauk hins vegar í október 2005.	
Framkvæmd og niðurstöður: Sú aðferðafræði sem var valin kallast <i>terminal-restriction length polymorphisms</i> (T-RFLP) og hafa vísindamenn notað hana til að fá mynd af fjölbreytileika bakteríuflóru í umhverfissýnum. Aðferðin byggir á því að við PCR-hvarf eru notaðir flúrmerktir	

alhliða vísar (universal primers), sem eru hannaðir út frá varðveittu geni, yfirleitt 16S rRNA geni baktería [1-3]. PCR afurðin er síðan klippt með skerðiensími og klippta afurðin rafdrengin í geli í raðgreiningartæki með mikla aðgreiningarhæfni, t.d. ABI310. Greiningartæknin liggur í því að mismunandi bakteríutegundir má nú greina í sundur á því hve skerðiensímið klippir langt frá 5'endanum sem er merktur og myndar þannig mislanga DNA búta eftir því hvaða tegund á í hlut. Bútarnir eru síðan sýndir sem toppar á grafi. Fjöldi toppa í grafinu gefur því til kynna fjölda tegunda, hæð þeirra hlutfallslegt magn hveggar tegundar og stærð þeirra (í basapörum) er ákvörðuð með innri stærðarstaðli [1]. Aðferðin felur í sér allmörg skref, allt frá einangrun á DNA, PCR hvarfi, klippingu afurðar og keyrslu í ABI raðgreini, en búið er að aðlaga öll skref til að fá sem besta og áreiðanlegasta útkomu.



Mynd 28. Hér má sjá T-RFLP munstur frá stofnum 320 og 267 sem notaðir voru í aðferðaþróuninni. Klippt var með þremur ensímum eins og tilgreint er á myndinni. Niðurstaðan var í flestum tilvikum áberandi toppar sem pössuðu við spáða stærð miðað við 16S rRNA röð tegundanna. (Myndirnar eru gróflga skalaðar hver við aðra)

Um þessar mundir er verið að einangra DNA úr sýnum úr lúðueldi Fiskeyjar, sem safnað var á árunum 2004 og 2005. Áætlað er að PCR- og T-RFLP vinnu við sýni ljúki vorið 2006 og verður greint frá niðurstöðum í lokaskýrslu um B-hluta verkefnisins (skýrsla áætluð í maí 2006).

Einnig hefur DNA verið einangrað úr sýnum úr þorskeldinu á Stað við Grindavík, sem safnað var á árunum 2004 og 2005, og er PCR- og T-RFLP vinna á þeim sýnum þegar hafin.

1. Liu, W.T., T.L. Marsh, H. Cheng og L.J. Forney, *Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA*. Appl Environ Microbiol, 1997. **63**(11): p. 4516-22.
2. Moeseneder, M.M., J.M. Arrieta, G. Muyzer, C. Winter og G.J. Herndl, *Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis*. Appl Environ Microbiol, 1999. **65**(8): p. 3518-25.
3. Osborn, A.M., E.R. Moore og K.N. Timmis, *An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics*. Environ Microbiol, 2000. **2**(1): p. 39-50.

Verkþáttur 2: Kortlagning örveruflóru á fyrstu stigum lúðueldis með tveimur mismunandi aðferðum: sameindafræðilegum svo og hefðbundinni ræktun og greiningu ræktanlegrar flóru

Upphaf: 1. mán.

Lok: 18. mán. → *framlengt til 22.mán*

Markmið: að kortleggja örveruflóru lúðueldisins með tveimur mismunandi aðferðum: ræktanleg flóra annars vegar (Rf) og mynstur heildarflóru hins vegar (NÍA).

Áætlaður afrakstur: Samanburður á ræktanlegri örveruflóru og heildarörveruflóru á fyrstu stigum lúðueldis.

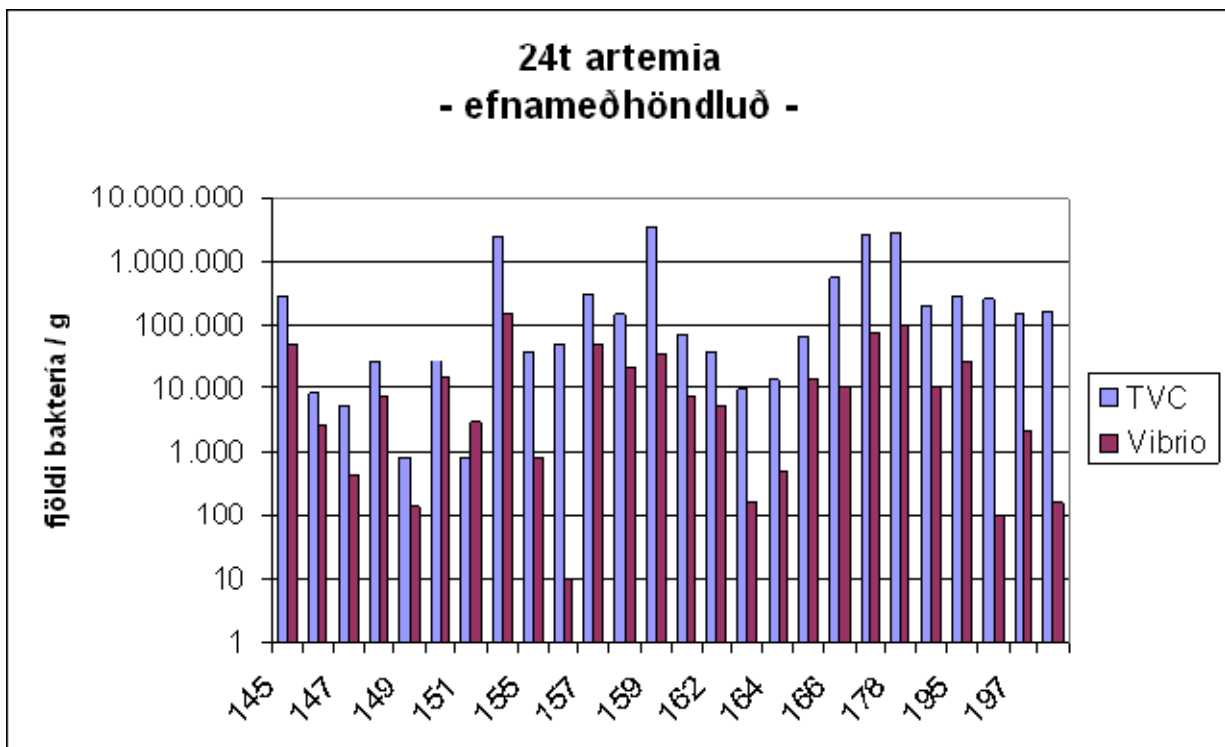
Staða: Þessi verkþáttur var framlengdur (úr 12 í 18 mán.) vegna erfiðleika við þróun og uppsetningu á sameindafræðilegri aðferð (T-RFLP) í verkþætti 1. Því var ákveðið að vinna í verkþætti 4 samhliða þessum (til samanburðar). Lokið er sýnatöku og greiningu ræktanlegrar örveruflóru úr sýnum teknum úr fódurdýrum og mismunandi eldiseiningum (hrognakerum, lírfusílóum og startfóðrunarkerum). Ræktanleg flóra var flokkuð til átta, ættkvísla og/eða tegunda m.t.t. lífefnafræðilegra eiginleika (um 10 mismunandi próf og stofnar úr hverjum hóp síðan flokkaðir nánar með API 50E staðfestingarprófi). Vinna við mat á heildarörveruflóru með sameindafræðilegum aðferðum á þessum sömu sýnum er langt komin, en beðið er með samanburð þessara aðferða þar til allar niðurstöður eru komnar (feb-apr 2006).

Framkvæmd og niðurstöður: Fyrrí rannsóknir sýna að örveruflóra er afar breytileg milli eldiskera, jafnvel með sama upplagi lirfa. Til að fá marktækar niðurstöður úr samanburði bakteríuflóru er því nauðsynlegt að hafa sýnafjölda fjölbreyttan (endurtekin sýnataka yfir lengra tímabil og úr fleiri eldiseiningum). Tekinn var fjöldi sýna úr fódurdýrum þar sem ákvörðun á bakteríuflóru í þeim er sérstaklega mikilvæg því þeim er dreift í allar eldiseiningar tvisvar á sólarhring (24t og 32t Artemia). Einnig voru tekin amk. vikulega sýni úr mismunandi eldiseiningum (hrognakerum, lirlfusílóum og startfóðrunarkerum) yfir >120 daga tímabil, til að kortleggja örveruflóru á fyrstu stigum eldisins. Árið **2004** voru jafnframt gerðar endurteknar (tvær) tilraunir með PRO blöndu þar sem tekin voru sýni úr: fódurdýrum (með og án meðhöndlunar), svo og vikuleg sýni úr hrognum/lirfum í 10 hrognakerum, 2 sílóum, 2 startkerum auk sýna af eldisvökva á sömu tímamarkum. Ávallt voru höfð viðmiðunarker á mótí hverri tilraunaeygingu (alls um 83 sýni).

Árið **2005** voru gerðar þrjár endurteknar á tilraunauppsetningu og sýni tekin vikulega frá upphafi hrognastigs til loka frumfóðrunar. Tilraunaeyningar voru samtals 25 tilraunaeyningar og 41 viðmiðunareining auk tilrauna á fódurdýrum (tilraunir bæði í klaki, 24 tíma artemíu og 32 tíma artemíu), samtals um 161 sýni. Gert var ráð fyrir alls 150 sýnum til þessa samanburðar en nauðsynlegt var talið að auka fjölda sýna til að fá nægilega góðan samanburð. Samtals hefur verið safnað um 160 sýnum úr ómeðhöndluðum fódurdýrum og mismunandi eldiseiningum til að kortleggja örveruflóru með tveimur mismunandi aðferðum í þessum verkþætti (samhliða voru tekin sýni úr meðhöndluðum eldiseiningum til að nota til samanburðar í verkþætti 4, alls um 244 sýni). Öll þessi sýni hafa verið greind með hefðbundnum aðferðum (fjöldi og samsetning ræktanlegrar flóru) og unnið er að greiningu með sameindafræðilegum aðferðum (mynstur heildarflóru baktería). Gert er ráð fyrir að þeirri vinnu ljúki feb-apr 2006.

Búið að meta sýni m.t.t. ræktanlegs örverufjölda og fjölda hugsanlegra *Vibrio* baktería með hefðbundinni ræktun á valætum (MA og TCBS). Auk þess sem valdar hafa verið 10-12 stofnar úr hverju sýni (um 1.900 stofnar) til áframhaldandi greiningar til ætta, ættkvísla og/eða tegunda m.t.t. lífefnafræðilegra eiginleika. Til þess eru notuð ýmis próf, s.s. KOH-próf, Oxidasa-próf, Katalasa-próf, sáð í MOF æti, næmni fyrir 0/129 og vöxtur á PCA (vanhæfni þess að vaxa í saltlausu æti). Stofnar úr hverjum hópi/flokki voru jafnframt greindir frekar með API50C. Ræktanlegir stofnar eru jafnframt greindir með sameindafræðilegum aðferðum svo hægt sé að gera samanburð á aðferðum og er sú vinna langt komin (lokið í feb-apr 2006).

Niðurstöður greiningar á ræktanlegri örveruflóru sýna m.a. að Artemían er mjög misjöfn að gæðum, bæði m.t.t. heildarfjölda bakteria (TVC) og fjölda *Vibrio* bakteria (sjá mynd 29). Niðurstöður greiningar stofna úr mismunandi eldiseiningum á fyrstu stigum eldisins benda til að í fôðurdýrum sé frekar einsleit bakteríuflóra, aðallega bakteríur af *Aeromonas* (*Vibrio/Aeromonas*) uppruna. Í hrognakerum virðist flóran fjölbreytilegri. Í sílóum (kviðpokalirfur) finnast einnig *Enterobacteraceae* (*Vibrio/Aeromonas*), en þegar komið er í startker verður flóran líkari þeirri sem er í fôðurdýrum (meira af *Vibrio/Aeromonas*). Beðið er með samanburð greiningaraðferða þar til allar niðurstöður eru komnar og verða þær kynntar í loksaskýrslu um B-hluta verkefnisins (skýrsla áætluð í maí 2006).



Mynd 29. Niðurstöður bakteríutalninga úr sýnum af fôðurdýrum sem notuð voru í tilraunir hjá líúðeldi Fiskeyjar. Myndin sýnir að artemían er mjög misjöfn að gæðum m.t.t bakteríuálags.

Verkþáttur 3: Ræktanleg örveruflóra greind með sameindafræðilegum aðferðum

Upphaf: 15. mán.

Lok: 21. mán. → 21-23.mán.

Markmið: að gera samanburð á mynstri ræktanlegrar flóru og heildarflóru baktería í fódurdýrum, eldisvökva og meltingarvegi lúðulirfa í eldi.

Áætlaður afrakstur: Samanburður á mynstri ræktanlegrar bakteríuflóru og mynstri heildarflóru baktería á fyrstu stigum lúðueldis – þ.e. hvaða hluti (hve stór hluti) flóru ræktast á hefðbundnum næringarætum í rannsóknarstofunni.

Staða: Búið er að greina öll sýni m.t.t. bakteríuflóru sem ræktast á hefðbundnum næringarætum á rannsóknarstofunni og unnið er að greiningu sýna með sameindafræðilegum aðferðum (NÍA). Reiknað er með að úrvinnslu verði lokið á áætluðum tíma (21.-23. mán).

Framkvæmd og niðurstöður: Í verkþætti 2 voru stofnar úr sýnum úr fódurdýrum (um 46 sýni), eldisvökva (um 18 sýni) og meltingarvegi lúðulirfa í eldi (um 96 sýni), greindir til ætta, ættkvísla og/eða tegunda m.t.t. lífefnafræðilegra eiginleika og notuð til þess ýmis próf (sjá verkþátt 2). Þessum hluta er lokið og hafa stofnar verið sendir til NÍA til greiningar með sameindafræðilegum aðferðum. Alls var gert ráð fyrir um 1000 stofnum til raðgreiningar í þessum áfanga en við endurskoðun verkefnis var ákveðið að til að fá marktækari niðurstöður í verkefninu, þyrfti endurteknar sýnatökur yfir lengra tímabil og úr fleiri eldiseiningum og verða greindir um 2000 stofnar með sameindafræðilegum aðferðum (10-12 stofnar úr 160 sýnum).

Vinna við einangrun DNA úr sýnum stendur yfir og er áætlað að PCR- og T-RFLP vinnan á þeim ljúki vorið 2006. Beðið er með samanburð á mynstri ræktanlegrar bakteríuflóru og mynstri heildarflóru baktería þar til allar niðurstöður eru komnar.

Verkþáttur 4: Meðhöndlun með probiotika

Upphaf: 13. mán. → 1. mán.

Lok: 18. mán. → 19. mán

Markmið: að kanna áhrif meðhöndlunar með ákveðinni blöndu probiotik baktería (PRO) á fjölda og samsetningu bakteríuflóru á fyrstu stigum lúðueldis.

Áætlaður afrakstur: Áhrif PRO-blöndu á fjölda og samsetningu bakteríuflóru á fyrstu stigum lúðueldis.

Staða: Ákveðið var að byrja fyrr á þessum verkþætti og unnið var samhliða í honum og verkþætti 2 (til samanburðar). Búið er að framkvæma fleiri endurteknar tilraunir á meðhöndlun með blöndu probiotik baktería (PRO) á ýmsum stigum eldisins. Úrvinnslu á fjölda og samsetningu ræktanlegrar flóru er lokið og unnið er að greiningu á mynstri heildarflóru. Gert er ráð fyrir að þeirri vinnu ljúki í feb-apr. 2006.

Framkvæmd og niðurstöður: Gerðar voru endurteknar tilraunir í **lúðueldi** Fiskeyjar ehf. á árunum 2004-2005, með PRO-meðhöndlun í mismunandi eldiseiningum, allt frá hrognastigi til loka startfóðrunar auk meðhöndlunar á fóðurdýrum. Hrogn og lirfur voru meðhöndluð með PRO að meðaltali fjórum sinnum á hverju stigi eldisins (hrogn-kviðpokastig-startfóðrun). Alltaf voru ómeðhöndlaðar einingar hafðar til viðmiðunar auk þess sem sýni voru einnig tekin úr eldisvökva í hluta tilrauna.

Tilraunir í þorskeldi voru framkvæmdar til að rannsaka áhrif PRO-blöndu á vöxt og afkomu þorsklirfa á fyrstu stigum eldisins auk áhrifa á bakteríuflóru í eldinu. Samtals voru tekin um 40 sýni (hrognaker og eldisvökvi) og gerður samanburður milli PRO-meðhöndlaðra og ómeðhöndlaðra hópa m.t.t. bakteríuflóru (heildarfjölda ræktanlegra baktería og fjölda *Vibrio* baktería) og afkomu lirfa.

Einnig verður mældur trypsín búskapur í þorskrognum og þorsklirfum sem meðhöndluð voru með PRO og ómeðhöndluð hrogn/lirfur höfð til viðmiðunar. Í þessum þætti felast m.a. mælingar á tjáningu trypsín afbrigðanna tveggja (mæling á mRNA með RT-PCR aðferð), svo og mælingar á virkni trypsínanna gagnvart tilbúnum hvarfefnum. Einnig er ætlunin að skoða nánar nokkur sýni þar sem breytileikinn er mikill á milli sýna með því að einangra og hreinsa trypsínin á sérstakri trypsín hreinsunarsúlu og staðfesta tilvist þeirra með Western blot aðferð þar sem notuð verða tilbúin mótefni gagnvart þorska trypsínum I og Y. Magn próteina verður mælt með Bradford-aðferð og gleypnimælingum við 280 nm.

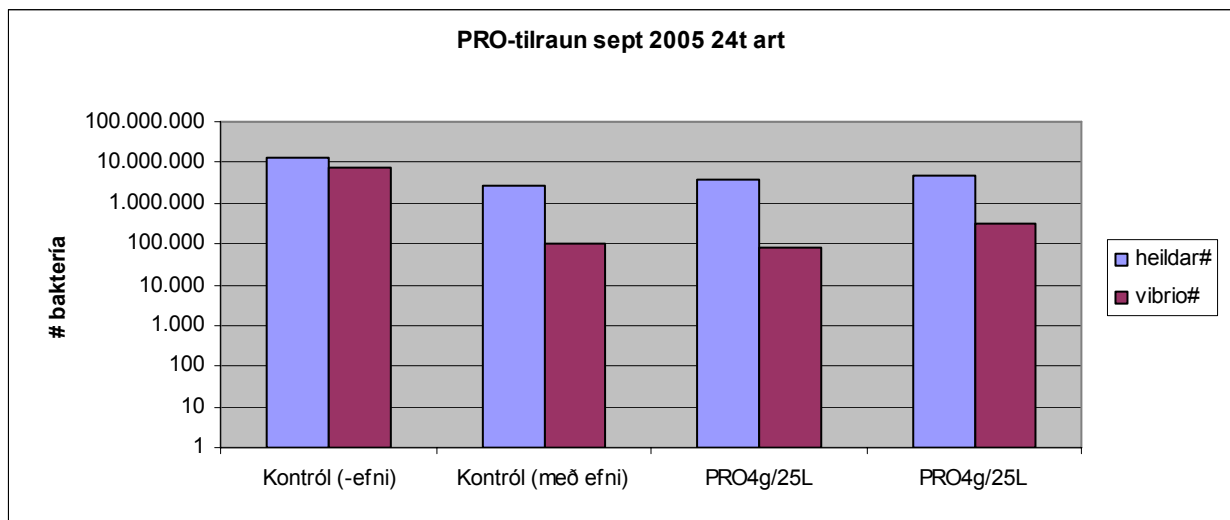
Þessi verkþáttur var unnin samhliða verkþætti 2 og var samtals safnað 244 sýnum úr lúðveldi Fiskeyjar ehf.:

- | | PRO | Viðmiðun |
|--|--------|----------|
| • Hrognaker | n = 27 | n = 39 |
| • Síló | n = 6 | n = 6 |
| • Startker | n = 6 | n = 10 |
| • Artemía : Tilraunir gerðar í klaki, 24 tíma artemíu og 32 tíma artemíu: um 70 sýni | | |

Áhrif meðhöndlunar hrogna/lirfa með PRO-blöndu eru metin samanborið við viðmiðunareiningar og m.t.t.:

- Vaxtar og lifunar
- Heildarfjöldi ræktanlegra baktería og fjöldi ræktanlegra *Vibrio* baktería (um 250 sýni)
- Tegundagreining ræktanlegrar flóru (10-12 stofnar úr hverju sýni, samtals 2000-2500 stofnar)
- Mynstur heildarflóru (PCR og T-RFLP), samtals um 250 sýni og 2000-2500 stofnar)

Eins og áður hefur komið fram er þetta tölvert meiri fjöldi sýna en upphaflega var gert ráð fyrir, þar sem betra þótti að fjölga eldiseiningum og fjölga sýnatökum til að fá sem marktækastar niðurstöður. Búið er að meta áhrif PRO-meðhöndlunar á mismunandi stigum, á vöxt og lifun hrogna/lirfa. Greiningar á ræktanlegri flóru er lokið og unnið er að úrvinnslu gagna. Ákvörðun á mynstri heildarflóru er í vinnslu og gengur vel. Fyrstu niðurstöður benda til að PRO-meðhöndlun sé að skila jafn góðri artemíu og efnameðhöndlun, en engin efnameðhöndlun kemur lang verst út m.t.t. fjölda baktería (sjá mynd 30). Áhugavert væri að gefa lúðulirfum PRO-meðhöndlaða artemíu og athuga hvaða áhrif það hefði á afkomu og bakteríuflóru eldiseininganna.



Mynd 30. Niðurstöður talninga á ræktanlegri bakteríuflóru (heildarfjöldi og fjöldi *Vibrio* baktería) á artemíusýnum með og án PRO-meðhöndlunar, og meðhöndlunar með mism. styrk PRO blöndu.

Unnið er að úrvinnslu niðurstaðna á fjölda *Vibrio* baktería svo og fjölda og samsetningar heildarflóru baktería m.t.t. áhrifa meðhöndlunar PRO-blöndu á mismunandi stigum eldisins. Helstu niðurstöður um meðhöndlun með PRO á mismunandi stigum eldisins benda til að PRO hafi ekki mikil áhrif á afkomu lirfa:

- Hrognaker: PRO: 54% kontról 57%
- Síló: PRO 36,4% kontról 42%
- Startker PRO: 64,8% kontról 78,3%

Aftur á móti er hugsanlega munur á fjölda gapara, en það er vansköpun á kviðpokastigi þar sem kjaftur lirfanna festist í opinni stöðu og þær drepast fljótlega eftir flutning í startfóðurker því þær geta ekki aflað sér fæðu. Öll síló meðhöndluð með PRO-blöndu reyndust hafa gaparaprósentu undir meðaltali en unnið er að frekari úrvinnslu þessara tilrauna.

Úrvinnslu gagna úr tilraunum í þorskeldi er að mestu lokið. Niðurstöður benda til að heildarfjöldi ræktanlegra baktería sé mjög breytilegur milli eldiseininga fyrstu daga í hrognakerum. Niðurstöður benda jafnframt til að meðhöndlun með PRO á lifrustigi og meðhöndlun hjóldýra auki lifun þorsklirfa í eldi.

Rannsókuð var tjáning og virkni trypsíns í sömu sýnum og gert er ráð fyrir að próteinmengjagreiningum verði lokið í lok febrúar 2006. Þá hefst greining sýna á trypsínbúskap sem gert er ráð fyrir að ljúki í júní 2006.

Verkþáttur 5: Samantekt og úrvinnsla	
Upphaf: 21. mán. (mars 2006)	Lok: 24. mán. → 25.mán
<p><i>Markmið:</i> samantekt og frágangur niðurstaðna.</p> <p><i>Áætlaður afrakstur:</i> Skýrsla til AVS sjóðsins og kynningar á niðurstöðum verkefnisins fyrir hagsmunaaðilum og áhugasömum. Niðurstöður verkefnisins verða jafnframt nýttar sem hluti af doktorsnámi Rannveigar Björnsdóttur (efni í fræðigreini/-greinar) og til meistaraþrófs Hildigunnar Rut Jónsdóttur við Auðlindadeild Háskólans á Akureyri.</p> <p><i>Staða:</i> Lokið er við að þróa og setja upp sameindafræðilega aðferð til greiningar umhverfisflóru. Framkvæmd tilraunanna er lokið, sýnatökum er lokið og vinnsla sýna að mestu lokið. Einungis stendur eftir greining á mynstri heildarflóru í hluta sýna með sameindafræðilegum aðferðum svo og greining á tjáningu og virkni trypsíns í sýnum úr þorskeldinu. Úrvinnsla niðurstaðna er hafin þ.e. niðurstaðna úr greiningum bakteríuflóru með hefbundnum ræktunaraðferðum svo og mat á áhrifum PRO meðhöndlunar á afkomu lirfa á fyrstu stigum lúðu- og þorskeldis. Beðið er með samanburð og úrvinnslu bakteríugreininga, þar til niðurstöður úr greiningum sýna með sameindafræðilegum aðferðum eru komnar (feb-apr 2006).</p>	

3. SAMANTEKT

3.1 – A-Forvarnir í þorskeldi

Greint hefur verið frá niðurstöðum úr ýmsum verkþáttum í A-hluta verkefnisins. Flestir verkþættir eru þó ennþá í vinnslu. Við **kortlagningu á örveruflóru þorskeldisins** var hrogna- og lirfutímabilið skoðað. Reynt var að fá fram það sem gerist í daglegum rekstri eldiststöðvarinnar á Stað, auk þess að skoða ómeðhöndlað og bakteríumeðhöndlað kerfi til samanburðar. Það hefur komið skýrt fram að varasamt er að einblína á heildartalningu örvera til að átta sig á velgengni eldiskerfa og að nauðsynlegt er að afla þekkingar á samsetningu örveruflórunnar. Örverugreiningum er ekki að fullu lokið og því miður ekki

hægt að lýsa áhrifum þessara mismunandi meðferða á þróun örveruflórunnar m.t.t. samsetningar í þessari skýrslu.

Efnamælingum við lúðveldi er að mestu lokið og fram kom að afkomutölur úr hrognakerum samræmdust mælingunum á ammóníaki, vetnissúlfíði, fosfór og heildar köfnunarefnum. Bent er á gagnsemi ammóníaksmælinga, sérstaklega á hrognastigi eða við notkun endurnýtingarkerfis, til að meta stöðuna og hugsanlega sjá fyrir afföllin. Einnig gætu daglegar mælingar á sýrustigi leitt í ljós óæskilegar breytingar í eldiskerfunum. Mælingar á málmum í eldisvökvanum á hrognastigi og svo í lirfum, seiðum og ýmsum fóðrunarþáttum sýna að engin greinileg uppsöfnun átti sér stað á þessu 6-mánaða tímabili. Athyglisvert er að við lok kviðpokastigsins voru lirfur úr endurnýtingarkerfinu með meira magn af málmum en kontról-lirfurnar. **Efnamælingarnar við þorskeldi** eru enn í vinnslu. Þegar allar niðurstöðurnar verða komnar verður hægt að meta hvaða þættir úr örveru- og efnamælingunum munu fara í fjölbreytugreiningu (multivariate analysis) til að skoða niðurstöðurnar í víðtækara samhengi og ákvarða hvaða þættir skipta máli. **Mat á þránun fituríkra fóðrunarafurða**, sem notaðar eru á fyrstu stigum lirfueldisins var framkvæmt. Úttektin gaf til kynna að þránun sé ekki stórt vandamál við fóðrun lirfa. Hins vegar mátti greinilega sjá þráaaukningu í gömlum sýnum, sem bendir til þess að fylgjast þurfi vel með gæðum og geymsluþoli fóðursins.

Til að **einangra, greina og velja bætibakteríur** til notkunar við *in vivo* tilraunir þyrfti að kanna margt. Eftir ákveðnu skímuferli meðal valdra bakteríuhópa, þ.e. mat á hindrunareiginleikum, kjörhitastigi, festigetun við fiskafrumumódel, blóðrofsvirkni og vaxtareiginleikum við ýmsar aðstæður, komu nokkrir bakteríustofnar til greina. Að lokum var **val bætibakteríanna** ákveðið miðað við ofangreindar athuganir og væntalega notkun við þorskeldi, annað hvort við þróun probíótískra lifandi fæðudýra (25-27°C) eða böðunartilraunirnar á hrognalirfustigi (8-14°C). Þá hófst **mikil þróunarvinna við undirbúning og framkvæmd ýmissa fortílauna** áður en aðal vortílauninni var hrundið af stað í apríl 2005. Reynt var að finna bestu leiðirnar til að búa til probíótísk lifandi fæðudýr og framleiðsla á slíkum hjóldýrum var borin saman við hefðbundna fóðrun lirfa. Ekki tókst það sem skyldi, þar sem mikil afföll voru í þeim lirfusílóum sem fengu probíótísk lifandi hjóldýr. Þar af leiðandi er frekari þróunarvinna framundan hvað varðar framleiðsla á slíkum

hjóldýrum. Hins vegar virtist þróun próbiotískrar artemíu ganga betur miðað við örverutalningarnar en hún hefur ekki verið sannprófuð við fôðrun á lirfum.

Notkun bætibaktería við böðun hrogna og/eða lirfa var skoðuð en samfelld böðun frá hrognastigi áfram yfir lirfustigið tókst nokkuð vel, þar sem meðalafkoma, þyngd og lífsþróttur lirfanna urðu hærri/meiri en í kontról-hópunum, en lægri afkoma fékkst ef böðunin var framkvæmd eingöngu eftir klak. Úrvinnsla gagna og frekari mælingar á ýmsum sýnum munu skýra betur hversu hagkvæm þessi meðferð var í raun og veru. Einnig var kannað hvaða áhrif notkun bætibakteríanna hafði á seiðaeldi þegar böðun var framkvæmd með hreinni rækt (ekki í blöndu) með mismunandi styrk og eftir ákveðinni tíðni. Tilrauninni er nýlukið og úrvinnsla gagna er enn í gangi ásamt fleiri mælingum. Ljóst er að þróun forvarnaraðferða er mjög tímafrek og vandasöm, og nauðsynlegt að vinna vel úr niðurstöðum áður en frekari ákvarðanir eru teknar. Þessi vinna, sem hefur verið lýst, lofar góðu og vonandi tekst í komandi tilraunum að finna réttar forvarnaraðferðir til að stýra þeim þáttum sem hafa áhrif á afkomu lirfa, skapa þeim æskilegt eldisumhverfi og möguleika til jafnari vaxtar og hámarksnýtingu fæðu.

3.2 – B- Flokkun örvera – probiotika tilraunir (lúða og þorskur)

Í þessum verkhluta er lögð áhersla á:

- þróun sameindafræðilegra aðferða (T-RFLP) til kortlagningar á mynstri örveruflóru á fyrstu stigum lúðueldis;
- samanburð á flokkun örveruflóru eldisins með sameindafræðilegum aðferðum annars vegar og ræktun á næringarætum og flokkun m.t.t lífefnafræðilegra eiginleika hins vegar
- fylgni milli vaxtar/afkomu lirfa, og þróunar örveruflóru (mynstur og breytingar á því), svo og m.t.t. efnaálags í eldinu;
- áhrif valinnar blöndu probiotika baktería (PRO) á fyrstu stigum lúðu- og þorskeldisins
- tjáning/virkni trypsíns á fyrstu stigum þorskeldis.

Fiskey ehf. og Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins (Rf)/Háskólinn á Akureyri (HA) hafa átt gott samstarf síðustu árin, sem leitt hefur til þess að í dag liggur fyrir góð vitneskja um ræktanlega örveruflóru í stríðeldi lúðulirfa og áhrif ýmissa þátta í eldinu á þróun þeirrar flóru. Með vöktun og eftirliti með eldisumhverfi lúðulirfa í startfóðrun hefur komið í ljós að unnt er að hafa nokkur áhrif á samsetningu örveruflóru og afkomu lirfa (rannsóknarverkefni unnin af Rf og styrkt af Rannís, 1998-2000 og 2001-2003). Markmið rannsókna á örverum í stríðeldi lúðulirfa er að geta stjórnað fjölda og ekki síst samsetningu þeirra. Afkoma lirfa í startfóðrun getur þannig orðið yfir 90% ef vel tekst til. Notkun "jákvæðra" og/eða probíotískra baktería gæti haldið niðri/komið í veg fyrir vöxt óæskilegra baktería í eldinu (tækifæris- eða sjúkdómsvaldandi baktería). Þannig mætti ná æskilegu jafnvægi sem yki lifun, vöxt og vellíðan lirfa og seiða. Umhverfisflóra baktería getur verið afar flókin að samsetningu, en þar er jafnan að finna samsafn margra mismunandi hópa/tegunda með mismunandi eiginleika. Til þess að geta skoðað og skilið samsetningu slíkra bakteríusamfélaga er mikilvægt að nota sameindafræðilegar aðferðir því þær eru óháðar ræktun og gera mögulegt að meta breytingar í eldinu og bregðast skjótt við. Með þessu verkefni hefur því verið aukið enn frekar við þekkingu sem aflast hefur í lúðueldi Fiskeyjar ehf. á þessu sviði.

Lokið er við að þróa og setja upp sameindafræðilega aðferð til greiningar umhverfisflóru. Framkvæmd tilraunanna er lokið, sýnatökum er lokið og vinnsla sýna að mestu lokið. Einungis stendur eftir greining á mynstri heildarflóru í hluta sýna með sameindafræðilegum aðferðum, svo og greining á tjáningu og virkni trypsins í sýnum úr þorskeldinu. Úrvinnsla niðurstaðna er hafin þ.e. niðurstaðna úr greiningum bakteríuflóru með hefbundnum ræktunaraðferðum svo og mat á áhrifum PRO meðhöndlunar á afkomu lirfa á fyrstu stigum lúðu- og þorskeldis. Beðið er með samanburð og úrvinnslu bakteríugreininga, þar til niðurstöður úr greiningum sýna með sameindafræðilegum aðferðum eru komnar (feb-apr 2006). Þegar allar niðurstöður liggja fyrir verður hægt að álykta um áhrif blöndu valinna probíotískra baktería (PRO) á afkomu og bakteríuflóru á fyrstu stigum lúðu- og þorskeldis.

4. ÞAKKARORÐ

AVS-sjóðnum er þakkað fyrir að gera þátttakendum kleift að framkvæma þessar rannsóknir og auka þannig þekkingu og stuðla að því að Íslendingar standist samanburð við nágrannaþjóðir sínar við eldi sjávartegunda fiska. Tilraunir verkefnisins eru framkvæmdar í eldisstöðvum og niðurstöður því áreiðanlegri en ef um tilraunaæiningar væri að ræða, en sem gerir það jafnframt að verkum að tilraunir eru afar kostnaðarsamar og mikill efniviður í húfi hverju sinni. Fyrirtæki sem eru þátttakendur í verkefninu (Fiskey, Hafró/Staður) leggja til aðstöðuna og hefði ekki verið hægt að framkvæma þessar tilraunir án þeirra. Viljum við aðrir þátttakendur í verkefninu þakka þeim fyrir ómetanlega aðstoð og velvilja.

5. HEIMILDIR

Agnar Steinarsson. 2002. Þorskseiðaeldi hjá Hafrannsóknastofnun. Erindi á “Stefnumótunarfundi”, Reykholti, 17-18. október 2002.

Alderson R. 1979. The effect of ammonia on the growth of juvenile dover sole, *Solea solea* (L.) and turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). Aquacult. 17: 291-309.

Auðunsson GA. 2002. Losun og afdrif efna frá fyrirhuguðu laxeldi Samherja hf í Reyðarfirði. Mat á samlegðaráhrifum/sammögnunaráhrifum vegna byggðar og annarrar atvinnustarfsemi í Reyðarfirði, þ.m.t. hugsanlegt álver í landi Hrauns og Sómastaðargerðis í Reyðarfirði. Ráðgjafarskýrsla Rf 02 - 02. Júní 2002.

Austin B, Stuckey LF, Robertson PAW, Effendi I, Griffith DRW. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. J. Fish Dis. 18, 93-96.

Barnabè G. 1994. On growing fish in intensive system. Aquaculture: biology and ecology of cultured species. In: Barnabè G. (Ed.), Ellis Horwood Series in Aquaculture and Fisheries support, bls. 353-356.

Belser LW. 1979. Population ecology of nitrifying bacteria. Ann. Rev. Microbio., 83: 171-176.

Bergh Ø. 1995. Bacteria associated with early life stages of halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., inhibit growth of a pathogenic *Vibrio* sp. J. Fish Dis. 18, 31-40.

- Ellis AE. 1988. Current aspects of fish vaccination. *Dis. Aquat. Org.* 4 (2), 159-164.
- El-Shafai SA, El-Gohary FA, Nasr FA, van der Steen NP, Gijzen HJ. 2004. Chronic ammonia toxicity to duckweed-fed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquacult.* 232 (1-4): 117-127.
- Focht DD & Verstraete W. 1977. Biochemical ecology of nitrification and denitrification. *Adv. Microb. Ecol.* 1, 135-211.
- Fuller R. 1989. Probiotics in man and animal. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 365-378.
- Handy RD. 2003. Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process? *Comp. Biochem. Phys. Part A* 135: 25-38.
- Hargreaves AH. 1998. Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. *Aquacult.* 166: 181-212.
- Heales D. 1985. Water quality changes during the conditioning of small, closed seawater systems. Report 176. CSIRO Marine Laboratories, Cleveland, Qld, Australia.
- Holby O & Hall POJ. 1991. Chemical fluxes and mass balances in marine fish cage farm. II. Phosphorus. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 70: 263-272.
- Hopkins JS, Hamilton RD, Sandifer PS, Browdy CL, Stokes AD. 1993. Effect of water exchange rate on production, water quality, effluent characteristics and nitrogen budgets of intensive shrimp ponds. *J. World Aquacult. Soc.* 24 (3): 304-320.
- Howarth RS & Sprague JB. 1978. Copper lethality to rainbow trout in waters of various hardness and pH. *Wat. Res.* 12: 455-462.
- Moe MA Jr. 1993. *The Marine Aquarium Reference: Systems and Invertebrates*. Green turtle Publications, Plantation, FL, 510 bls.
- Montes AJ, Pugh DG. 1993. The use of probiotics in food-animal practice. *Vet. Med.* 88, 282-288.
- Olsson JC, Westerdahl A, Conway PL, Kjelleberg S. 1992. Intestinal colonization potential of turbot (*Scophthalmus maximus*) and dab (*Limanda limanda*)-associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Appl. Env. Microbiol.* 58, 551-556.
- Robles-Martines C, Cervantes E, Ke P J. 1982. Recommended method for testing the objective rancidity development in fish based on TBARS formation. *Can. Tech. Rpt. Fish. Aquatic Sci.* 1089.
- SFT, 1997. *Klassifisering av miljøkvalitet i fjorder og kystfarvann*. Statens Fourengningstilsyn (SFT). Veiledning 97:03, Oslo.

- Sillén LG. 1965. Oxidation states of Earth's ocean and atmosphere: a model calculation on earlier states: the myth of prebiotic soup. *Achiv. Kem. Acta*: 431-456.
- Sissons JW. 1989. Potential of probiotic organisms to prevent diarrhoea and promote digestion in farm animals. A review. *J. Sci. Food Agric.* 49, 1-13.
- Spotte S. 1979. *Seawater Aquariums: The Captive Environment*. Wiley, NY, USA.
- Stanbridge LH, Board RG. 1994. A modification of the *Pseudomonas* selective medium, CFC, that allows differentiation between meat pseudomonads and Enterobacteriaceae. *Letters in Appl. Microbiol.* 18: 327-328.
- Svobodova Z, Machova J, Poleszczuk G, Huda J, Hamackova J, Kroupova H. 2005. Nitrite poisoning of fish in aquaculture facilities with water-recirculating systems. *ACTA VETERINARIA BRNO* 74 (1): 129-137
- Timmons MB, Ebeling JM, Wheaton FW, Summerfelt ST, Vinci BJ. 2002. *Recirculating Aquaculture Systems*, 2nd edition, Cayuga Aqua Ventures, NY, USA.
- Trépanier C, Parent S, Comeau Y, Bouvrette J. 2002. Phosphorus budget as a water management tool for closed aquatic mesocosms. *Wat. Res.* 36: 1007-1017.
- Westerdahl A, Olsson JC, Kjelleberg S, Conway P. 1991. Isolation and characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*)-associated bacteria with inhibitory effect against *Vibrio anguillarum*. *Appl. Env. Microbiol.* 57, 2223-2228.
- Westerdahl A, Olsson JC, Conway P, Kjelleberg S. 1994. Characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*)-associated bacteria with inhibitory effect against the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 41, 403-409.