

Vinnsla og vöruþróun
Processing and Product
Development

Líftækni
Biotechnology



Matvælaöryggi
Food Safety



Framleiðsla hjóldýra fyrir þorskeldi

Jónína Þ Jóhannsdóttir
Agnar Steinarsson
Rannveig Björnsdóttir

Vinnsla og vöruþróun

Skýrsla Matís 10-09
Mars 2009

ISSN 1670-7192

Titill / Title	Framleiðsla hjóldýra fyrir þorskeldi / Produksjon av kvalitetsrotatorier for oppdrett av torskeyngel		
Höfundar / Authors	Jónína Þ Jóhannsdóttir, Agnar Steinarsson, Rannveig Björnsdóttir		
Skýrsla / Report no.	10-09	Útgáfudagur / Date:	Mars 2009
Verknr. / project no.	1303-1872	Mars 2009	
Styrktaraðilar / funding:	Nordisk Atlantsamarbejde (NORA)		
Ágríp á íslensku:	<p>Mikill áhugi er fyrir því að leita leiða til að stjórna eldisaðstæðum á öllum stigum fiskeldis. Stýring örveruflóru í umhverfi og meltingarvegi lirfa er m.a. talið geta dregið úr afföllum sem verða á fyrstu stigum eldis sjávarfiska. Mikill fjöldi baktería fylgir að jafnaði fóðurdýrum í þorskeldi en notkun endurnýtingarkerfa við ræktun hjóldýra hefur meðal annars þá kosti að minni fjöldi baktería nær fötfestu í kerfunum samanborið við loturæktir. Notkun bætibaktería til stýringar bakteríuflóru hefur aukist mikið á liðnum árum og hefur í sumum tilfellum stuðlað að auknum vexti og gæðum lirfa.</p> <p>Jafnframt því að efla samstarf þorskseiðaframleiðenda á Norðurlöndum þá er markmið verkefnisins að þróa aðferðir sem auka stöðugleika og hagkvæmni í framleiðslu fóðurdýra. Byggt er á endurnýtingarkerfi sem hannað var af Sintef í Noregi og er í þessum hluta rannsókuð áhrif og viðvera valinna bætibaktería í kerfinu. Helstu niðurstöður meðhöndlunar með tveimur völdum bakteríustofnum sýndu að hjóldýrin þöldu vel meðhöndlunina og aukin uppskera dýra fékkst við meðhöndlun með bakteríunum í frostþurrkuðu formi. Mikil fækkun varð á fjölda baktería í lífhreinsi við meðhöndlun með fljótandi bakteríurækt og náði bakteríufjöldi í lífhreinsi ekki upphaflegum fjöldi á því tímabili sem tilraunin stóð yfir, en nokkur aukning varð þó í fjölda mjólkursýrubaktería. Þó svo magn mjólkursýrubaktería í hjóldýrum hafi aukist fyrst eftir meðhöndlun þá reyndust bætibakteríustofnar ekki ná fötfestu í kerfinu eða leiða til breytinga á samsetningu bakteríuflórunnar þegar meðhöndlað var í þessum styrkleika.</p> <p>Verkefnið er styrkt af Nordisk Atlantsamarbejde (NORA) og unnið í samvinnu Matís, Hafrannsóknastofnunar, SINTEF, Fiskaaling, IceCod og Stofnfisks auk Nordland Marin Yngel.</p>		
Lykilorð á íslensku:	<i>Hjóldýr, endurnýtingarkerfi, bætibakteríur</i>		
Summary in English:	<p>There is an increasing interest in controlling environmental parameters during the first production stages of aquaculture and controlling bacterial numbers is among various environmental parameters that are believed to promote increased survival of larvae. Elevated bacterial numbers are introduced into the system through the live feed, but numbers of bacteria have been found to be greatly reduced by the use of recirculation culturing system as compared with batch culturing systems. Furthermore, the use of potentially probiotic bacteria in aquaculture has increased over the past years and has in some cases contributed to increased growth and quality of marine larvae.</p> <p>In addition to promoting collaboration between cod producers within the Nordic countries, the main goal of the current project is to develop methods for stable and advantageous production of live feed animals (rotifers). The project is based on a recirculation culturing system engineered by SINTEF and the present part of the project deals with the effect of treatment and persistence of selected probiotic bacterial strains in the system. The overall results indicate that the rotifer cultures were not negatively affected by the bacterial treatment and treatment using freeze-dried preparations of the two probiotic strains even resulted in improved harvesting of the live feed. A drop in bacterial numbers within the bio-filter unit was, however, observed following the addition of liquid bacterial cultures, indicating negative effects of the bacteria on the bacterial community of the bio-filter unit. An increase in the numbers of lactic acid bacteria was observed in the rotifer cultures following treatment, but the probiotic bacterial strains were neither found to become established as a part of nor affect the dominating bacterial community of the system using the concentrations applied.</p> <p>The project was supported by the Nordisk Atlantsamarbejde (NORA) and is a collaboration between Matís, Hafrannsóknastofnunar, SINTEF, Fiskaaling, IceCod, Stofnfiskur and Nordland Marin Yngel.</p>		
English keywords:	<i>Rotifers, recirculation culturing system, probiotics</i>		

EFNISYFIRLIT

1. INNGANGUR.....	1
2. FRAMKVÆMD	3
2.1. Bætibakteríur	3
2.2. Meðhöndlun með bætibakteríum	5
2.3. Meðhöndlun sýna og rannsóknir á bakteríuflóru.....	7
3. NIÐURSTÖÐUR.....	8
3.1. Vaxtarhamlandi áhrif bætibakteríustofna	8
3.2. Áhrif og viðvera bætibaktería í ræktun hjóldýra með endurnýtingarkerfi.....	8
4. UMRÆÐA OG ÁLYKTANIR.....	14
5. ÞAKKARORÐ.....	16
6. HEIMILDIR	17

1. INNGANGUR

Mikil þróun hefur verið í íslensku fiskeldi undanfarin ár en hnignun stofna og hátt markaðsverð síðustu árin veldur því að aukinn áhugi manna beinist að eldi kaldsjárvartegunda. Megin flöskuhálsinn í eldi sjávarfiska er á fyrstu stigum eldisins, þ.e. frá klaki og þar til lirfan er orðin að seiði en á þessu tímabili eru lirfur sjávarfiska fóðraðar með lifandi fóðurdýrum (svifdýr). Við þorskseiðaframleiðslu í tilraunaeldisstöð Hafrannsóknastofnunar (Hafró) á Stað í Grindavík, er sem dæmi algengt að lifun sé á bilinu 0-10% frá klaki og fram að þeim tíma þegar mögulegt er að bólusetja seiðin sem er u.þ.b. 14 vikum eftir klak (Steinarsson 2004). Ýmsar ástæður geta legið að baki þessum miklu afföllum og má þar nefna næringarskort, sundmagagalla, vansköpun, mengun svo og sveiflur í umhverfisþáttum eins og hitastigi og seltu (Steinarsson 2004). Auk þess hafa lirfurnar enn ekki þróað með sér sérhæfða ónæmissvörun og eru því háðar ósérhæfða ónæmiskerfinu til að verjast örverum og sýklum fyrstu tvo til þrjá mánuði eftir klak (Magnadottir *et al.*, 2004). Rannsóknir sýna ennfremur að bakteríuálag í eldisumhverfi lirfa hefur mikil áhrif á lifun lirfa og seiða á fyrstu stigum eldisins (Olafsen 2001). Ýmsir hópar tækifærissýkla eru að jafnaði til staðar í eldisumhverfinu og nýta þeir sér óþroskað ónæmiskerfi lirfa til að ná þar fótfestu (Vadstein *et al.*, 2004). Mikill fjöldi baktería fylgir einnig fóðurdýrum lirfa og getur þetta lífræna álag orðið lirfunum ofviða ef ekkert er að gert (Lillehaug *et al.*, 2003). Möguleiki á að stýra örveruflóru í umhverfi og meltingarvegi tegunda í eldi og losna þannig við annars nauðsynlega efnameðhöndlun, er tvímælalaust með ákjósanlegri valkostum og er að vonum mikill áhugi fyrir þeirri lausn við eldi sjávarfiska (Olafsen 2001; Gatesoupe 1999; Vadstein *et al.*, 2004).

Notkun bætibaktería í fiskeldi hefur hlotið aukna athygli á liðnum áratug og niðurstöður ótal rannsókna hafa verið birtar á opinberum vettvangi. Bætibakteríur (*probiotic bacteria*) hafa verið skilgreindar sem “lifandi bakteríur sem hafa jákvæð áhrif á einstaklinginn með því m.a. að bæta örverufræðilegt jafnvægi í meltingarvegi hans” (Olafsen 2001; Skjermo og Vadstein 1999; Halami *et al.*, 1999). Bætibakteríur til notkunar í fiskeldi hafa verið einangraðar úr lifandi fóðurdýrum lirfa, eldisvökva og meltingarvegi ýmissa fisktegunda (Robertson *et al.*,

2000; Hjelm *et al.*, 2004b; Hjelm *et al.*, 2004a; Makridis *et al.*, 2005; Fjellheim *et al.*, 2007). Meðhöndlun hefur í mörgum tilfellum stuðlað að auknum vexti og gæðum fisklirfa með því t.d. að hindra að sjúkdómsvaldandi bakteríur nái þar fóttfestu eða með því að efla ónæmissvörun lirfa (Macey *et al.*, 2005; Gullian *et al.*, 2004). Bætibakteríum hefur með góðum árangri verið bætt í eldisumhverfi lirfa auk þess sem fóðurdýr hafa verið auðguð með bætibakteríum sem þannig hefur verið komið í lirlur (Makridis *et al.*, 2000; Abutbul *et al.*, 2004; Lategan *et al.*, 2004; Makridis *et al.*, 2005; Planas *et al.*, 2006).

Í þorskeldi hér á landi (Hafró) eru lirlur fóðraðar á hjóldýrum fyrstu dagana í frumfóðrun. Með endurnýtingarkerfum gefst möguleiki á að stýra umhverfisaðstæðum auk þess sem notkun endurnýtingarkerfa við ræktun hjóldýra hefur þá kosti að fjöldi baktería er aðeins 1-10% af þeim fjölda sem hefðbundið er að finna í loturæktum (Rombaut *et al.*, 2001) og bakteríuflóran inniheldur ekki *Vibrio*-tegundir sem þekkt er að geta valdið sýkingum í lirlunum (Dhert *et al.*, 2001). Þegar litið er til hagkvæmni, stöðugleika og hjóldýragæða eru endurnýtingarkerfi því ótvírætt ákjósanlegur kostur umfram aðrar ræktunaraðferðir.

Markmið verkefnisins í heild var að þróa aðferðir sem stuðla að öruggri, stöðugri og hagkvæmri framleiðslu fæðudýra fyrir þorsk í eldi. Markmið verkefnisins var jafnframt að efla samstarf þorskseiðaframleiðenda á Norðurlöndunum. Sintef í Noregi hefur þróað endurnýtingarkerfi fyrir framleiðslu hjóldýra og er í verkefninu byggt áfram á því kerfi (Aquatic Ecosystem Resirkulerings-anlegg). Markmið íslenska hluta verkefnisins var að rannsaka áhrif íblöndunar svo og viðveru bætibaktería í endurnýtingarkerfinu. Við verkefnislok verða settar saman leiðbeiningar um framleiðslu og fóðrun sem skilar hjóldýrum af hámarksgæðum m.t.t. samsetningar næringarefna og örveruflóru (lokaskýrsla verkefnisins til NORA sjóðsins í febrúar 2009).

Verkefnið er unnið í samvinnu Matís og Hafrannsóknastofnunar á Íslandi, SINTEF og Nordland Marin Yngel í Noregi og Fiskaaling í Færeyjum.

2. FRAMKVÆMD

Þessi skýrsla fjallar um framkvæmd og niðurstöður tilrauna sem gerðar voru með notkun bætibaktería við ræktun hjóldýra í endurnýtingarkerfi. Tilraunir fóru fram í seiðaeldisstöð Hafró að Stað við Grindavík og var framkvæmd og sýnataka í höndum starfsmanna Hafró. Ræktun bætibakteríustofna og úrvinnsla sýna var framkvæmt af starfsmönnum Matís á Akureyri.

2.1. Bætibakteríur

Tveir stofnar bætibaktería voru notaðir í tilraunirnar og voru þeir fengnir úr fyrra verkefni sem unnið var af Matís með styrk úr AVS sjóðnum (Forvarnir í fiskeldi, 2005-2008). Stofnarnir tveir voru einangraðar úr eldisvökva þorsklirfa (stofn 04-279) og þörungabykkni (stofn 04-394) sem nýtt er sem næring fyrir fæðudýr lirfa svo og til skyggingar eldisvökva þeirra á fyrstu stigum fóðrunar. Val á stofnunum var gert með tilliti til vaxtarhamlandi áhrifa á þekkta sýkingarvalda, eiginleikum þeirra til vaxtar, framleiðsluafurða þeirra svo og möguleikum til að ná fótfestu í frumulínum. Nánari grein er gerð fyrir vali stofnanna í Lauzon *et al.*, (2008).

Bætibakteríustofnarnir tveir voru tegundagreindir með raðgreiningu á 16S rDNA geni baktería:

- **Stofn 04-394** - mjólkursýrubaktería með 99% skyldleika við *Enterococcus thailandicus* FP48-3 (Genebank númer EF197994)
- **Stofn 04-279** - 100% skyldleiki við *Arthrobacter bergerei* (Genebank númer AJ609631)

Fyrri rannsóknir benda til að báðir stofnarnir vaxi ágætlega við 15°C, nái fótfestu í frumulínum fiska og hafi auk þess hamlandi áhrif á vöxt þekktra sýkingarvalda í fiski (Lauzon *et al.*, 2008). Sérstaklega hamlaði stofn 04-394 vexti mismunandi sýkingarvalda (breiðvirk áhrif) en stofn 04-279 hindraði fyrst og fremst vöxt *Vibrio anguillarum* sem veldur sjúkdómnum vibriosis í m.a. þorski.

Við meðhöndlun með bætibakteríunum í endurnýtingarkerfi hjóldýra voru stofnar ræktaðir á næringarættum sitt í hvoru lagi á rannsóknastofunni og ýmist var meðhöndlað með nýjum rættum (fljótandi ræktir) eins og lýst er í Lauzon *et al.*, (2008) eða ræktirnar frostþurrkaðar fyrir notkun. Framkvæmdar voru frekari rannsóknir á vaxtarhamlandi áhrifum stofnanna á vöxt mismunandi sýkingarvalda (*Aeromonas salmonicida achromogenes*, *Aeromonas salmonicida salmonicida*, *Vibrio salmonicida* og *Vibrio anguillarum*) og var þá fyrst og fremst verið að horfa til þess hvort frostþurrkun hefði áhrif á vaxtarhamlandi virkni þeirra. Bætibakteríustofnarnir voru þá ræktaðir við 15°C í 2-3 daga ýmist í Marine Broth (MB; Difco) eða Tryptic Soy Broth (TSB; Difco) sem í var bætt 0.6% ger-extrakti (TSB-ye), bakteríurnar voru síðan þvegnar í ísköldu, sterílu peptone sjóvatni (p-sw; 0.1% peptone leyst í 70% sjóvatni) og loks frostþurrkaðar. Frostþurrkað duft var síðan leyst upp í eldisvökva úr viðkomandi kerri fyrir notkun og fjöldi ræktanlegra baktería í duftinu jafnframt ákvarðaður með þynningu í p-sw. Sýkingarvaldandi stofnar voru einnig ræktaðir í fljótandi TSB-ye og rættunum síðan blandað við fljótandi soft MA (Marine Agar; Difco) og loks hellt í þunnu lagi yfir yfirborð MA agarskála. Bætibakteríurættum var síðan komið fyrir á yfirborði agarskálanna á mismunandi hátt þ.e. dropi af fljótandi rækt/bakteríublöndu sett á yfirborð agarskálanna (dropa-aðferð), í pappaskífu sem síðan er komið fyrir á yfirborð agarskálanna (pappaskífu-aðferð) eða í holum sem útbúnar voru í agarinn (holuagars-aðferð). Lesið var af skálum þegar bakteríuvöxtur var orðinn greinilegur (rættun við 15°C í ~7 daga) og vaxtarhamlandi áhrif ákveðin m.t.t. greinilegra eyða í vexti nálægt bætibakteríustofnunum. Stærð eyðu gefur til kynna styrk vaxtarhamlandi áhrifa.

Fyrir meðhöndlun í hjóldýrarækt voru bakteríustofnar ræktaðir upp í fljótandi TSB-ye æti við 15°C í 2-3 daga. Síðan var 0.5 mL úr rættunum sáð á yfirborð TSA-ye agarskála (TSA með 0.6% ger extrakti, leyst í 70% sjóvatni) og ræktað við 15°C í 5 daga. Ræktin var síðan skafin yfir í sterílt ílát og leyst upp í ísköldu peptone sjóvatni eins og lýst er í Lauzon *et al.*, (2008). Lausnin var notuð samdægurs þegar meðhöndlað var með fljótandi rækt og þá látin standa varin á ís fram að notkun (hámark 6 klst.). Einnig var meðhöndlað með frostþurrkuðum bætibakteríum og var ákveðið magn dufts þá leyst upp í eldisvökva úr viðkomandi kerri fyrir meðhöndlun.

2.2. Meðhöndlun með bætibakteríum

Tilraunir í hjóldýraræktun voru framkvæmdar í síræktum hjóldýra (*continuous culture*) en þá er rækt viðhaldið með stöðugu rennsli yfir lengri tíma. Notað er síræktunarkerfi með endurnýtingu (Aquatic Eco Systems. www.aquaticeco.com, sjá mynd 1.) þar sem bakteríufjöldi er haldið í skefjum með lífhreinsi (biofilter) og ósongjafa og leitast er við að halda þéttleika dýranna stöðugum í kringum 7.000 hjóldýr/ml (Suantika *et al.*, 2003). Hægt er að uppskera um 30% af ræktinni á dag þannig að framleiðslan er að jafnaði 2,1 milljarðar dýra/m³/dag eða fjórfalt meira en fæst með loturækt.



Mynd 1. Síræktunarkerfi með endurnýtingu og lífhreinsi (biofilter) frá Aquatic Eco System.

Hjóldýrin eru ræktuð í öðrum hluta kerfisins, 400 L ræktunarkeri. Notaður er 50µm dúkur (sía) á frárennslinu og haldast hjóldýrin því í kerinu en sjónum er stöðugt hringrásað í gegnum lífhreinsi og síðan aftur yfir í ræktunarkerið. Lífhreinsikerfið er 200 L að stærð og fyllt með litlum götóttum plastflögum (~1cm í þvermál) og gert er ráð fyrir að bakteríurnar sem sjá um hreinsun eldisvökvans (biofilterinn) nái fótfestu í þessum götum. Vatninu í lífhreinsinum er einnig hringrásað stöðugt í gegnum froðuskilju (turn á mynd 1) og lífræn óhreinindi freyða stöðugt upp úr skiljunni og niður í fötu við hlið kerfisins. Fóðrað er með 2x300 mL af þörungabykkni á hverjum degi (þéttleiki ca. 1800/mL í ræktunarkeri hjóldýranna) auk þess sem ClorAm-X (ammonium neutraliser) er bætt í kerfið nokkrum sinnum á dag og einnig látið drippa í kerfið. Í ræktunarkerinu hanga 2-3 örtrefjamottur sem

soga að sér gróf óhreinindi. Þessar mottur eru teknar upp og hreinsaðar daglega. Dýrum er safnað á hverjum morgni og er uppskeran ca. 25% á dag og fyllt upp með tilsvarendi rúmmáli af 25°C heitum hreinum sjó.

Kerfinu var startað upp með hjóldýrarækt og viðbættu fóðri daglega í nokkrar vikur áður en tilraunirnar hófust þar sem mikilvægt er að gefa bakteríum færi á að ná fótfestu í plastflögunum og mynda það umhverfi sem nauðsynlegt er til þess að lífhreinsirinn gegni sínu hlutverki með fullnægjandi hætti. Bætibakteríunum var bætt út í kerfið í tveimur aðskildum en þó samhangandi tilraunum sem stóðu yfir í samtals 30 daga á tímabilinu nóvember til desember 2008.

Tilraun 1. Meðhöndlað var einu sinni með fljótandi rækt stofna. Blandan var útbúin samdægurs og bætt út í hjóldýraker og í lífhreinsiker í styrkleikanum:

- Stofn 04-279: $1.1 \cdot 10^6$ bakt/mL í hjóldýraker og $1.5 \cdot 10^6$ bakt/mL í lífhreinsiker.
- Stofn 04-394: $5.7 \cdot 10^4$ bakt/mL í hjóldýraker og $7.7 \cdot 10^4$ bakt/mL í lífhreinsiker.

Tekin voru sýni af hjóldýrum og eldisvökva þeirra auk þess sem sýni voru tekin af þörungabykkni og bæði lífhreinsistykkjum (5 stk/sýni) og vökva úr kerri með lífhreinsi. Sýnum var safnað áður en bakteríum var bætt út í kerfið, 24 klst eftir meðhöndlun og 4 dögum eftir meðhöndlun.

Tilraun 2. Meðhöndlað var daglega 5 daga í röð og notaðar frostpurkaðar ræktir stofnanna. Duftið var leyst í eldisvökva úr tilheyrandi kerum og blöndunni síðan bætt út í kerin í styrkleikanum:

- Stofn 04-279: 10^6 bakt/mL í bæði hjóldýraker og lífhreinsiker.
- Stofn 04-394: 10^5 bakt/mL í bæði hjóldýraker og lífhreinsiker.

Bakteríum var bætt í bæði ræktunarker hjóldýranna og einnig lífhreinsi daglega 5 daga í röð frá degi 17 til 21. Sýnum var safnað einum degi (dagur 22), þremur dögum (dagur 24) og átta dögum (dagur 29) eftir að meðhöndlunarrhinu lauk. Hverju sinni voru tekin sýni af hjóldýrum og eldisvökva þeirra auk þess sem sýni voru tekin af þörungabykkni og bæði lífhreinsistykkjum (5 stk/sýni) og vökva úr kerri með lífhreinsi.

2.3. Meðhöndlun sýna og rannsóknir á bakteríuflóru

Sýni voru rannsökuð með tilliti til fjölda ræktanlegra baktería með ræktun á völdum næringarætum, þ.e. MA og TSA-ye til ákvörðunar á heildarfjölda ræktanlegra baktería, Thiosulphate Citrate Bile Sucrose agar (TCBS leyst í 70% sjóvatni) til ákvörðunar á fjölda hugsanlegra *Vibrio* baktería og Nitrit-Astidione-Polymyxin agar (NAP, pH 5.5) (Davidson og Cronin, 1973) til ákvörðunar á fjölda mjólkursýrubaktería. Samsetning heildarflóru baktería var jafnframt rannsökuð með Polymerase Chain Reaction og Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE) aðferð (Muyzer *et al.*, 1993).

Undirbúningur sýna var mismunandi eftir gerð sýnis:

Hjöldýr: hjöldýrarækt var síuð í gegnum 2 µm steríla síu og dýrin síðan þynnt í p-sw og loks tætt í 4*10 sek með 10 sek hléum á milli (Ultra Turrax T25; IKA - 133 rotations/sek).

Vökvi hjöldýrarækt: vökvi sem síaður var frá í liðnum á undan. Þynnt í p-sw.

Þörungabykkni: þynnt í p-sw og tætt á sama hátt og hjöldýrin.

Lífhreinsistykki (plaststykki): 5 stykki færð yfir í sterílt glas og 5 mL af sterílu p-sw bætt út í. Hrist kröftuglega í klukkutíma á ís við herbergishita. Sýni þá tekið af vökvanum.

Vökvi lífhreinsiker: vökva safnað beint úr kerinu. Þynnt í p-sw.

Frekari þynningar á sýnum voru gerðar í p-sw og fjöldi mismunandi tegunda ræktanlegra baktería ákvarðaður með sáningu úr þynningum á valin næringaræti. Skálar voru ræktaðar við 15°C og fjöldi sem og útlit kólónía ákvarðað eftir ræktun í 7-10 sólarhringa. Samsetning heildarflóru baktería í 1/10 þynningum sýna var greind með sameindafræðilegum aðferðum (PCR-DGGE) og hlutaraðgreiningu á 16S rDNA geni baktería í böndum sem skorin voru úr geljunum (framkvæmt af Matís-Prokaria). Nánari lýsingu á aðferðinni er að finna í Bjornsdottir *et al.*, (2008).

3. NIÐURSTÖÐUR

Hér verður gerð grein fyrir niðurstöðum rannsókna á hamlandi áhrifum bætibakteríustofnanna í fljótandi og frostþurrkuðu formi á vöxt sýkingarvaldandi baktería. Einnig verður gerð grein fyrir áhrifum meðhöndlunar með blöndu bætibaktería á afkomu og gæði hjóldýra, viðveru bætibakteríanna í endurnýtingarkerfi og áhrifum meðhöndlunar á bakteríuflóru endurnýtingarkerfis með lífhreinsi.

3.1. Vaxtarhamlandi áhrif bætibakteríustofna

Áhrif bætibakteríanna á vöxt sýkingarvaldandi stofna voru greinilegust þegar notuð var dropa- eða bóluaðferð. Niðurstöður voru ekki jafn skýrar þegar bakteríuræktum var bætt í holur í agarnum (holuagar-aðferð). Niðurstöður sýndu að annar bætibakteríustofninn, 04-279, (*Arthrobacter bergerei*) hindraði vöxt allra sýkingarvaldanna að undanskilinni *Vibrio salmonicida* og vaxtarhamlandi áhrif reyndust ekki skerðast við frostþurrkun (14-16 mm eyða). Sama gilti um hinn stofninn, 04-394 (*Enterococcus thailandicus*) í frostþurrkuðu formi þótt vaxtarhamlandi áhrif hans væru ekki jafn sterk (12-15 mm eyða). Hins vegar voru vaxtarhamlandi áhrif í ferskri rækt þess stofns mun minni (um 1 mm eyða) og þar hafði stofninn ekki hamlandi áhrif á vöxt *V.salmonicida*. Vaxtarhamlandi áhrif beggja stofna voru svipuð í óþynntum og ½ þynntum ræktum stofnanna. Í samantekt gefa niðurstöður vísbendingar um að vaxtarhamlandi virkni gegn hluta sýkingarvaldandi stofna gæti skerast við frostþurrkun en jafnvel aukist gegn öðrum.

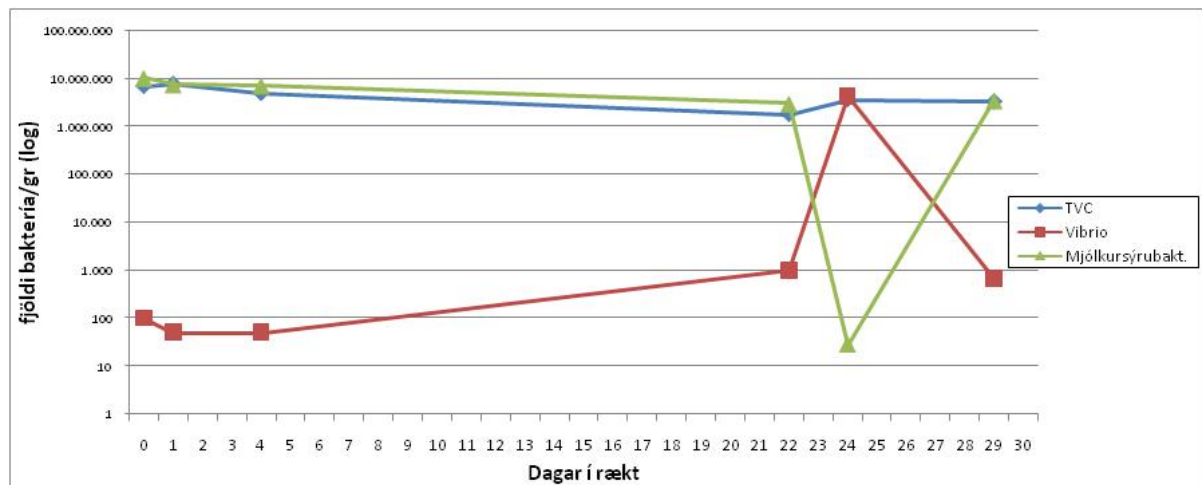
3.2. Áhrif og viðvera bætibaktería í ræktun hjóldýra með endurnýtingarkerfi

3.2.1 Fjöldi ræktanlegra baktería

Svipaður heildarfjöldi ræktanlegra baktería (TVC) fékkst við ræktun á MA og TSA-sw næringarætum. Minni sveiflur reyndust hins vegar vera í fjölda á MA og niðurstöður þeirra talninga því kynntar hér. Ekki reyndist vera munur á hlutfalli kólónía af mismunandi útliti/lit

á mismunandi sýnatökudögum og því ekki fjallað nánar um þær niðurstöður. Tilraunin í heild stóð yfir í um 30 daga og var meðhöndlað í tveimur hrinum, á fyrsta degi og á degi 17-21.

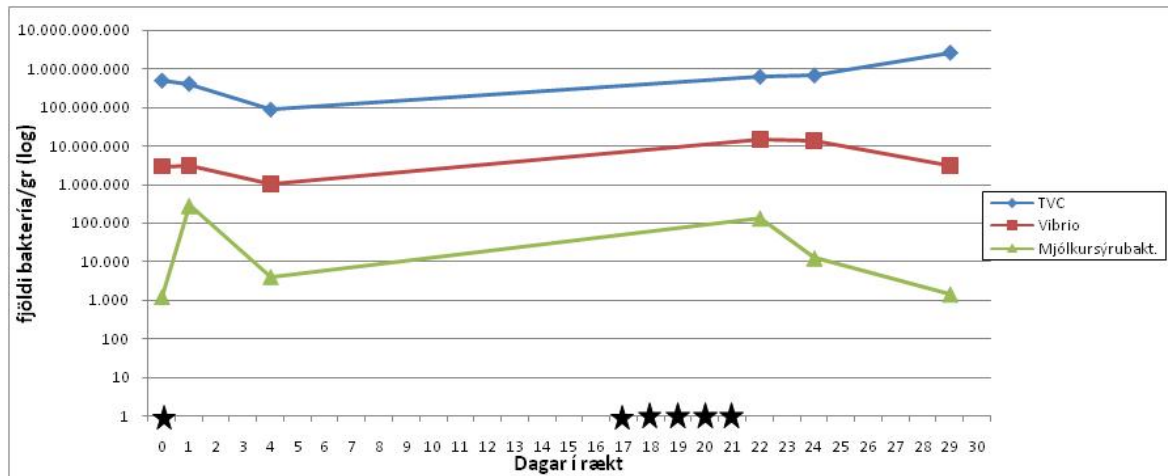
Heildarfjöldi ræktanlegra baktería (TVC) í þörungabykkni sem notað er til fóðrunar reyndist vera nokkuð stöðugur á tímabilinu (10^6 – 10^7 bakteríur/g) (mynd 2).



Mynd 2. Fjöldi ræktanlegra baktería í hverju grammi þörungabykknis sem bætt var tvisvar á dag í hjóldýraker á tímabilinu. Myndin sýnir heildarfjölda (TVC) og fjölda Vibrio og mjólkursýrubaktería eftir ræktun á mismunandi næringarætum.

Mynd 2 sýnir að mjólkursýrubakteríur eru stór hluti af heildarfjölda baktería í þörungum en lítið er af *Vibrio* bakteríum. Athygli vekur að svo virðist sem samband sé á milli fjölda *Vibrio* og mjólkursýrubaktería þar sem fall í fjölda mjólkursýrubaktería virðist tengjast aukningu á fjölda *Vibrio* baktería og öfugt.

Heildarfjöldi ræktanlegra baktería og hugsanlegra *Vibrio* baktería í hjóldýrum reyndist nokkuð stöðugur eða á bilinu $8.7 \cdot 10^7$ – $2.7 \cdot 10^9$ TVC/g og á bilinu $1 \cdot 10^6$ – $1.5 \cdot 10^7$ *Vibrio*/g. Meðhöndlun með bætibakteríum virtist ekki hafa áhrif á heildarfjölda eða fjölda *Vibrio* baktería (mynd 3).



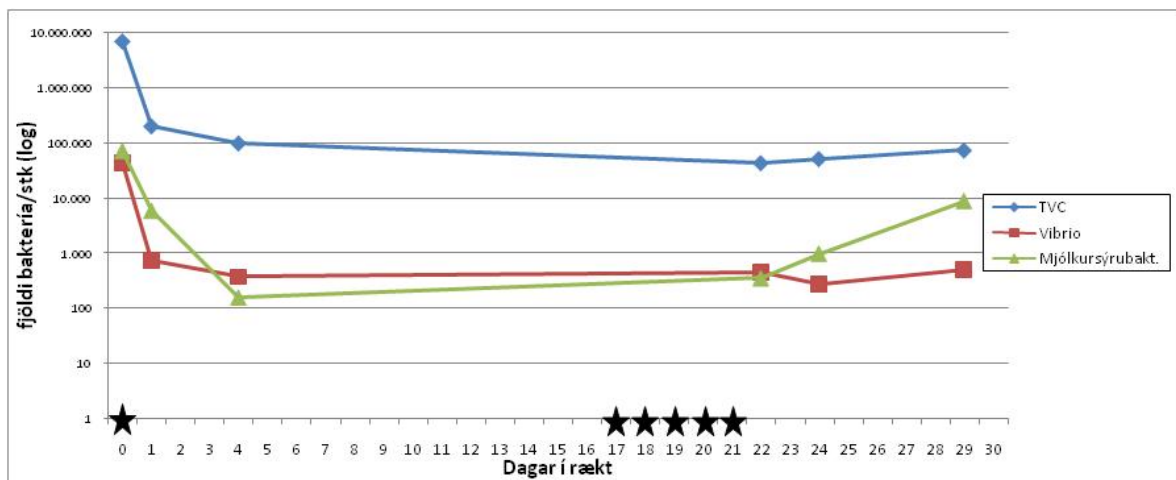
Mynd 3. Fjöldi ræktanlegra bakteria í hverju grammi hjóldýra í sýnum sem safnað var á tímabilinu. Myndin sýnir heildarfjölda (TVC) og fjölda Vibrio og mjólkursýrubaktería eftir ræktun á mismunandi næringarætum. Stjörnumerkingar segja til um tímasetningu meðhöndlunar með bætibakteríum.

Fjöldi mjólkursýrubaktería í hjóldýrum virtist hins vegar aukast við innsetningu bætibaktería og óx fjöldi þeirra um tvær log einingar næsta sólarhring eftir meðhöndlun í báðum tilraunum. Bakteríurnar virtust þó ekki ná fótfestu í hjóldýrum og fór fjöldi þeirra minnkandi eftir því sem lengra leið frá meðhöndlun (mynd 3). Fjöldi mjólkursýrubaktería breyttist á svipaðan hátt eftir einungis eina meðhöndlun og eftir meðhöndlun daglega í samfelld 5 daga.

Heildarfjöldi ræktanlegra bakteria og *Vibrio* bakteria í eldisvökva hjóldýra hélst nokkuð stöðugur á tímabilinu og virtist íblöndun bætibaktería ekki leiða til aukningar í fjölda. Vísbendingar voru um að meðhöndlun í upphafi (dagur 0) leiddi til aukningar í fjölda mjólkursýrubaktería í eldisvökva hjóldýra en aukningar í fjölda varð ekki vart eftir daglega meðhöndlun í 5 daga (dagur 17-21) og því dregin sú ályktun að íblöndun bætibakteríanna hafi ekki leitt til aukins fjölda mjólkursýrubaktería í eldisvökva hjóldýra (niðurstöður ekki sýndar).

Fjöldi bakteria í plaststykkjum úr lífhreinsi lækkaði um tvær til þrjár log einingar á tímabilinu (mynd 4). Lækkun varð strax eftir fyrstu meðhöndlun og fjöldi bakteria eykst ekki við endurtekna meðhöndlun 5 daga í röð. Fjöldi bakteria virðist þó fara vaxandi eftir því sem lengra líður frá síðustu meðhöndlun en heildarfjöldi og fjöldi *Vibrio* í lokin er þó tveimur log einingum lægri en fyrir fyrstu meðhöndlun. Mest aukning er í fjölda mjólkursýrubaktería í lok

tímabilsins en fjöldi þeirra er þó einni log einingu lægri við lok tilraunarinnar samanborið við fyrir meðhöndlun. Meiri sveiflur voru í fjölda baktería í vökva lífhreinsisins en þar óx fjöldi *Vibrio* og mjólkursýrubaktería um 2 log einingar daginn eftir fyrstu meðhöndlun en lækkaði svo aftur niður í upphaflegan fjölda á 4. degi eftir meðhöndlun og hélst nokkuð stöðugur út tímabilið þrátt fyrir frekari meðhöndlun með bætibakteríum (niðurstöður ekki sýndar).

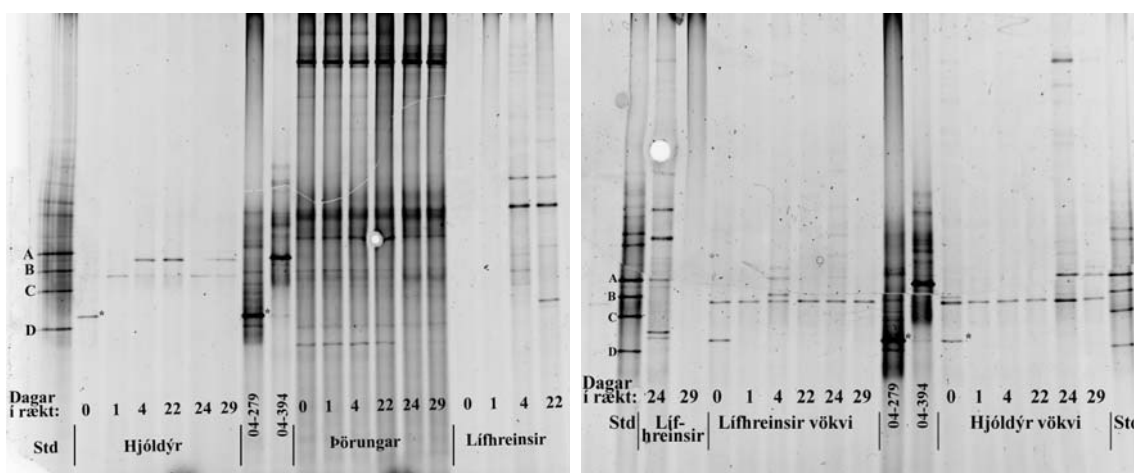


Mynd 4. Fjöldi ræktanlegra baktería í hverju stykki lífhreinsis (plaststykki) í sýnum sem safnað var á tímabilinu. Myndin sýnir heildarfjölda (TVC) og fjölda *Vibrio* og mjólkursýrubaktería eftir ræktun á mismunandi næringarætum. Stjörnumerkingar segja til um tímasetningu meðhöndlunar með bætibakteríum.

3.2.2 Samsetning bakteríuflóru

Samsetning heildarflóru baktería var rannsökuð með sameindafræðilegum aðferðum (PCR-DGGE). Aðferðin og val á vísnum og aðstæður í PCR hvarfi og rafdrætti hafa verið aðlöguð að greiningu heildarflóru baktería í sýnum frá fyrstu stigum lúðueldis og hefur aðferðin jafnframt reynst gefa góða mynd af samsetningu heildarflóru baktería í umhverfissýnum á fyrstu stigum þorskeldis. Með aðferðinni eru greindar ríkjandi tegundir baktería í sýnum og því líklegt að fjölda annarra tegunda sé að finna í sýnunum en í hlutfallslega minna magni en þær tegundir sem greinast. Þekkt er að aðeins lítill hluti umhverfisflóru baktería er að jafnaði ræktanlegur á næringarætum í rannsóknastofunni og því vel hugsanlegt að þær tegundir greinist einfaldlega ekki með PCR-DGGE aðferðinni vegna þess að hlutfallslegur fjöldi þeirra er einungis lítið hlutfall af heildarfjölda baktería.

Hreinræktir bætibakteríustofnanna voru keyrðar með sýnum í því markmiði að meta viðveru bakteríanna í endurnýtingarkerfinu. Bönd sem lentu á svipuðum stöðum á gelinu voru síðan skorin út, raðgreind og tegundagreining framkvæmd með samanburði við gagnagrunna á netinu. Niðurstöður benda til fremur einhæfrar bakteríuflóru við ræktun hjóldýra í endurnýtingakerfi með lífhreinsi (mynd 5). Einungis 1-4 tegundir baktería greindust í mismunandi sýnum úr kerfinu og virtist meðhöndlun með bætibakteríum ekki hafa afgerandi áhrif á samsetningu bakteríuflórunnar.



Mynd 5. DGGE mynstur sýna. Myndin sýnir samsetningu bakteríuflóru í hjóldýrum, eldisvökva hjóldýra, þörungum, lífhreinsi og vökva lífhreinsis. Sýni eru tekin fyrir fyrstu meðhöndlun (0) og síðan eftir mismunandi marga daga í rækt (1, 4, 22, 24 og 29 sólarhringa). Á báðum gelum eru einnig keyrðar hreinræktir bætibakteríustofna (04-279, 04-394) svo og staðall (St) sem inniheldur hreinræktir bakteríustofna (A-D). Merkt bönd (*) vísa til bætibakteríustofns 04-279 og banda sem fengu sömu tegundagreiningu samkvæmt raðgreiningu á útskornu sýni.

Annar bætibakteríustofninn (04-279; *Arthrobacter bergerei*) var upphaflega einangraður úr eldisumhverfi þorsklirfa og benda niðurstöður þessa verkefnis til þess að stofninn gæti verið upprunnin úr hjóldýrarækt þar sem tilsvareandi band greinist í hjóldýrasýni sem tekið var fyrir meðhöndlun. Stofninn greinist þó einungis í þessu eina sýni af hjóldýrum og virðist því ekki vera hluti af ríkjandi flóru fóðurdýra þó svo búið sé að meðhöndla með bætibakteríum. Band sem lenti á svipuðum stað í gelinu og hinn bætibakteríustofninn (04-394; *Enterococcus thailandicus*) reyndist þó ekki vera sama tegund og greindist þessi stofn ekki í hjóldýrum,

hvorki fyrir né eftir meðhöndlun. Stofninn virðist því ekki vera að ná fótfestu í hjóldýrum eða verða hluti af ríkjandi flóru þeirra.

Upphafssýni af plaststykkjum úr lífhreinsi misfórust og því ekki unnt að greina hvort meðhöndlun hafi haft áhrif á samsetningu bakteríuflóru lífhreinsis. Greining sýna sem safnað var eftir meðhöndlun með bætibakteríum bendir til þess að bakteríuflóra lífhreinsis sé fjölbreyttari samanborið við bakteríuflóru hjóldýranna (mynd 5). Einnig virðist sem bakteríuflóra lífhreinsis sé fjölbreyttari í stykkjum úr lífhreinsinum samanborið við vökva í lífhreinsinum og er það vísbending um að ýmsar tegundir baktería nái fótfestu í sjálfum lífhreinsinum (plaststykkjunum). Bætibakteríutegundirnar virðast þó ekki ná þar fótfestu, í það minnsta ekki sem ríkjandi flóra lífhreinsis.

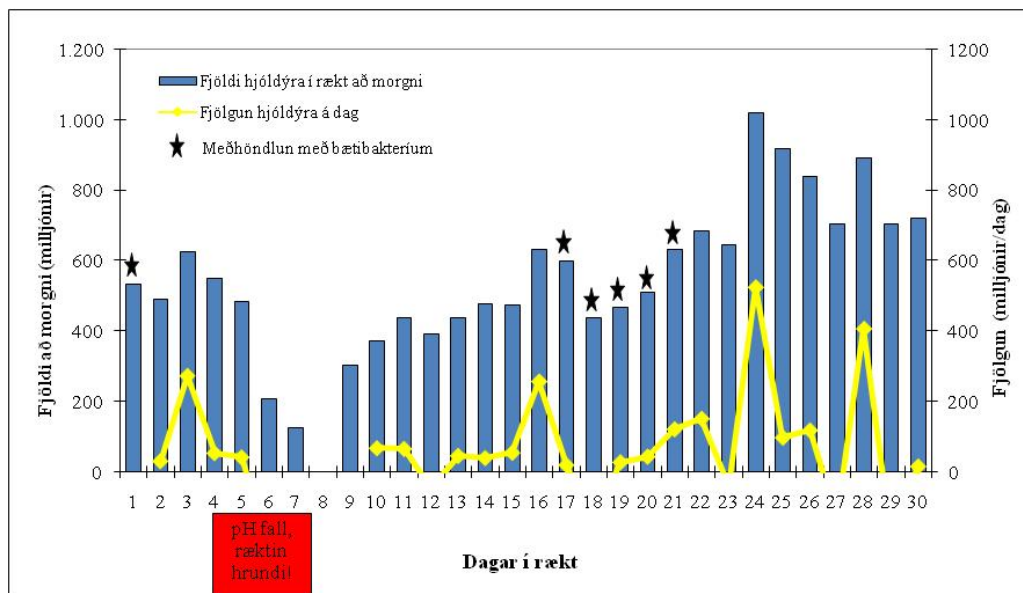
Samsetning bakteríuflóru var svipuð í sýnum sem tekin voru af þörungabykkni á tímabilinu. Þrátt fyrir að önnur bætibakterían (04-394; *Enterococcus thailandicus*) hafi upprunalega verið einangruð úr þörungum, þá greindist hún ekki í þessum sýnum og bendir það til þess að þessi tegund sé ekki hluti af ríkjandi bakteríuflóru þörungabykknis.

3.2.3 Fjöldi og fjölgun hjóldýra

Fylgst var með súrefni, sýrustigi, hita, fóðurgjöf og magni, rennsli svo og fjölda hjóldýra í rækt á hverjum morgni og fjölgun þeirra daglega yfir tímabilið.

Mikill breytileiki var í fjölda og fjölgun hjóldýra frá degi til dags (mynd 6). Eftir fyrstu meðhöndlun með fljótandi rækt bætibaktería (dagur 1) varð fall í sýrustigi ræktarinnar sem orsakaði hrun í ræktinni (dagur 4-8). Þetta gerðist þó ekki við endurtekna meðhöndlun þegar notaðar voru frostpurkaðar ræktir baktería og þeim bætt daglega út í kerfið í 5 daga.

Uppskera hjóldýra var breytileg á tímabilinu en óx verulega eftir seinni meðhöndlunarhrinu þar sem að meðaltali 118 milljón dýr fengust á dag (dagur 21-30) samanborið við að meðaltali 38 milljón dýr á dag fyrir seinni meðhöndlun (dagur 10-20) (niðurstöður ekki sýndar).



Mynd 6. Fjöldi hjóldýra í rækt (milljónir dýra/400L) að morgni og fjöldgun þeirra (milljónir dýra/400L) á dag á tilraunatímabilinu. Stjórnumerkingar segja til um tímasetningu meðhöndlunar með bætibakteríum auk þess sem sýnt er hvar fall varð í sýrustigi og ræktin hrundi (dagar 4-8).

Niðurstöður tilrauna í eldinu benda því til þess að meðhöndlun með bætibakteríum í frostpurruðu formi hafi haft góð áhrif á vöxt og fjöldgun hjóldýra í endurnýtingarkerfinu.

4. UMRÆÐA OG ÁLYKTANIR

Hjóldýr í ræktun með endurnýtingarkerfi virðast þola vel meðhöndlun með þeim tegundum bætibaktería og í þeim styrk sem rannsakað var í verkefninu. Vísbendingar eru um að meðhöndlun með frostpurruðum bakteríum hafi haft jákvæð áhrif á uppskeru hjóldýra í kerfinu. Helstu niðurstöður benda til þess að önnur tegundin (*Enterococcus thailandicus*) sé upprunnin úr hjóldýrum en virðist þó ekki vera hluti af ríkjandi flóru dýranna þar sem hún greindist aðeins í einu þeirra sýna sem rannsökuð voru á tímabilinu.

Meðhöndlun með bætibakteríum virtist ekki hafa áhrif á samsetningu bakteríuflóru kerfisins, hvorki hjóldýra né lífhreinsis. Niðurstöður ræktunar baktería í sýni sem tekið var úr lífhreinsi fyrir meðhöndlun, var óvenjulega hátt í samanburði við sýni sem tekin voru eftir meðhöndlun sem gæti bent til þess að sýni hafi verið mengað. Hins vegar gætu niðurstöður

einnig bent til þess að meðhöndlun með fljótandi rækt bætibaktería í þeim styrk sem notaður var í fyrri meðhöndlun, hafi valdið því að fjöldi baktería í lífhreinsi hafi hrapað (fækkun ræktanlegra baktería um 2 log einingar) og ekki náð sér aftur á strik á því tímabili sem tilraunin náði yfir. Þetta gæti hafa leitt til þess að lífhreinsirinn næði ekki að starfa eðlilega, sem gæti skýrt það fall sem varð í sýrustigi ræktanna nokkru eftir fyrstu meðhöndlun. Lækkun sýrustigs er talin hafa leitt til þess að hjóldýraræktin hrundi. Ekki varð fall á sýrustigi eftir endurtekna meðhöndlun með frostþurrkuðum bakteríum 5 daga í röð sem er vísbending um að betra sé að meðhöndla með frostþurrkuðum bakteríum í ræktun hjóldýra.

Í endurnýtingarkerfi er eldisvökvanum hringrásað um kerfið og í þessari tilraun var rennslið haft 7,2 L/mín á fyrri hluta tímabilsins en minnkað niður í 1,5 L/mín eftir seinni meðhöndlun (dag 20). Endurnýjun á eldisvökvanum var því um 40-50 % á dag auk froðu sem freyðir upp úr froðuskiljunni. Niðurstöður DGGE greiningar benda til þess að bætibakteríurnar hafi ekki náð fótfestu sem hluti af ríkjandi flóru hjóldýra eða lífhreinsisins þó svo niðurstöður talningar bendi til þess að meðhöndlun leiddi til aukningar í fjölda mjólkursýrubaktería í hjóldýrum og að fjöldi þeirra fari vaxandi í lífhreinsi við lok tilraunarinnar. Því er talið að nauðsynlegt sé að meðhöndla oftast eða með meiri styrk allavega annarrar tegundarinnar (*Enterococcus thailandicus*) til að viðhalda bætibakteríunum í ræktum hjóldýra í endurnýtingarkerfi.

DGGE aðferðin sem notuð er til þess að greina samsetningu bakteríuflóru í sýnum gerir ráð fyrir að hver tegund baktería gefi einungis eitt band í geli eftir rafdrátt. Niðurstöður verkefnisins benda þó til þess að mikið magn DNA í sýnum (hreinræktir bakteríustofna) geti leitt til þess að fram komi skuggabönd á geli. Þessi skuggabönd eru ekki jafn áberandi og eru ekki talin sem „bönd“ í sýnum úr tilraunakerjum þar sem minna magn er af bakteríum og erfðaefni þeirra. Eins og sést á mynd 5 gefa sýni úr hreinræktum bætibaktería eitt sterkt band (sem greint var með raðgreiningu sem sú tegund bætibaktería sem unnið var með) auk nokkurra skuggabanda sem ekki eru jafn greinileg í öðrum sýnum sem innihalda blandaða bakteríuflóru. Þessar niðurstöður benda til þess að aðlaga þurfi aðstæður í PCR hvarfi og

athuga val á vísunum til þess að fá sem sérhæfasta mögnun á því svæði erfðaefnisins sem áhugvert er að skoða og sýnir mestan breytileika milli bakteríuteygunda í sýnum sem safnað er á fyrstu stigum þorskeldis. Þegar metin var viðvera bætibakteríustofnanna í sýnum var því bæði stuðst við samanburð á mynstri í DGGE geljum svo og við niðurstöður raðgreininga á útskornum böndum þar sem bæði sterka bandið og skuggaböndin úr stofnum voru rakin. Niðurstöður þeirra greininga bentu til þess að bætibakteríustofnarnir væru ekki til staðar nema einungis í hluta þeirra sýna sem safnað var á tímabilinu.

Bakteríuflóra þörungabykknis sem notað er til fóðrunar hjóldýra á tímabilinu reyndist vera stöðug og innihélt lítinn fjölda *Vibrio* tegunda. Athyglisvert þótti að svo virtist sem fylgni væri á milli fjölda mjólkursýrubaktería og *Vibrio* í sýnum af þörungum þar sem fall í fjölda mjólkursýrubaktería virtist tengjast aukningu í fjölda *Vibrio* baktería og öfugt. Mjólkursýrubakteríur gætu því hugsanlega haldið niðri fjölda *Vibrio* baktería en meðal þeirra er að finna marga þekkta sýkingarvalda í fiski.

Í samantekt benda niðurstöður tilraunarinnar til þess að meðhöndlun með bætibakteríum í frostþurrkuðu formi hafi haft jákvæð áhrif á uppskeru hjóldýra í endurnýtingarkerfi. Frostþurrkun bakteríustofna hafði lítil áhrif á bakteríuhamlandi virkni þeirra auk þess sem afurðin er þá mun meðfærilegri og auðveldari í flutningi sem er mikilvægt þegar meðhöndla þarf með miklu magni baktería.

5. ÞAKKARORÐ

Aðstandendur verkefnisins vilja þakka Nordisk Atlantsamarbejde (NORA) fyrir fjárframlag þeirra til verkefnisins. Framleiðandi sem er þátttakandi í verkefninu, Hafrannsóknastofnun, lagði til aðstöðu til tilrauna og er þeim þakkað þeirra framlag. Einnig viljum við þakka starfsmönnum Matís sem komu að framkvæmd verkefnisins með ýmsum hætti, Maríu Pétursdóttur og Eydís Elvu Þórarinsdóttur fyrir bakteríutalningar og greiningar, Helene L. Lauzon fyrir að leggja til bætibakteríustofna og Sólveigu Pétursdóttur og öðrum starfsmönnum Matís-Prokaría fyrir raðgreiningu bakteríustofna.

6. HEIMILDIR

- Abutbul, S., Golan-Goldhirsh, A., Barazani, O. & Zilberg, D.** 2004. Use of *Rosmarinus officinalis* as a treatment against *Streptococcus iniae* in tilapia (*Oreochromis* sp.). *Aquaculture*. 238, 97-105.
- Bjornsdottir, R. Johannsdottir J, Coe J, Smaradottir H, Sigurgisladottir S. & Gudmundsdottir B.K.** 2009. Survival and quality of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) in intensive farming: Possible impact of the intestinal bacterial community. *Aquaculture* 286:53-63.
- Davidson, A.P. & Cronin, F.** 1973. Medium for the selective enumeration of lactic acid bacteria from foods. *Applied Microbiology* 26 (3), 439-440.
- Dhert P, Rombaut G, Suantika G, & Sorgeloos P.** 2001. Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquaculture*. 200:129-146
- Fjellheim, A.J., Playfoot, K.J., Skjermo, J. & Vadstein, O.** 2007. *Vibrionaceae* dominates the microflora antagonistic towards *Listonella anguillarum* in the intestine of cultured Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Aquaculture*. 269, 98-106.
- Gatesoupe, J.** 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*. 180: 147-165.
- Gullian, M., Thompson F. & Rodriguez, J.** 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 233: 1-14.
- Halami, P.M, Chandrashekar A. & Joseph R.** 1999. Characterization of bacteriocinogenic strains of lactic acid bacteria in fowl and fish intestines and mushroom. *Food Biotechnology*. 13(2): 121-136.
- Hjelm, M., Riaza, A., Formoso, F., Melchiorson, J. & Gram, L.** 2004a. Seasonal incidence of autochthonous antagonistic *Roseobacter* spp. and *Vibrionaceae* strains in a Turbot larva (*Scophthalmus maximus*) rearing system. *Applied and Environmental Microbiology*. 70, 7288-7294.
- Hjelm, M., Bergh, Ø., Riaza, A., Nielsen, J., Melchiorson, J., Jensen, S., Duncan, H., Ahrens, P., Birkbeck, H. & Gram, L.** 2004b. Selection and identification of autochthonous potential probiotic bacteria from turbot larvae (*Scophthalmus maximus*) rearing units. *Systematic Applied Microbiology*, 27, 360-371.
- Lategan, M.J., Torpy, F.R. & Gibson, L.F.** 2004. Biocontrol of saprolegniosis in silver perch *Bidyanus bidyanus* (Mitchell) by *Aeromonas media* strain A199. *Aquaculture*. 235, 77-88.
- Lauzon, H.L., Gudmundsdottir, S., Pedersen, M.H., Budded, B.B., & Gudmundsdottir, B.K.** 2008. Isolation of putative probiotics from cod rearing environment. *Veterinary Microbiology*. 132(3-4):328-339
- Lillehaug, A, Lunestad B.T. & Grave, K.** 2003. Epidemiology of bacterial diseases in Norwegian aquaculture - a description based on antibiotic prescription data for the ten-year period 1991 to 2000. *Dis. Aquat. Org.* 53: 115-125.
- Macey B.M. & Coyne, V.E.** 2005. Improved growth rate and disease resistance in fanned *Haliotis midae* through probiotic treatment. *Aquaculture*. 245: 249-261.
- Magnadóttir, B., S. Lange, A. Steinarsson & S. Gudmundsdóttir.** 2004. The ontogenic development of innate immune parameters of cod (*Gadus morhua* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 139: 217-224.
- Makridis, P, Fjellheim A.J, Skjermo J. & Vadstein, O.** 2000. Control of the bacterial flora of *Brachionus plicatilis* and *Artemia franciscana* by incubation in bacterial suspensions. *Aquaculture*. 185: 207-218.
- Makridis, P., Martins, S., Vercauteren, T., Van Driessche, K., Decamp, O. & Dinis, M.T.** 2005. Evaluation of candidate probiotic strains for gilthead sea bream larvae (*Sparus aurata*) using an in vivo approach. *Letter in Applied Microbiology*. 40, 274-277.
- Muyzer, G., De Waal E.C. & Uitterlinden, A.G.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 59:695-700.
- Olafsen, J.A.** 2001. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture* 200: 223-247.
- Planas, M., Perez-Lorenzo, M., Hjelm, M., Gram, L., Uglenes Fiksdal, I., Bergh, O. & Pintado, J.** 2006. Probiotic effect in vivo of *Roseobacter* strain 27-4 against *Vibrio* (*Listonella*) *anguillarum* infections in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. *Aquaculture*. 255, 323-333.

- Robertson, P.A.W., O'Dowd, C., Burrells, C., Williams, P. & Austin B.** 2000. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture*. 185, 235-243.
- Rombaut, G., Suantika, G., Boon, N., Maertens, S., Dhert, P., Top, E., Sorgeloos, P. & Verstraete, W.** 2001. Monitoring of the evolving diversity of the microbial community present in rotifer cultures. *Aquaculture* 198: 237–252.
- Skjermo, J. & Vadstein, O.** 1999. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture*. 177: 333-343.
- Steinarsson, A.** 2004. Framleiðsla þorskseiða. Í Björn Björnsson og Valdimar I. Gunnarsson (Ritstj.), *Þorskeldi á Íslandi* (bls. 41-86). Reykjavík: Hafrannsóknastofnun.
- Suantika, G., Dhert, P., Sweetman, E., O'Brien, E. & Sorgeloos, P.** 2003 Technical and economical feasibility of a rotifer recirculation system. *Aquaculture* 227:173–189.
- Vadstein, O., T.A. Mo & Berg, Ö.** 2004. Microbial interactions, prophylaxis and diseases. *In*: Morkness, E., Kjörsvik, E. and Olsen, Y. (Eds.), *Culture of Cold-Water Marine Fish*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd. pp. 28-64.