

Nýsköpun & neytendur  
Consumers & Products

Vinnsla & virðisaukning  
Value Chain & Processing

Erfðir & eldi  
Genetics & Aquaculture

Líftækni & lífefni  
Biotechnology & Biomolecules

Mælingar & miðlun  
Analysis & Consulting

Öryggi & umhverfi  
Food Safety & Environment



# Bætt frjóvgun lúðuhroгна

Jónína Þ. Jóhannsdóttir  
Heiðís Smáradóttir  
María Pétursdóttir  
Rannveig Björnsdóttir

Erfðir og eldi

Skýrsla Matís 17-10  
Maí 2010

ISSN 1670-7192

<b>Titill / Title</b>		<b>Bætt frjóvgun lúðuhrogna / Improved fertilization of halibut eggs</b>	
<b>Höfundar / Authors</b>		Jónína Þ. Jóhannsdóttir, Heiðís Smáradóttir, María Pétursdóttir, Rannveig Björnsdóttir.	
<b>Skýrsla / Report no.</b>	17-10	<b>Útgáfudagur / Date:</b>	Maí 2010
<b>Verknr. / project no.</b>	3003-1919		
<b>Styrktaraðilar / funding:</b> AVS			
<b>Ágríp á íslensku:</b>	<p>Helsti flöskuháls í eldi sjávarfiska eru fyrstu þroskastigin og framboð á gæðahrognum, lirfum og seiðum. Hrognagæði fiska eru mjög breytileg og eru helst metin af frjóvgunarhlutfalli og afkomu hrogna og lirfa en stjórnast af ýmsum þáttum. Fyrir stjórnun og afkomu fyrirtækja er mjög mikilvægt að geta lagt mat á hrognagæði sem fyrst. Markmið þessa verkefnis var að skilgreina þætti sem áhrif hafa á frjóvgunarhlutfall lúðuhrogna og sem hugsanlega má stjórna. Jafnframt voru gerðar tilraunir með mismunandi aðferðir við frjóvgun þar sem sjómagni var breytt eða efnum bætt út í umhverfið við frjóvgun.</p> <p>Fiskum í tveimur hrygningarhópum var fylgt eftir og framkvæmdar umfangsmiklar rannsóknir á eiginleikum og bakteríuflóru hrognaskammta. Niðurstöður sýna að ekki er mikill breytileiki í þeim mælipáttum sem skoðaðir voru og ekki marktæk fylgni við frjóvgunarhlutfall sem bendir til þess ólíklegt sé að þeir hafi afgerandi áhrif á hrognagæði. Þó gefa niðurstöður vísbendingar um að samsetning heildarflóru bakteria og samsetning nauðsynlegra fitusýra sé önnur í hrognum með hærri frjóvgunarhlutfall og geti það því haft áhrif á gæði hrogna.</p> <p>Helstu niðurstöður frjóvgunartilrauna gefa vísbendingar um að íblöndun glúkósa í ákveðnum styrk í umhverfi hrogna geti leitt til um 10% aukningar á frjóvgunarhlutfalli hrogna sem gefur möguleika á mikilli tekjuaukningu fyrir fiskeldisfyrirtæki. Umfangsmiklar rannsóknir eru áætlaðar á frekari áhrifum íblöndunar glúkósa á afkomu hrogna svo og afkomu og gæði lirfa.</p>		
<b>Lykilorð á íslensku:</b>	<b>Lúðuhrogn, gæði hrogna, frjóvgunarhlutfall.</b>		
<b>Summary in English:</b>	<p>The main bottle necks in intensive marine aquaculture are the first stages and the supply of high quality eggs, larvae and juveniles. Egg quality is highly variable and has been defined in many ways mainly the fertilization rate and the viability of fertilised eggs and larvae. Multiple factors affect egg quality and an early assessment of egg quality is of great importance for hatchery management. The objective of this work was to define indicators for halibut egg quality that could possibly be regulated. Furthermore, the effects of variable fertilization methods have been tested, that is, variable amounts of seawater and addition of various chemicals during fertilization.</p> <p>Batches of eggs were collected from two spawning groups and extensive examination carried out on their characteristics and bacterial composition. The results show very little variability in the factors examined and no correlation with the fertilization rate that indicates insignificant importance for egg quality. However, the bacterial composition and the fatty acid composition was different in the batches of eggs with higher fertilization rate compared to lower indicating its importance for egg quality.</p> <p>The fertilization experiments indicate that the use of a certain concentration of glucose during fertilization could result in 10% increase in the fertilization rate which could bring about an increased operation success for the aquaculture companies. Comprehensive studies are scheduled to investigate further the effect of additional glucose on egg viability and larval survival as well as quality.</p>		
<b>English keywords:</b>	<b>Halibut eggs, egg quality, fertilization rate.</b>		

## EFNISYFIRLIT

<b>1. INNGANGUR</b> .....	<b>1</b>
<b>2. FRAMKVÆMD</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1. Sýnataka og undirbúningur sýna</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2. Mælipættir</b> .....	<b>4</b>
2.2.1. Magn og litur hrognavökva .....	5
2.2.2. Sýrustig .....	5
2.2.3. Vatnsvirkni .....	5
2.2.4. Osmosupéttni .....	6
2.2.5. Leiðni .....	6
2.2.6. Samsetning heildarflóru baktería.....	7
2.2.7. Fituútdráttur og fitusýrugreining .....	7
<b>2.3. Frjóvgunartilraunir</b> .....	<b>8</b>
2.3.1. Breytt magn af viðbættum sjó við frjóvgun.....	9
2.3.2. Viðbætt efni við frjóvgun .....	9
<b>3. NIÐURSTÖÐUR</b> .....	<b>11</b>
<b>3.1. Frjóvgunarhlutfall hroгна yfir hrygningartímabilið</b> .....	<b>12</b>
<b>3.2. Mælipættir og frjóvgunarhlutfall</b> .....	<b>13</b>
3.2.1. Samband mælipátta og frjóvgunarhlutfalls .....	13
3.2.2. Bakteríuflóra .....	15
3.2.3. Fitusýrusamsetning .....	18
<b>3.2. Breyttar aðferðir við frjóvgun lúðuhroгна</b> .....	<b>20</b>
<b>4. UMRÆÐA OG ÁLYKTANIR</b> .....	<b>22</b>
<b>5. ÞAKKARORÐ</b> .....	<b>26</b>
<b>6. HEIMILDIR</b> .....	<b>26</b>

## 1. INNGANGUR

Eitt af lykilatriðum í stórskala framleiðslu sjávarfiska er stöðugt framboð á gæðahrognum, lirfum og seiðum en þessi fyrstu þroskastig hafa verið megin flöskuháls eldis sjávarfiska. Á undanförunum árum hefur athyglin beinst í auknum mæli að gæðum hrogna og ýmsum þeim þáttum sem áhrif hafa á aukið hlutfall frjóvgunar. Skilvirkar og nákvæmar áætlanir um gæði hrogna eru mjög mikilvægar fyrir stjórnun og afkomu fyrirtækja og almennt við eldi sjávarfiska. Rétt mat á hrognagæðum getur komið í veg fyrir að fjármagni sé eytt í hrognaskammta af lélegum gæðum heldur aðeins haldið áfram með hágæða hrogn sem meiri líkur eru á að skili hágæðaseiðum.

Rannsóknir sýna að hrognagæði fiska eru mjög breytileg og ákvarðast m.a. af efna- og eðliseiginleikum en eru einnig háð þáttum í umhverfinu við frjóvgun og þroska þeirra (Brooks o.fl. 1997). Stærð hrognanna (Marteinsdottir o.fl. 2006), aldur hrygna (Izquierdo o.fl. 2001), næringarlegt ástand klakfisksins (Izquierdo o.fl. 2001) og efnasamsetning hrognanna eru meðal þátta sem rannsóknir sýna að hafa áhrif á hrognagæði auk þess sem bakteríuflóra (Hansen & Olafsen 1999) og stærð eldistanka (Black & Pickering, 1998) eru einnig talin geta haft áhrif. Hrogn úr eldisfiski virðast ennfremur slakari að gæðum en hrogn frá villtum fiski auk þess sem vísbendingar eru um slakari hrognagæði hjá ljósastýrðum fiskum (Rosenlund & Halldórsson 2007). Ofþroskun hrogna við kreistingu er talin vera ein ástæða slakra hrognagæða í fiskeldi (Bromage o.fl. 1994) og er því mikilvægt að hitta á rétta tímasetningu kreistingar og fá hrogn sem eru á réttu þroskunarstigi.

Aðstæður við frjóvgun hrogna er eitt af því sem miklu máli skipta varðandi hlutfall frjóvgunar. Aðferð við frjóvgun lúðuhrogna hefur verið þróuð og notuð af starfsmönnum Fiskeyjar hf. og hafa verið gerðar margvíslegar tilraunir með nokkra þætti sem haft geta áhrif á hlutfall frjóvgunar. Rannsóknir hafa sýnt að gæði svilja eru mjög mismunandi og geta þau haft mikil áhrif á frjóvgunarhlutfall og afkomu lirfa (Rurangwa o.fl. 2004). Söfnun og geymsla svilja fyrir frjóvgun svo og sýrustig og aðrir þættir í umhverfi þeirra hefur mest áhrif á gæði svilja (Rurangwa o.fl. 2004). Hreyfanleiki svilja er það sem er oftast notað til þess að meta gæði svilja og er meiri hreyfanleiki forsenda fyrir aukinni frjóvgunargetu. Reynsla og fyrri

rannsóknir hjá Fiskey er sú að þó gæði svilja skipti máli, þá eigi breytileiki í hrognagæðum fyrst og fremst rætur að rekja til hrygna (Heiðís Smáradóttir, rannsókn- og þróunarstjóri, Fiskey).

Hægt er að meta gæði hrogna með mismunandi aðferðum en þau eru yfirleitt metin út frá möguleikum þeirra til að verða að lífvænlegu seiði (Kjørsvik o.fl. 1990). Fullyrðingin felur í sér marga þætti og er metið m.a. út frá frjóvgunarprósentu hrogna, afkomu frjóvgaðra hrogna og afkomu lirfa í frumfóðrun. Þessir þættir gefa hins vegar ekki til kynna hvað það er sem ákvarðar gæði hrogna. Á undanförunum árum hefur mikið verið reynt til þess að finna þætti sem nota má til ákvörðunar á hrognagæðum strax við kreistingu og frjóvgun og sem e.t.v. má stjórna. Skoðun á frumuskiptingu hefur á undanförunum árum verið mikið notað og rannsökuð tengsl þess við afkomu. Rannsóknir Shields og félagar (1997) sýndu m.a. að marktæk fylgni var á milli frumuskiptingar (blastomere morphology) og afkomu hrogna en hins vegar er sú leið mjög tímafrek í stórframleiðslu seiða auk þess sem ekki allir eru sammála um notagildi þessarar aðferðar (Avery & Brown, 2005).

Í þessari skýrslu er gerð grein fyrir framkvæmd og niðurstöðum verkefnis þar sem markmiðið var að skilgreina þá þætti sem áhrif hafa á frjóvgunarhlutfall lúðuhrogna og sem hugsanlega má stjórna. Verkefnið var styrkt af AVS sjóðnum og unnið í samvinnu Matís ohf., Fiskey og Háskólans á Akureyri, með aðkomu sérfræðinga frá Háskólanum í Bodø í Noregi.

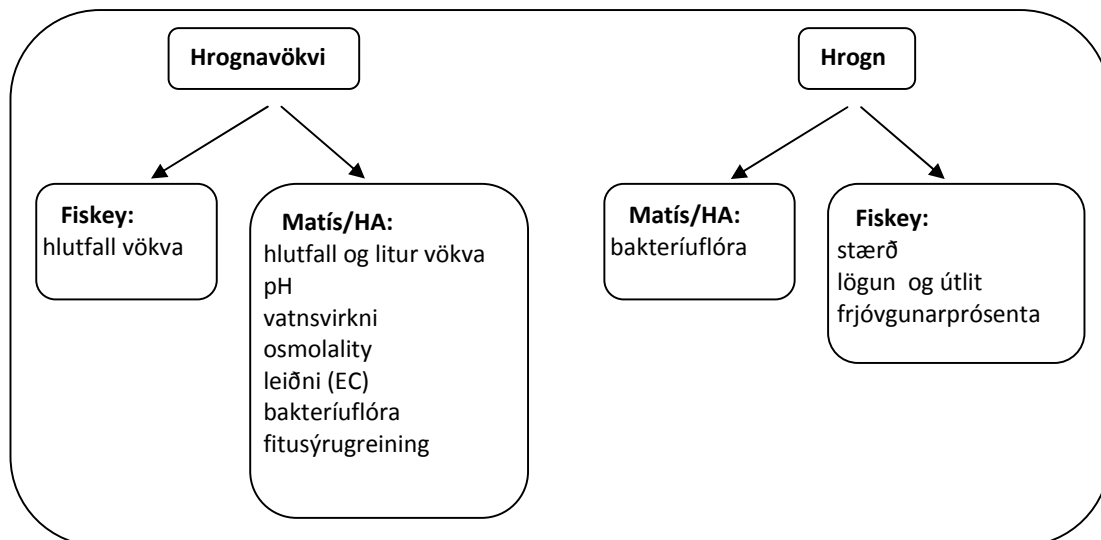
## **2. FRAMKVÆMD**

Vinna við verkefnið hófst í maí 2009 og hefur framvinda verkefnisins verið í meginráttum í samræmi við það sem sett var fram í umsókn. Fiskum í tveimur hrygningarhópum var fylgt eftir yfir hrygningartímann og hrognaskammtar frá þeim rannsakaðir m.t.t. eiginleika og bakteríuflóru. Jafnframt voru gerðar tilraunir með mismunandi aðferðir við frjóvgun hrogna og rannsökuð áhrif þess á frjóvgunarprósentu.

## 2.1. Sýnataka og undirbúningur sýna

Sýnum af hrognum (hrogn og hrognavökvi) var safnað í normalhópi (náttúrulegur hrygningartími) svo og seinkuðum hópi hrygna en klakfiski hjá Fiskey er ljósastýrt þannig að hluti hópsins hrygnir fyrr og hluti seinna en gerist við náttúrulegar aðstæður. Sýni voru tekin úr öllum hrognaskömmtum sem safnað var í seiðastöð Fiskeyjar. á virkum dögum yfir tímabilið 19. maí til 11. júní 2009 (normalhópur) og aftur á tímabilinu 14. september til 7. október 2009 (seinkaður hópur).

Kreisting hrygna var framkvæmd með hefðbundnum aðferðum af starfsmönnum Fiskeyjar. Vatnsborð í eldiskerjunum er lækkað yfir hrygningartímenn og fara starfsmenn daglega niður í kerin og meta hvaða fiskar eru tilbúnir til að losa egg. Hrogn eru strokin úr hrygnunum ofan í plastfötur en hrygnurnar eru merktar með númerum þannig að unnt sé að halda nákvæma skráningu yfir árangurinn í heild sinni. Hrognin eru síðan flutt í seiðaeldisstöð Fiskeyjar á Hjalteyri þar sem frjóvgun er framkvæmd og skráð er rúmmál hvers skammts og magn hrognavökva metið. Sýni af hverjum hrognaskammti var tekið í sterilt ílát og flutt á rannsóknastofu Matís á Akureyri þar sem mælingar voru framkvæmdar. Mynd 1 sýnir yfirlit yfir þá þætti sem mældir voru í rannsókninni.



Mynd 1. Yfirlit yfir mæliþætti í rannsókninni

Starfsmenn Fiskeyjar skoðuðu frjóvgunarprósentu, stærð og lögun hrognanna en hún gefur ákveðnar hugmyndir um gæði þeirra. Sem dæmi þá bendir eggölgun hrognanna til þess að þau séu ofþroskuð og reynslan sýnir að hruftött hrogn séu ekki af miklum gæðum en stinn hrogn af betri (Heiðís Smáradóttir, rannsóknastjóri, Fiskey).

Sýni voru höfð á ís til þess að halda jöfnu hitastigi og frekari rannsóknir framkvæmdar strax við komu á rannsóknastofuna. Sýnum var þá hellt í sigti til að skilja hrognavökvann frá og honum síðan komið fyrir í skilvindu (4000g í 10 mín við 4°C) til þess að losna við rauð blóðkorn áður en mælingar voru framkvæmdar. Sýni af bæði hrognavökva og hrognum voru tekin frá í steril eppendorf glös til greiningar á samsetningu bakteríuflóru. Sýni af hrognavökva voru fryst beint við -80°C en hrognasýni voru fyrst gerð einsleit (Ultra-Thurrax T25 við 8000 rpm í 3\*10sek með 10sek hléum á milli). Sýni voru jafnframt tekin af hrognunum til greiningar á fitusýrusamsetningu og voru hrognin þá fryst við -20°C þar til greining fór fram.

## 2.2. Mælipættir

Mælingar voru framkvæmdar á þáttum sem samkvæmt heimildum mátti ætla að gætu haft áhrif á frjóvgun hrognanna og gerður samanburður á niðurstöðum mælinganna og frjóvgunarhlutfalli hrognanna en það er metið sólarhring eftir frjóvgun. Jafnframt var leitað upplýsinga hjá sérfræðingum Háskólans í Bodø varðandi val á mæliaðferðum og voru mæliaðferðir aðlagðar að efnivið rannsóknarinnar (hrogn og hrognavökvi).

Mælingar á hrognavökva voru ávallt framkvæmdar samdægurs og í sömu röð þar sem oft þurfti að nota sama sýni til allra þeirra mælinga sem framkvæmdar voru. Magn sýna (hrogn og hrognavökvi) sem fékkst til mælinga var háð stærð hrognaskammta sem söfnuðust hverju sinni og í einstaka tilvikum reyndist ekki vera nægilegur hrognavökvi til allra mælinga. Byrjað var á að taka sýni til bakteríu- og fitusýrugreininga en þær mælingar voru framkvæmdar samtímis í öllum sýnum við lok tilraunatímans. Þessu næst voru framkvæmdar mælingar á sýrustigi, síðan vatnsvirkni, því næst osmolality og að endingu voru leiðnimælingarnar framkvæmdar í sýnunum þar sem framkvæmd þeirra getur haft áhrif á niðurstöður annarra mælinga.

### 2.2.1. Magn og litur hrognavökva

Magn hrognavökva var metið hlutlægt og flokkað í þrjá flokka (Skálsvik 2008);

1. Lítið magn: svo til enginn vökvi til staðar og erfitt að aðskilja hann frá hrognum þar sem lítið vökvamagn þýddi að vökvinn var meira seigfljótandi.
2. Meðal magn: aðeins meiri vökvi var til staðar en þurfti þó að standa lengi í sigtinu til að unnt væri að aðskilja vökvann frá.
3. Mikið magn: mjög mikill vökvi fylgdi hrognum og gekk vel að skilja hrognin frá vökvanum.

Litur hrognavökvans var einnig metinn m.t.t. hversu rauður hann var en rauður litur gefur til kynna að rauð blóðkorn fylgi sýninu.

### 2.2.2. Sýrustig

Sýrustig í hrognavökva var mælt með Orion Dual Star (Thermo scientific). Hitastig sýna var ekki mælt en þau voru öll höfð á ís frá innsöfnun þar til mælingar fóru fram, til að tryggja að hitastig sýna væri ávallt það sama. Mælirinn var stilltur daglega með því að mæla þrjár staðallausnir af mismunandi sýrustigi (pH 4,00, 7,00 og 10,00). Blandað var vel í hrognavökvanum fyrir mælingu sýrustigs og framkvæmdar tvær mælingar á hverju sýni. Við úrvinnslu niðurstaða var notað meðaltalsgildi þessara tveggja mælinga.

### 2.2.3. Vatnsvirkni

Vatnsvirkni lýsir hlutþrýstingi vatns yfir vökva/hlut í lokuðu rými og er því með öðrum orðum mælikvarði á tiltækt vatn. Vatnsvirkni er oft notuð sem mælikvarði á nýtanleika vatns fyrir t.d. örverur, hraða þránunar og áhrif á ensímvirkni. Vatnið er þó ekki að öllu leiti aðgengilegt, m.a. vegna þess að hluti þess er bundinn í mismunandi efnum t.d. vöðvapráðum. Vatnsvirkni er mæld á kvarða frá núll (skraufþurrt) að 1,00 aw sem er það gildi sem fæst fyrir hreint vatn. Sem dæmi má nefna að til að útiloka örveruvöxt í matvælum þarf vatnsvirkni að fara niður fyrir 0,70 aw en þar fyrir neðan geta aðeins efnabreytingar átt sér stað. Það hægir hins vegar á vexti margra bakteríutegunda við gildi milli 0,70-1,00 aw.



Vöxtur allra helstu smitgerla stöðvast við vatnsvirkni undir 0,86 aw. Einungis gersveppir og myglusveppir ná að vaxa við vatnsvirkni milli 0,70-0,86 aw (<http://www.matis.is>).

Vatnsvirknimælingar voru framkvæmdar á hrognavökva í AquaLab water activity meter (Decagon). Tækið samanstendur af innsigliðum klefa þar sem botnfylli af sýninu er komið fyrir í mælibakka. Gæta þarf vel að því að ekkert sullist ofan í mælinn því það skekkir mælingar. Rakinn í klefanum er síðan mældur eftir að kerfið hefur náð jafnvægi við ákveðið hitastig sem ávallt var haft um 24,5°C. Staðallausn með gildinu  $0,984 \pm 0,003$  aw var fyrst mæld og síðan framkvæmd ein mæling á hverju sýni.

#### **2.2.4. Osmosupéttni**

Osmosupéttni (osmolality) er mælikvarði á fjölda sameinda í ákveðnu magni vökva. Því stærri sem sameindirnar eru, því færri sameindir rúmast í lausninni og því færri sem sameindirnar eru í vökvanum, því lægra er osmolality. Osmolality hefur líka áhrif á það hvort lausnin dregur í sig vökva eða hvort hún missir vökva.

Mælingar á osmolality í hrognavökva voru framkvæmdar með Electronic Semi-Micro Osmometer (KNAUER) þar sem notuð var “freezing point” aðferð þar sem osmolality er mælt við frostmark. Staðallausnir af 0 millimolar (vatn) og 400 milliosmolar styrk voru notaðar til þess að stilla tækið fyrir mælingar (daglega). Mælingar voru framkvæmdar samkvæmt leiðbeiningum frá framleiðanda mælisins (KNAUER) og hvert sýni mælt þrisvar sinnum. Við úrvinnslu niðurstaða voru meðaltöl mælinganna notuð.

#### **2.2.5. Leiðni**

Leiðni er háð styrk lausna og endurspeglar fjölda jóna sem lausnin inniheldur. Leiðni mælist í lausnum sem innihalda jónir, vegna þess að jónirnar flytja rafstraum yfir gapið í mælinum. Leiðni er mæld í einingunni símens (S) eða míkrósímens ( $\mu\text{S}$ ) sem er sú eining sem notuð var við mælingar á leiðni hrognavökva í tilrauninni.

Leiðni í hrognavökva var mæld í glerglösum með EC meter Model 1481-61 (Cole-Parmer Instrument Co) og niðurstöður leiðréttar miðað við 25°C. Fyrir hverja mælingu var mælir stilltur með staðallausn sem innihélt 702,1 ppm NaCl og gaf leiðnina 1413  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

### 2.2.6. Samsetning heildarflóru baktería

Samsetning heildarflóru baktería í hrognum og hrognavökva þeirra var rannsökuð með PCR-DGGE (polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis) aðferð sem þróuð hefur verið af starfsmönnum Matís/HA á Akureyri og notuð til rannsókna á bakteríuflóru á fyrstu stigum fiskeldis (Bjornsdottir o.fl. 2009). Erfðaefni V3 svæðis á 16S geni bakteríanna er þá magnað með aðstoð 515F-GC og 806R vísa (TAC Copenhagen) eins og lýst er í Griffiths o.fl. (2001). Afurðirnar voru síðan aðskildar með rafdrætti í DGGE (8% acrylamide, 30-60% urea-formamide gradient) við 60°C og 60mA í 14 klst.

### 2.2.7. Fituútdráttur og fitusýrugreining

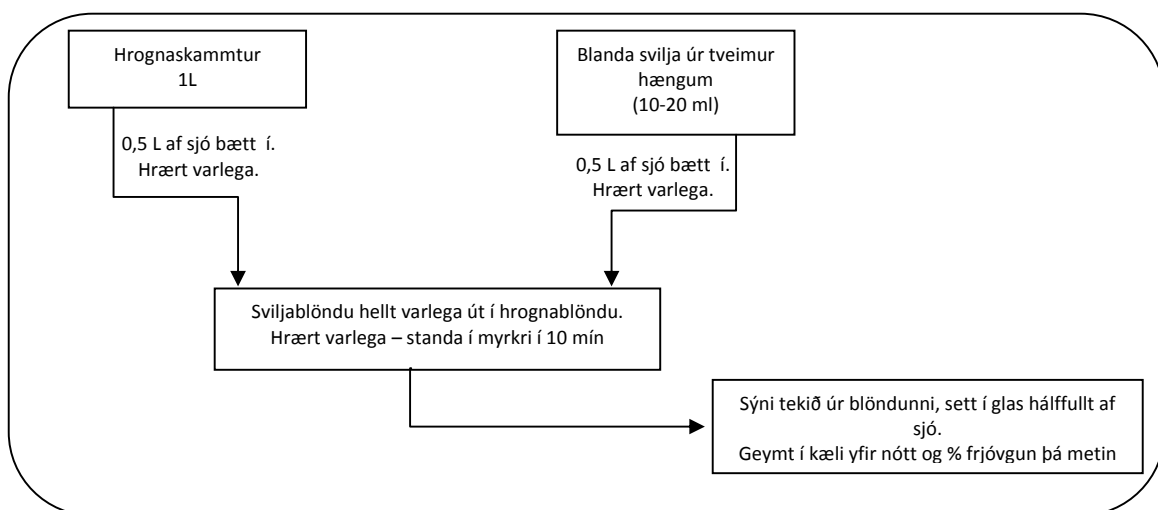
Gerður var samanburður á fitusýrusamsetningu valinna hrognaskammta með annarsvegar mjög háa (3 sýni) og hins vegar mjög lága (4 sýni) frjóvgunarprósentu.

Til greiningar voru tekin 10g af hrognum úr hverju sýni og mælingar gerðar á heildarmagni fitusýra svo og á hlutfalli mettaðra fitusýra (SFA; C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0 og C22:0), einómettuðra fitusýra (MUFA; C16:1n9, C16:1n7, C18:1n11, C18:1n9, C18:1n7, C18:1n5, C20:1n11, C20:1n9, C20:1n7, C22:1n9 og C24:1) og fjölómettuðra fitusýra (PUFA; C16:2n4, C18:2n6, C18:3n6, C18:3n4, C18:3n3, C18:4n3, C20:2n6, C20:3n6, C20:3n3+C20:4n6, C20:4n3, C22:2n6, C20:5n3 (EPA), C22:5n3 og C22:6n3 (DPA)). Fituútdráttur var framkvæmdur af starfsmönnum Matís á Akureyri með klóróform/metanol aðferð (Folch o.fl. 1957). Metýlun var gerð samkvæmt AOCS Official Method Ce 1b-89 með smávægilegri aðlögun (Þorkelsson o.fl. 2009) og gasgreining á fitusýrumetýl esterum (FAME) síðan framkvæmd á rannsóknastofu Matís í Reykjavík. Notaður var Varian 3900 GC gasgreinir með fused silica hárpípusúlu (HP-88, 100 m x 0.25 mm x 0.20 µm film), skiptu inntaki (*split injector*) og logajónunarnema (*flame ionisation detector*) sem tengdur var við Galaxie Chromatography Data System, Version 1.9.3.2 software. Ofninn var forritaður samkvæmt AOAC 996.06: 100°C í 4 mínútur, þá var hitinn hækkaður upp í 240°C með um 3°C hækkun/mínútu og þessum hita haldið í 15 mínútur. Hitastig inntaks var 225°C og nemans 285°C. Ferðafasi var helium, flæðihraði 0.8 mL/min og skiptihlutfall inn á súlu 200:1.

Vikmörk voru  $\pm 0,05\%$  fyrir fitusýrur sem voru á bilinu 0,1-1% af heildarfitusýrum í sýni og  $\pm 0,1\%$  fyrir fitusýrur sem voru yfir 1% af heildarfitusýrunum í sýni, en með eftirfarandi undantekningum: C14:0 =  $\pm 0,02\%$ ; C16:0 =  $\pm 0,02\%$ ; C18:0 =  $\pm 0,04\%$ ; C18:1n-9 =  $\pm 0,03\%$ .

### 2.3. Frjóvgunartilraunir

Frjóvgun hrognar var framkvæmd með hefðbundnum aðferðum sem notaðar hafa verið hjá Fiskey um árabíl (mynd 2). Hrygnur og hængar voru kreist af starfsmönnum Fiskeyjar, skammtar af hrognum og sviljum síðan fluttir í seiðaframleiðslustöðina þar sem frjóvgun fór fram. Sérstakt hrognaherbergi hefur verið útbúið í seiðastöðinni á Hjalteyri þar sem hitastigi er haldið stöðugu við  $7^{\circ}\text{C}$ . Við frjóvgun er notaður síaður sjór sem er  $5^{\circ}\text{C}$  og fer frjóvgunin fram í dauðu rauðu ljósi auk þess sem mikilvægt er að sá sem sér um frjóvgunina sótthreinsi hendur sínar vandlega og klæðist viðeigandi hlífðarfatnaði.



Mynd 2. Aðferð við frjóvgun hrognar (Fiskey)

Sjó er bætt gætilega saman við hrognin og hrært varlega í með höndunum. Um 10-20ml af sviljum þarf í hvern 1 L af hrognum. Svilin eru virkjuð með því að hella þeim gætilega út í sjó og hrært varlega í. Þekkt er að gæði svilja eru mismunandi og getur það haft mikil áhrif á frjóvgun. Því er venjan að nota blöndu frá tveimur hængum í hvert skipti. Sviljablöndunni er

hellt gætilega saman við hrognablönduna og blandað varlega saman með höndunum. Blöndunni er síðan komið fyrir í myrkri í 10 mínútur og þá tekið sýni sem notað er til þess að meta frjóvgunarprósentu daginn eftir. Þá er hrært varlega í fötunni og ein matskeið af hrognum (lágmark 40 hrogn) síðan færð yfir í Erlenmeyer flösku sem er hálf full af sjó (5°C). Sýnið er geymt í myrkri við 5°C til næsta dags. Þá er blandað varlega í prufunni og um 40 hrognum hellt yfir á net til að fjarlægja vökva áður en þeim er komið fyrir á plexigler-plötu með þar til gerðum fræstum rákum sem hrognin sitja í. Hrognin eru skoðuð undir víðsjá og frjóvgunarhlutfall og gæði frumuskiptingar metið. Ef frumuskipting sést, telst eggíð frjóvgað. Frumuskipting hrognanna á að vera sem kassalöguðust en getur verið bjöguð og telst hrognið þá með óeðlilega frjóvgun. Frjóvguðu hrognin eru talin og frjóvgunarprósentan reiknuð út frá því. Stærð (þvermál) frjóvguðu hrognanna er jafnframt mæld með skífumáli (mm kvarði) þar sem stuðst er við meðalstærð 10 frjóvgaðra hrogna við útreikninga á hrognastærð í skammtinum. Þvermál frjóvgaðra lúðuhrogna er yfirleitt á bilinu 2,8 – 3,2 mm. Í verkefninu voru framkvæmdar tilraunir með frjóvgun í mismunandi umhverfi, ýmist með því að breyta magni af viðbættum sjó og bæta efnum út í umhverfið við frjóvgun.

### **2.3.1. Breytt magn af viðbættum sjó við frjóvgun**

Tilraun með mismunandi magn af viðbættum sjó við frjóvgun hrogna var framkvæmd á hrognaskömmtum sem safnað var frá tveimur hrygnum (normalhópur). Tilraunin var framkvæmd 11. maí 2009 af Heiðdísí Smáradóttur, rannsóknar- og þróunarstjóra Fiskey. Hrognaskömmtumum var þá skipt í tvo hluta og annar hlutinn var frjóvgaður með hefðbundnu magni af sjó (1L sjór á móti 1L hrogn) og hinn hlutinn með helmingi minna magni af sjó (0,5L sjór á móti 1L hrogn). Hlutfall frjóvgaðra hrogna var síðan skoðað með hefðbundnum aðferðum.

### **2.3.2. Viðbætt efni við frjóvgun**

Framkvæmdar voru fleiri tilraunir þar sem efnum var bætt í umhverfi hrogna og svilja við frjóvgun. Þessar tilraunir voru framkvæmdar á hrognum frá öllum þremur hrygningarhópum Fiskeyjar. Fyrstu tilraunirnar voru framkvæmdar í normalhópi hrygna 9–11. júní 2009, í

seinkuðum hópi á tímabilinu 28. september – 5. október 2009 og frekari tilraunir síðan framkvæmdar í flýttum hópi hrygna á tímabilinu 12–26. janúar 2010.

Tilraunir með frjóvgun hrogna úr normalhópi hrygna voru framkvæmdar á rannsóknastofu Matís að Borgum. Hrygnur og hængar voru þá kreist á Dalvík að morgunlagi og skammtar fluttir í seiðaeldisstöð Fiskeyjar á Hjalteyri þaðan sem þeir voru fluttir á rannsóknastofu Matís að Borgum. Safnað var hrognum frá þremur hrygnum og var það gert undir lok hrygningartímans (1 hrygna 9. júní, 2 hrygnur 11. júní 2009). Við framkvæmd tilraunanna var fylgt aðferð Fiskeyjar þar sem frjóvgun var framkvæmd undir rauðu ljósi og vel passað upp á að vinna eins dauðhreinsað og kostur var. Hrognaskömmunum var skipt upp og hver tilraun framkvæmd í 25 ml af hrognum. Frjóvgun var síðan framkvæmd með blöndu svilja frá tveimur hængum. Hver tilraun var framkvæmd í þrítekningu þar sem mismunandi umhverfi var skapað fyrir bæði hrogn og svil með því að bæta efnunum út í sjóinn. Hrognaskammtar frjóvgaðir með hefðbundnum hætti voru hafðir til viðmiðunar. Tafla 1 gefur yfirlit yfir þá þætti sem skoðaðir voru.

**Tafla 1. Viðbætt efni við frjóvgun.**

Rannsóknþættir		Styrkleiki			pH
1.	KCl	0,2 mM	1,0 mM	0,4 mM	8,00
2.	CaSO <sub>4</sub>	3 mM	2 mM	4 mM	8,00
3.	Sýrustig*	pH 9,00	pH 7,50	pH 8,50	
4.	MgSO <sub>4</sub>	10 mM	11 mM	9 mM	8,00
5.	Thiamin	0,05 g/L	0,1 g/L	0,01 g/L	8,00
6.	Bekaplex	0,5 ml/1000ml	1,0 ml/1000ml	0,05 ml/1000ml	8,00
7.	Glucosi	250 mM	150 mM	50 mM	8,00

\* sýrustigi breytt með notkun 0,1M HCl eða 0,2M NaOH lausn

Í fyrstu tilraun (9. júní 2009) var heildar hrognaskammti (700 ml) sem safnað var frá hrygnunni skipt í 25 ml skammta sem frjóvgaðir voru við 15 mismunandi aðstæður (Tafla 1, rannsóknþættir 1-5) auk þess sem þrjú skammtar voru frjóvgaðir með hefðbundnum hætti. Þessar tilraunir voru endurteknaðar í annarri tilraun (11. júní 2009) auk þess sem 25 ml skammtar frá einni hrygnu (heildarskammtur 900 ml) voru frjóvgaðir í nærveru mismunandi magns af Bekaplexi (Tafla 1, rannsóknþáttur 6). Í sömu tilraun voru skammtar frá annarri

hrygnu (heildarskammtur 800 ml) frjóvgaðir í nærveru mismunandi magns af Glucosa (Tafla 1, rannsóknabáttur 7). Frjóvgunarprósenta var skoðuð daginn eftir í sýnum sem geymd voru í kæli yfir nótt og samanburður gerður við hrogn sem frjóvgað voru með hefðbundnum hætti.

Niðurstöður um frjóvgunarhlutfall hroгна sem frjóvgað voru með hefðbundnum hætti þóttu benda til þess að of langur tími hefði liðið frá kreistingu og þar til frjóvgun var framkvæmd í þessari tilraun. Því voru gerðar breytingar á framkvæmd tilrauna í framhaldinu (sept-okt 2009 og janúar 2010) og tilraunirnar þá framkvæmdar í seiðaeldisstöð Fiskeyjar á Hjalteyri. Hver tilraun var framkvæmd í tvítekningu auk þess sem einungis einn rannsóknabáttur var prófaður hverju sinni samanborið við frjóvgun með hefðbundnum hætti. Hefðbundin aðferð var notuð við frjóvgun (mynd 2) þar sem viðbættum efnum var bætt út í umhverfi hroгна en svilin voru virkjuð með hefðbundnum hætti.

Framkvæmdar voru 5 aðskildar tilraunir á 25 ml hrognaskömmtum þar sem rannsóknabættir 1-3 (2 tilraunir) og 5 voru prófaðir á hrognum frá seinkuðum hópi hrygna. Í framhaldi af þessum tilraunum voru framkvæmdar tilraunir á stærri skömmtum hroгна (100 ml) frá flýttum hópi hrygna og voru þar endurteknar tilraunir um áhrif breytinga á sýrustigi (sem þóttu gefa mest lofandi niðurstöður í fyrri tilraun) og viðbætts glúkósa í mismunandi styrkleika. Áhrif breytinga á sýrustigi við frjóvgun voru rannsökuð með því að bæta 20µl eða 50µl af 0,2M NaOH lausn út í 50ml af sjó áður en honum var blandað við hrognin. Rannsóknir á áhrifum viðbætts glúkósa voru framkvæmdar í 3 aðskildum tilraunum þar sem glúkósa (25mM, 50mM, 100mM, 150mM og 250mM) var bætt út í sjó áður en honum var blandað við hrognin.

### **3. NIÐURSTÖÐUR**

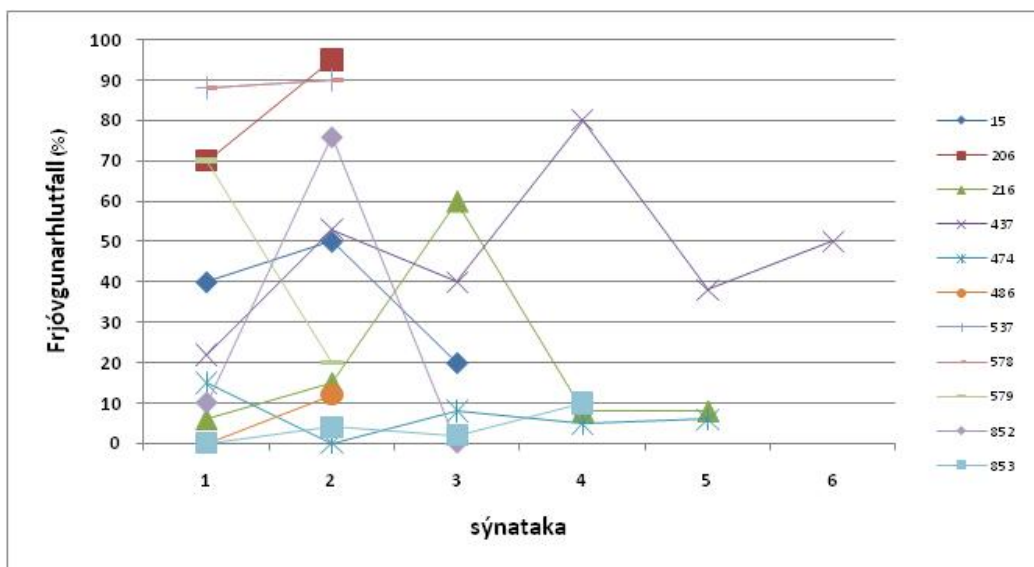
Framkvæmdar hafa verið umfangsmiklar rannsóknir á frjóvgunarhlutfalli lúðuhroгна frá fjölda hrygna í tveimur hrygningarhópum. Einnig hafa verið framkvæmdar tilraunir með mismunandi aðferðir við frjóvgun hroгна og áhrif þess á frjóvgunarhlutfall rannsakað.

Starfsmenn Fiskeyjar hafa áralanga reynslu af kreistingum og allri umgengni við fiskana sem m.a. felst í mati á því hvenær hrygnurnar eru tilbúnar að losa egg sem er mikilvægt m.t.t. þess að valda sem minnstu stressi hjá hrygnunum sem getur haft mikil áhrif á hrognagæðin. Í þessari rannsókn var sjónum einvörðungu beint að áhrifaþáttum hrygna á frjóvgunarhlutfall og reynt að lágmarka möguleg áhrif hænga með því að nota ávallt blöndu svilja frá tveimur hængum við frjóvgun.

### 3.1. Frjóvgunarhlutfall hrognu yfir hrygningartímabilið

Hrygnurnar losa egg á 2-3ja daga fresti í um 10 skipti og því mögulegt að fylgjast með frjóvgunarhlutfalli hrognu frá sömu hrygnum með sýnatökum nokkrum sinnum yfir tímabilið. Hrygnur byrja á mismunandi tímum að hrygna en töluvert langt var liðið á hrygningartímann þegar sýnatökur hófust og því mismunandi hversu oft tókst að ná sýnum frá sömu einstaklingum, allt frá tveimur upp í sex sýni frá sömu hrygnunni. Sýnum var safnað úr öllum hrygningarskömmtum sem fengust á tímabilinu.

Niðurstöður benda til þess að mikill munur sé á frjóvgunarhlutfalli á milli hrognaskammta frá sömu hrygnu þó svo sumar hrygnur séu stöðugri (mynd 3).



Mynd 3. Frjóvgunarhlutfall (%) í mismunandi hrognaskömmum einstaka hrygna sem fylgt var eftir með sýnatökum úr hverjum hrognaskammti yfir tímabilið.

Hrogn frá ungum hrygnum sem nýlega hafa hafið hrygningu (486, 852, 853) reyndust vera með lágt frjóvgunarhlutfall í öllum sýnatökum (meðal frjóvgun 13%, 32% og 15%). Hrogn frá eldri hrygnum reyndust með mun hærra frjóvgunarhlutfall sem samræmdist þekktri hrygningarsögu þeirra (upplýsingar frá Heiðdísí Smáradóttur). Hrygna númer 578 er t.d. þekkt fyrir mjög góð hrognagæði en hrygnur 474 og 216 fyrir frekar slök gæði hrogna.

### **3.2. Mælipættir og frjóvgunarhlutfall**

Sýndar eru niðurstöður mælinga sem framkvæmdar voru á hrognavökva og þær bornar saman við niðurstöður frjóvgunarhlutfalls í sömu hrognaskömmtum sem skoðað var af starfsmönnum Fiskeyjar daginn eftir frjóvgun.

Safnað var sýnum úr öllum hrognaskömmtum sem komu inn í stöðina á virkum dögum á tímabilinu og reyndist því unnt að fá sýni úr bæði mjög slæmum og mjög góðum skömmtum til samanburðar. Samtals var safnað 54 hrognasýnum, úr normalhópi hrygna (24 skammtar) svo og seinkuðum hópi (30 skammtar). Í normalhópi hrygna reyndist frjóvgunarhlutfall vera á bilinu 5-90% auk þess sem einn skammtur frjóvgaðist ekki (0% frjóvgun). Meðalfrjóvgun í þeim hrognaskömmtum sem sýni voru tekin úr var 45%. Í seinkuðum hópi hrygna reyndist frjóvgunarhlutfall vera á bilinu 2-95% og 5 hrognaskammtar sem frjóvgaðust ekki (0% frjóvgun). Meðalfrjóvgun í þeim hrognaskömmtum sem sýni voru tekin úr var 26%.

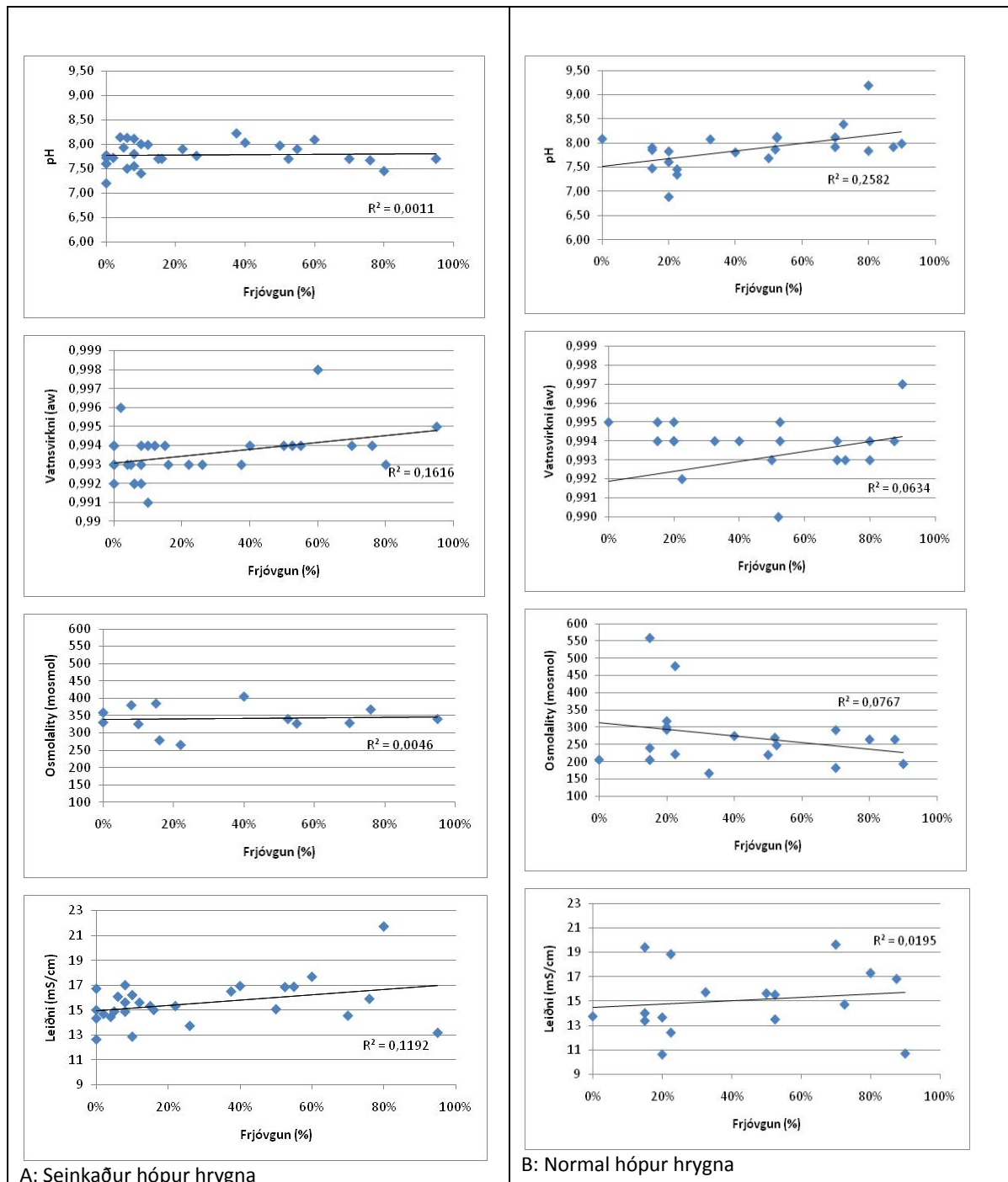
#### **3.2.1. Samband mælipátta og frjóvgunarhlutfalls**

Ekki var mikill breytileiki í þeim mælipáttum sem skoðaðir voru í hrognavökva en þeir voru sýrustig (pH), vatnsvirkni, osmolality og leiðni. Mynd 4 sýnir samband mælipáttanna og frjóvgunarhlutfalls í hrognavökva.

Þó svo e.t.v. séu ákveðnar vísbendingar um að aukin frjóvgun sé tengd hærra sýrustigi ( $R^2=0.2582$ ), meiri vatnsvirkni ( $R^2=0.1616$ ) og hærri leiðni ( $R^2=0.1192$ ) þá reyndist ekki vera marktæk fylgni á milli neinna mælipátta og frjóvgunarhlutfalls hrogna ( $R^2=0.001-0.26$ ) (mynd 4). Jafnframt voru valdir úr hrognaskammtar með um eða yfir 50% frjóvgun en ekki reyndist



heldur vera marktæk fylgni á milli mæliþáttanna og frjóvgunarhlutfalls hrogna í þessum hópi (niðurstöður ekki sýndar).

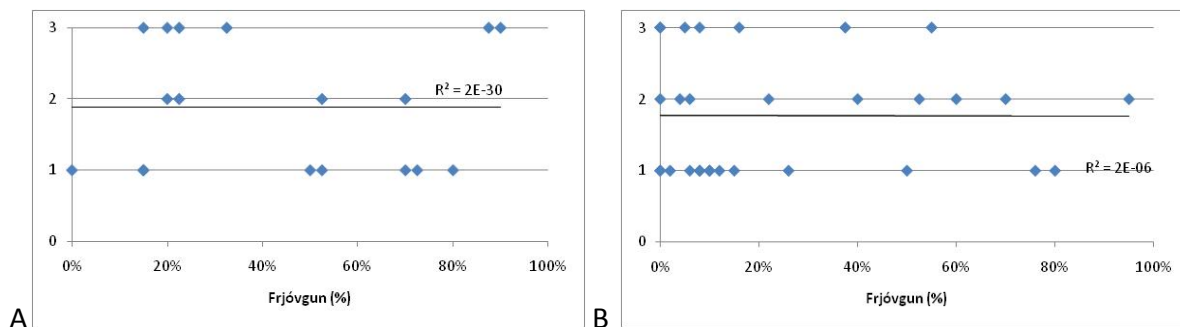


A: Seinkaður hópur hrygna

B: Normal hópur hrygna

Mynd 4. Samband frjóvgunarhlutfalls (%) og mismunandi mæliþátta í hrognavökva (sýrustig, osmolality, vatnsvirkni og leiðni) í seinkaðum hópi (A) og normalhópi hrygna (B). ( $R^2$  = fylgnistuðull).

Erfitt getur reynst að meta magn hrognavökva en í verkefninu var það metið þannig að lítil vökvi fékk gildið 1, meðal magn vökva gildið 2 og gildi 3 ef vökvamagnið var mikið. Þó nokkur munur reyndist vera á magni hrognavökva í sýnum og voru sumir skammtar mjög þurrir þannig að erfitt reyndist að ná í nægilega mikið magn vökva til mælinga. Hrognavökvi var einnig oft á tíðum mjög seigfljótandi og reyndist þá erfitt að fá stöðug mæligildi í osmolar- og leiðnimælingum. Ekki reyndist vera samband á milli frjóvgunarhlutfalls (%) og magns hrognavökva, hvorki í normalhópi né í seinkuðum hópi hrygna (mynd 5). Ekkert samband reyndist heldur vera milli frjóvgunarhlutfalls og hversu rauður hrognavökvinn var (niðurstöður ekki sýndar).



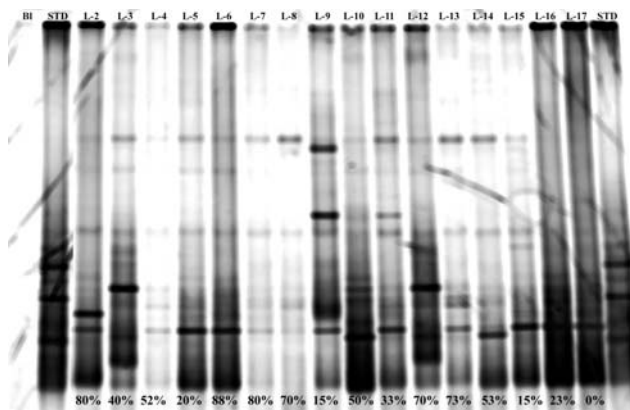
Mynd 5. Samband frjóvgunarhlutfalls (%) og magns hrognavökva í normalhópi (A) og seinkuðum hópi hrygna (B). Magn hrognavökva var metið sem lítið (1), meðal (2) eða mikið (3). ( $R^2$ = fylgnistuðull).

### 3.2.2. Bakteríuflóra

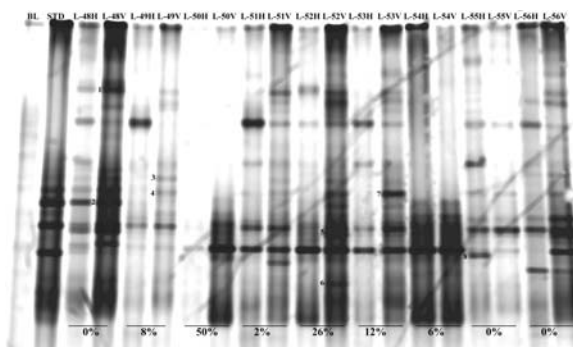
Samsetning heildarflóru baktería var greind í sýnum af hrognum og hrognavökva þeirra auk þess sem skoðað var hvort breytingar yrðu á samsetningu bakteríuflóru hrogna við frjóvgun. Til þess að auðvelda samanburð á milli mismunandi keyrslna var keyrður staðall í hverju geli sem samanstóð af hreinræktum þriggja þekktra bakteríustofna.

Niðurstöður sýna að 4-5 bakteríutegundir voru ríkjandi í hverju sýni og virtist sem um væri að ræða svipaðar tegundir/hópa baktería í flestum sýnunum (myndir 6 og 7). Samsetning heildarflóru baktería hrogna og hrognavökva þeirra reyndist vera svipuð en þó ívið fjölbreyttari í hrognavökva. Þetta gæti bent til þess að bakteríutegundir í umhverfi hrogna við frjóvgun nái ekki alltaf fótfestu á hrognunum (mynd 7).

Ólíkt munstur banda í DGGE geljunum gefur vísbendingar um mismunandi samsetningu heildarflóru baktería í hrognum með hærra samanborið við lægra frjóvgunarhlutfall (myndir 6 og 7). Bönd sem lenda ofarlega í DGGE gelinu eru bakteríur sem innihalda hátt hlutfall G/C í erfðaefninu og bakteríur með lægra hlutfall G/C lenda neðar í geljunum. Í 50% sýna með lægra frjóvgunarhlutfall (<70%) greindust afurðir ofarlega í gelinu (hátt G/C hlutfall) en ekki í neinu þeirra hrognasýna þar sem frjóvgunarhlutfall var hátt.

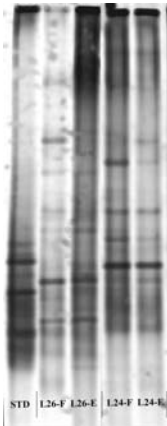


Mynd 6. Samsetning heildarflóru baktería greind með PCR-DGGE aðferð. Sýnd eru sýni af mismunandi hrognaskömmtum (H) sem fengið hafa hlaupandi númer við sýnatöku. Hlutfall frjóvgunar er gefið til kynna sem prósentu eggja sem frjóvgast hafa eftir sólarhring. Einnig er sýndur staðall (STD) sem samanstandur af hreinræktum baktería.



Mynd 7. Samsetning heildarflóru baktería greind með PCR-DGGE aðferð. Sýnd eru sýni af mismunandi hrognaskömmtum (H) og hrognavökva (V) í sömu sýnum og sem gefið var hlaupandi númer við sýnatöku. Hlutfall frjóvgunar er gefið til kynna sem prósentu eggja sem frjóvgast hafa eftir sólarhring í kæli. Númer við bönd í gelinu gefa til kynna afurðir sem skornar voru út til tegundagreiningar (1-8). Einnig er sýndur staðall (STD) sem samanstandur af hreinræktum baktería.

Eins og sjá má á mynd 8 reyndist samsetning bakteríuflóru mismunandi í hrognum frá mismunandi hrygnum. Samsetning bakteríuflórunnar breyttist lítilsháttar við íblöndun svilja (frjóvgun) og gefa niðurstöður því vísbendingar um að bakteríuflóra svilja sé breytileg.



Mynd 8. Samsetning heilarflóru baktería greind með PCR-DGGE aðferð. Sýnd eru sýni af hrognum fyrir (F) og eftir (E) frjóvgun. Einnig er sýndur staðall (STD) sem samanstendur af hreinræktum baktería.

Valin bönd voru skorin úr geljunum til frekari greiningar með raðgreiningu á 16S RNA geni baktería. Um er að ræða mjög stutta DNA búta (~200bp). Böndin þarf einnig að skera úr gelum undir UV ljósi til þess að unnt sé að greina böndin en UV ljós getur valdið niðurbroti á DNA. Því reynist einungis unnt að raðgreina DNA úr hluta banda sem skorin voru úr gelinu (tafla 2). Ekki fékkst tegundagreining á hluta þeirra bakteríutegunda sem voru ríkjandi í öllum sýnum af hrognum og hrognavökva (mynd 6 og mynd 7). Mismunandi hópar *Psychrobacter* sp. (vætanlega undirtegundir) var að finna í flestum sýnum af bæði hrognum og hrognavökva. Af öðrum tegundum sem greindust gæti *Methylobacter* sp. hugsanlega verið ríkjandi í sýnunum. Greining á ákveðnum hópi/undirtegund *Psychrobacter* sp. í einungis sýnum af hrognum með undir 70% frjóvgunarhlutfall (mynd 6, band #1) gefur vísbendingar um að þessi hópur gæti tengst minni hrognagæðum.

**Tafla 2. Tegundagreining baktería eftir raðgreiningu á afurðum sem skorin voru úr DGGE geli**

númer	BLAST identification	Division (% similarity)	GeneBank link
1	Uncultured bacterium clone	98	<a href="#">FJ900934</a>
	Psychrobacter sp.	98	<a href="#">GQ327988</a>
2	Uncultured bacterium clone	99	<a href="#">FJ900934</a>
	Psychrobacter sp.	99	<a href="#">GQ327988</a>
3	Uncultured gamma proteobacterium	91	<a href="#">GQ984346</a>
	Psychrobacter sp.	91	<a href="#">AM422563</a>
4	Uncultured bacterium	88	<a href="#">EU560344</a>
	Psychromonas sp.	88	<a href="#">FJ946519</a>
	endosymbiont of Oligobrachia haakonmosbiensis	88	<a href="#">AM883178</a>
	Alteromonas sp.	88	<a href="#">AF235123</a>
5	Uncultured Methylobacter sp.	93	<a href="#">EU124838</a>
6	Halomonas sp.	90	<a href="#">AY914060</a>
	Cobetia sp.	90	<a href="#">FN432346</a>
	Psychromonas heitensis	90	<a href="#">AB365351</a>
7	Psychrobacter sp.	98	<a href="#">GU166130</a>
	Uncultured bacterium	98	<a href="#">GQ866091</a>
8	Photobacterium sp.	96	<a href="#">GQ386822</a>
	Vibrio sp.	96	<a href="#">FN433076</a>

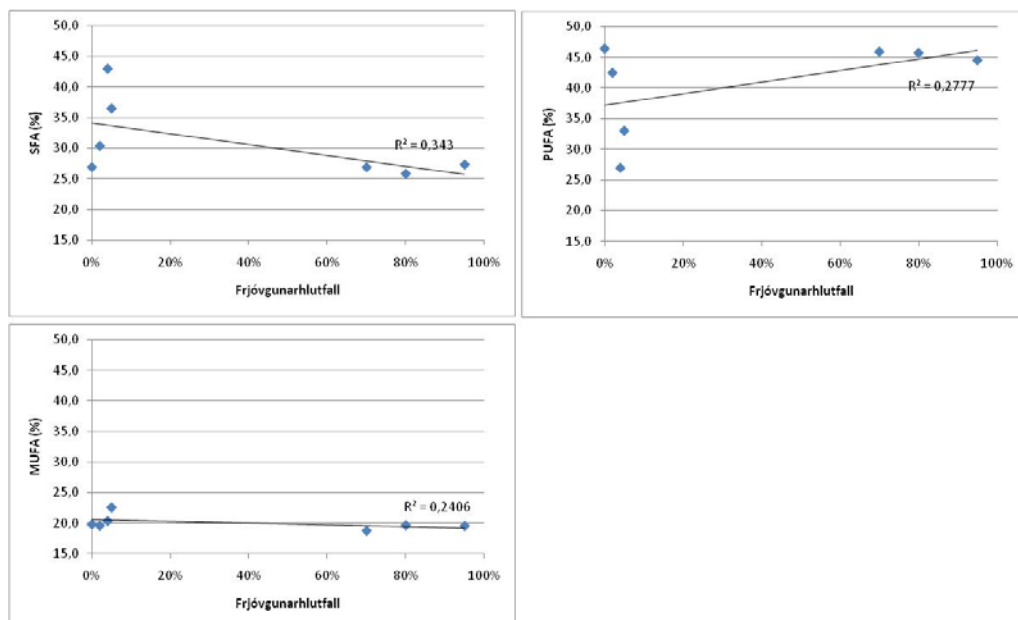
### 3.2.3. Fitúsýrusamsetning

Niðurstöður fitúsýrugreiningar eru settar fram sem heildarmagn fitúsýra í 10 g af hrognum svo og sem hlutfall mettaðra, einómettaðra og fjölómettaðra fitúsýra og hlutfalls óþekktra fitúsýra í hverju sýni (tafla 3).

Niðurstöður sýna mismunandi heildarmagn fitúsýra í hrognum en ekki var marktækt samband við frjóvgunarhlutfall ( $R^2=0,0077$ ). Vísbendingar eru um samband á milli frjóvgunarhlutfalls og samsetningar fitúsýra þar sem hrogn með hærra frjóvgunarhlutfall virðast innihalda minna magn mettaðra fitúsýra ( $R^2=0,343$ ), meira af fjölómettuðum fitúsýrum ( $R^2=0,2777$ ) og minna af einómettaðuðum fitúsýrum ( $R^2=0,2406$ ) (mynd 9).

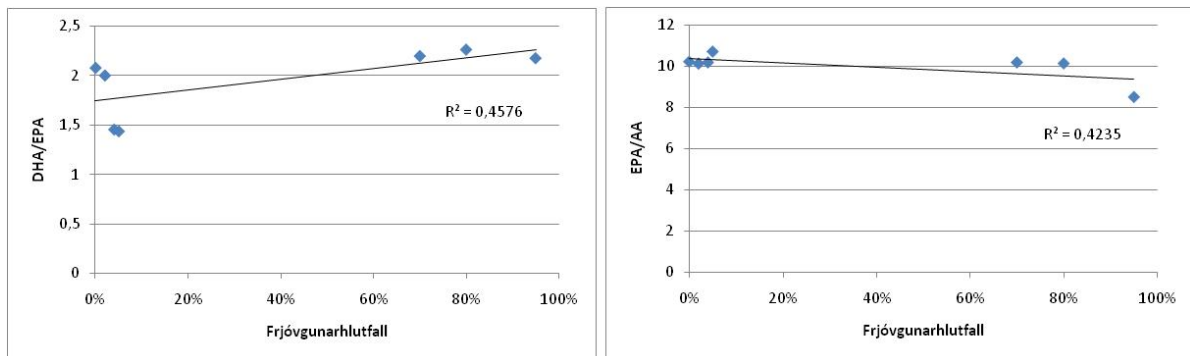
Tafla 3. Fitusýrugreining hrogna. Sýnt er heildarmagn fitusýra sett fram sem mg/10g. Hlutfall mettaðra (SFA), fjölómattaðra (PUFA), einómattaðra (MUFA) og óþekktra fitusýra er einnig sýnt.

Frjóvgunarhlutfall (%)	heildarmagn				
	fitusýra (mg/10g)	SFA (%)	MUFA (%)	PUFA (%)	óþekkt (%)
0	30,1	26,9	19,8	46,4	6,9
2	16,2	30,3	19,6	42,4	7,6
4	4,6	42,9	20,3	27,0	9,7
5	11,3	36,4	22,5	33,0	7,9
70	29,8	26,8	18,7	45,9	8,4
80	11,5	25,8	19,6	45,7	8,7
95	7,5	27,3	19,5	44,4	8,4



Mynd 9. Samband frjóvgunarhlutfalls (%) og hlutfalls mettaðra (SFA), fjölómattaðra (PUFA) eða einómattaðra fitusýra (MUFA). ( $R^2$  = fylgnistuðull).

Ef lítið er á hlutfall fitusýra sem nauðsynlegar eru fyrir þroskun lirfa og sem mest hafa verið tengdar við hrognagæði í fyrri rannsóknum, þá reyndist hlutfall þeirra vera á bilinu 13,14% - 27,15% (dókósaheksaensýra, DHA-22:6n-3), 9,01% - 12,97% (eikósapentaensýra, EPA-20:5n=3) og 0,89% - 1,40% (arachidonicensýra, AA) í þeim sýnum sem skoðuð voru. Vísbendingar eru um að hrogn með hærri frjóvgunarhlutfall innihaldi meira magn DHA ( $R^2=0,3085$ ) og AA ( $R^2=0,3166$ ) en minni tengsl voru á milli magns EPA og frjóvgunarhlutfalls hrogna ( $R^2=0,0701$ ). Auk þess benda niðurstöður til hærri frjóvgunarhlutfalls í hrognum með hærri hlutfall DHA/EPA ( $R^2=0,4576$ ) og lægra hlutfall EPA/AA ( $R^2=0,4235$ ) (mynd 10).



Mynd 10. Samband frjóvgunarhlutfalls (%) og innbyrðis hlutfalls nauðsynlegra fitusýra (DHA/EPA eða EPA/AA). ( $R^2$  = fylgnistuðull).

### 3.2. Breyttar aðferðir við frjóvgun lúðuhrogn

Framkvæmdar voru 11 aðskildar tilraunir þar sem hrogn frá öllum hrygningarhópum Fiskeyjar voru frjóvuguð í mismunandi umhverfi (breytt sjómagn eða viðbætt efni) og áhrif þess á frjóvgunarhlutfall skoðað í samanburði við hrogn sem frjóvuguð voru með hefðbundnum aðferðum. Til tilrauna voru eingöngu valdir hrognaskammtar sem starfsmenn Fiskeyjar höfðu metið vera af góðum gæðum samkvæmt útliti.

Tilraunir með mismunandi magn af sjó við frjóvgun voru framkvæmdar á hrognaskömmtum frá tveimur hrygnum (A og B). Niðurstöður sýna að ekki var marktækur munur á frjóvgunarhlutfalli hrogn sem frjóvuguð voru í helmingi minna magni af sjó en hefðbundið er notað (tafla 4).

Tafla 4. Frjóvgunarhlutfall hrogn þar sem frjóvgun var framkvæmd í mismunandi sjómagni. Niðurstöður eru settar fram sem hlutfall frjóvgaðra hrogn í samtals 40 hrognum. Hrognin voru ýmist frjóvuguð í hlutfallinu 1:1 (1 L af sjó á móti 1L af hrognum) eða 0.5:1 (0.5L sjó á móti 1L af hrognum).

	Hrygna A		Hrygna B	
Sjómagn	1-1	1/2 - 1	1-1	1/2 - 1
frjóvgunarhlutfall	86%	86%	68%	72%

Tvær aðskildar tilraunir með frjóvgun hrognna með viðbættum efnum voru framkvæmdar í júní 2009. Í fyrstu tilraun voru 15 mismunandi þættir prófaðir í sama hrognaskammti og aðeins einn þáttur í næstu tilraun en í báðum þessum tilraunum var frjóvgunarhlutfall ekkert. Með hliðsjón af þessum niðurstöðum voru gerðar breytingar á framkvæmd næstu tilrauna. Á tímabilinu september til október 2009 voru framkvæmdar 5 aðskildar tilraunir og 4 tilraunir í janúar 2010 til þess að sannreyna áhrif sem fengist höfðu vísbendingar um í fyrri tilraun. Niðurstöður eru sýndar í töflu 5.

**Tafla 5.** Frjóvgunarhlutfall hrognna sem frjóvguð voru við mismunandi umhverfisaðstæður. Niðurstöður eru settar fram sem hlutfall frjóvgaðra hrognna í samtals 40 hrognum og meðaltal tveggja endurtekninga þar sem mismunandi efnun í mismunandi styrkleika var bætt út í umhverfi hrognna við frjóvgun. Einnig er sýnd frjóvgunarprósenta hrognna sem frjóvguð voru með hefðbundnum aðferðum, ýmist í skömmtum af sömu stærð eða stærri skömmtum hrognna hjá Fiskey (kontról).

KCl	styrkleiki	1,0 mM	0,4 mM	0,2 mM	Kontról
	frjóvgun %	0	2,5	15	37,5*
CaSo4	styrkleiki	4 mM	3 mM	2 mM	
	frjóvgun %	13	6,5	4	17
Sýrustig	styrkleiki	pH 9,00	pH 8,50	pH 7,50	
	frjóvgun %**	1,0	2,0	0,0	0,0
	frjóvgun %	44,0	62,0	47,0	50,0
	styrkleiki		pH 8,50	pH 8,70	
	frjóvgun %		66,5	71,5	74,0
Thiamin	styrkleiki	0,1 g/L	0,05 g/L	0,01 g/L	
	frjóvgun %	7	14	5	17
Glúkósi	styrkleiki	250mM	150mM	50mM	
	frjóvgun %	54	66	89	67,5
	styrkleiki	100mM	50mM	25mM	
	frjóvgun %	76	77	62	75
	frjóvgun %		55***		48***

\* til viðmiðunar er stór skammtur af hrognum.

\*\* hrognagæði í þessum skammti almennt ekki góð og tilraun endurtekin.

\*\*\*tilraun framkvæmd í þrítekningu

Niðurstöður sýna að flest þau efni sem bætt var út í umhverfi hrognna við frjóvgun höfðu lítil eða jafnvel neikvæð áhrif á frjóvgun hrognna samanborið við hefðbundnar aðferðir. Undanskilið hér er frjóvgun við hærra sýrustig og með viðbættum glúkósa. Við frjóvgun er hefðbundið notaður sjór með sýrustig um pH 8,00 og mjög litlar sveiflur hafa reynst vera á



pH í sjónum hjá Fiskey. Niðurstöður fyrstu tilrauna bentu til þess að hærra sýrustig (pH 8,50) gæti haft jákvæð áhrif en sýrustig >8,50 hefði hins vegar neikvæð áhrif á frjóvgunarhlutfall. Ekki reyndist unnt að sannreyna þessar niðurstöður með endurteknum tilraunum (tafla 5). Endurteknar tilraunir með íblöndun glúkósa bentu hinsvegar til þess að glúkósi í ákveðnu magni (50mM) leiddi til aukningar á hlutfalli frjóvgaðra hrogna um að meðaltali 10% samanborið við hefðbundnar aðferðir (að meðaltali 73,7% að viðbættum glúkósa samanborið við að meðaltali 63,5% frjóvgun sem fékkst með hefðbundinni frjóvgunaraðferð).

#### **4. UMRÆÐA OG ÁLYKTANIR**

Framboð á hrognum er undirstaða framleiðslu og velgengni fiskeldis og felst því mikill ávinningur í bættum hrognagæðum og nýtingu hrogna. Gæði hrogna eru afar breytileg og hefur helsti mælikvarði á gæði þeirra verið frjóvgunarprósenta svo og afkoma frjóvgaðra hrogna og afkoma lirfa úr frumfóðrun. Þessir þættir gefa hins vegar ekki til kynna hvaða þættir það eru sem ákvarða gæði hrogna en fyrri rannsóknir hafa gefið vísbindingar um að hrognagæði ákvarðist af efna- og eðliseiginleikum en séu þó einnig háð þroskastigi hrognanna og ýmsum þáttum í umhverfinu við frjóvgun (Brooks o.fl. 1997). Nýleg rannsókn sem unnin var af meistaranemanda við Háskólann í Bodø í Noregi (Skålsvik – M.Sc. verkefni frá Háskólanum í Bodø, desember 2008) leiddi í ljós jákvæð tengsl frjóvgunarhlutfalls við magn, sýrustig og leiðni hrognavökva og dregin var sú ályktun að samlegðaráhrif þessara þátta geti útskýrt að stórum hluta mismunandi gæði lúðuhrogna. Niðurstöður þeirra rannsókna sem hér eru kynntar benda hinsvegar til þess að lítill breytileiki sé í þessum mæliþáttum og því ólíklegt að þeir hafi afgerandi áhrif á hrognagæði einir sér. Sú ályktun er dregin af niðurstöðum að hrognagæði ráðist af samspili mismunandi þátta en litlar líkur taldar á því að það séu þeir þættir sem mældir voru í verkefninu. Þess má geta að oft á tíðum reyndist erfitt að meta magn hrognavökva í sýnum og því um mjög gróft mat að ræða og sem ef til vill gefur ranga mynd af heildarmagni vökva í hrognaskömmtum.

Við framkvæmd frjóvgunar var leitast við að láta sem stystan tíma líða frá því sýnin komu í hús þar til tilraunir voru framkvæmdar. Vegna umfangs og fjölda þátta sem skoðaðir voru í fyrstu tilraunum (15 mismunandi þættir), var í sumum tilvikum ekki hjá því komist að nokkur tími liði frá kreistingu og þar til frjóvgun átti sér stað auk þess sem flytja þurfti sýnin langa leið (Dalvík – Hjalteyri – Akureyri) og hugsanlega hafa orðið breytingar á hitastigi sem getur haft áhrif á frjóvgun hrognanna. Við framkvæmd frjóvgunar í þessum fyrstu tilraunum var efnunum bætt út í sjó sem settur var út í bæði hrogn og svil og því gerðar breytingar á umhverfi beggja þátta. Svilin virkjast þegar þau eru látin út í sjó við ákveðið hitastig (5°C) en hreyfanleiki og frjóvgunargeta þeirra stjórna af utanaðkomandi þáttum s.s. hrognavökvanum og eiginleikum hans (Rurangwa o.fl. 2004). Hreyfigeta svilja var ekki skoðuð í tilrauninni en viðbætt efni gætu mögulega hafa áhrif á hreyfanleika þeirra og virkni. Gæði svilja eru mismunandi (Rurangwa o.fl. 2004) en til þess að minnka áhrif þess á frjóvgun er alltaf notuð blanda af sviljum frá tveimur hængum. Við framkvæmd næstu tilrauna var því einungis skoðaður einn þáttur hverju sinni til að lágmarka tíma frá kreistingu að frjóvgun auk þess sem svil voru virkjuð með hefðbundnum hætti. Til að fá sem raunhæfast mat á áhrifum mismunandi aðferða við frjóvgun voru hrogn frjóvguð með hefðbundnum aðferðum ávallt höfð til viðmiðunar.

Við náttúrulegar aðstæður hrygnir lúða á miklu dýpi þar sem bakteríuálag er mun minna en í efri lögum sjávar. Því er talið að egg lúðunnar séu sérstaklega viðkvæm fyrir bakteríuvexti (Hansen & Olafsen 1999). Fyrri rannsóknir sem unnar hafa verið í samvinnu Matís/HA og Fiskeyjar hafa sýnt að lúðuhrogn bera með sér talsvert mikla bakteríuflóru (Jóhannsdóttir o.fl. 2008; Bjornsdóttir o.fl. 2009) en slök hrognagæði hafa oft á tíðum verið tengd auknum fjölda baktería á yfirborði hrognanna (Hansen & Olafsen 1999). Niðurstöður þessa verkefnis gefa ennfremur vísbendingar um að samsetning heildarflóru baktería sé önnur í hrognum með hærra samanborið við lægra frjóvgunarhlutfall og því mögulegt að gæði hrognna ráðist m.a. af samsetningu bakteríuflóru þeirra.

Eitt af megin markmiðum rannsóknarinnar var að skoða tengsl efnasamsetningar og eiginleika hrognna á frjóvgunarhlutfall hrognanna en fyrri athuganir Fiskeyjar benda til þess að áhrif hænga þar á sé mun minni (Heiðdís Smáradóttir, rannsókn- og þróunarstjóri Fiskey) auk þess sem ávallt eru notaðir skammtar frá tveimur hængum til þess að minnka hugsanleg

áhrif hænaga. Rannsóknir benda til að efnainnihald hrogna hafi víðtæk áhrif á hrognagæði ýmissa fisktegunda og virðist næringarlegt ástand klakfisks því mikilvægt atriði við framleiðslu gæðahrogna (Izquierdo o.fl. 2001). Fisklirfur þurfa á nauðsynlegum næringarefnum að halda og ákveðin næringarefni s.s. nauðsynlegar fitusýrur og andoxunarefni eru sérstaklega mikilvæg í fóðri klakfiska og er þörf þeirra meiri en hjá ungfiski þrátt fyrir að of mikið magn geti einnig haft neikvæð áhrif á frjósemi (Izquierdo o.fl. 2001). Allir klakfiskar í stöðinni eru fóðraðir á sama hátt með vítamínbættri síld og þurrfóðri hins vegar leiða niðurstöður þessa verkefnis í ljós að hrognaskammtar innihalda mismunandi magn nauðsynlegra fitusýra. Niðurstöður verkefnisins benda til þess að hrognagæði hjá lúðu séu tengd fitusýrusamsetningu og aukið frjóvgunarhlutfall fylgi minna hlutfalli af mettuðum fitusýrum og auknu magni af bæði einómettuðum og fjölómettuðum fitusýrum. Niðurstöður sýna einnig að hlutfall nauðsynlegra fitusýra er mikilvægt þar sem betri gæði (aukið frjóvgunarhlutfall hrogna) virtust tengjast hærra hlutfalli DHA/EPA og lægra EPA/AA hlutfalli. Lúða hrygnir í lotum og reyndist mikill munur vera á gæðum hrogna mismunandi einstaklinga svo og hrognum frá sömu hrygnu yfir tímabilið, sem er í samræmi við fyrri rannsóknir (Norberg o.fl. 1991; Kjesbu o.fl. 1996). Fiskey hefur um árabil verið stærsti framleiðandi lúðuseiða í heiminum og hafa starfsmenn áralanga reynslu af meðhöndlun og kreistingu klakfiska en ýmsir þættir sem tengjast meðhöndlun geta haft áhrif á hrognagæði (Bromage o.fl. 1995). Sem dæmi má nefna ofþroskun hrogna við kreistingu sem talin er ein megin ástæða slakra hrognagæða í fiskeldi (McEvoy 1984) auk þess sem stressaðstæður eru þekktir áhrifavaldir (Bromage o.fl. 1995). Við frjóvgun eru hrognaskammtar ávallt metnir m.t.t. útlits hrogna og mjög litlum skömmtum sem líta illa út er hent. Það hefur hins vegar vantað áreiðanlega mælipætti sem nota má til þess að meta hrognagæði en markmið rannsóknarinnar var að leita slíkra þátta. Þetta var gert með víðtækri heimildaleit þar sem valdir voru mælipættir sem fyrri rannsóknir gáfu vísbendingar um að gætu haft áhrif á frjóvgunarhlutfall lúðuhrogna og í framhaldinu gerður samanburður á frjóvgunarhlutfalli hrogna og gildum mismunandi mælipátta. Tengsl samsetningar bakteríuflóru og frjóvgunarhlutfalls hrogna hafa ekki áður verið skoðuð en niðurstöður þessara rannsókna benda til þess að í skömmtum með lægri frjóvgunarþrósentu sé að finna hópa baktería (*Psychrobacter* sp.) sem ekki var að finna í hrognum þar sem frjóvgunarhlutfall var hærra.

Niðurstöður sýna enn fremur að bakteríuflóra svilja geti haft áhrif á samsetningu bakteríuflóru hrogna.

Niðurstöður þessa verkefnis benda eindregið til þess að tími frá kreistingu til frjóvgunar sé afar mikilvægur og að sem stystur tími líði þar til frjóvgun er framkvæmd en það samræmist niðurstöðum Holcomb og féлага (2004) þar sem tími frá kreistingu hafði mikil áhrif á frjóvgun hjá laxfiskum. Hækkun á sýrustigi sjávar úr pH 8,0 í pH 8,5 gaf lofandi niðurstöður í fyrstu tilraunum en það leiddi til 12% aukningar í frjóvgunarhlutfalli samanborið við kontról. Ekki reyndist unnt að sannreyna þessar niðurstöður í endurteknum tilraunum en þar kom hins vegar í ljós að hrogn voru mjög viðkvæm fyrir of háu sýrustigi. Vegna mismunandi sýrustigs og eiginleika mismunandi hrognaskammta reyndist erfitt að stilla nákvæmlega sýrustig við frjóvgun og gæti það að hluta til skýrt misvísandi niðurstöður tilraunanna.

Íblöndun glúkósa í ákveðnum styrkleika (50mM) við frjóvgun reyndist gefa mest lofandi niðurstöður og sýndu endurteknar tilraunir að það leiddi til um 10% aukningar á frjóvgunarhlutfalli hrogna. Fyrri rannsóknir sýna að hrogn og lifur á fyrstu stigum þroskunar eru mjög viðkvæm fyrir ýmsum umhverfispáttum. Glúkósi og aðrar sykrur eru ákjósanleg næring fyrir bakteríur og gæti íblöndun glúkósa því stuðlað að auknum vexti baktería sem gæti haft neikvæð áhrif á afkomu hrognanna. Við framleiðslu lúðuseiða á iðnaðarskala er mörgum hrognaskömmtum blandað saman í hrognaker eftir frjóvgun og síðan mörgum hrognakerjum blandað saman í stór síló við klak og því ekki unnt að fylgja eftir einstaka hrognaskömmtum m.t.t. afkomu og gæða lifra. Í nýju verkefni sem sótt hefur verið um til AVS sjóðsins er áætlað að framkvæma umfangsmeiri rannsóknir á breyttum aðferðum við frjóvgun lúðuhrogna með áherslu á íblöndun glúkósa og þar sem rannsökuð verða áhrif á afkomu hrogna svo og afkomu og gæði lifra. **Hjá Fiskey hefur frjóvgunarhlutfall hrogna á undanförunum árum verið að meðaltali 45% en samkvæmt niðurstöðum þessa verkefnis mætti með íblöndun glúkósa við frjóvgun auka það hlutfall í a.m.k. 55%.** Ætla má að aukning í frjóvgunarhlutfalli hrogna orsaki að minnsta kosti sömu aukningu í lifun hrogna (og jafnvel meira) og gefi því möguleika á tekjuaukningu sem nemur tugum milljóna króna á ári hverju fyrir fiskeldisfyrirtæki í landinu (Fiskey).

## 5. ÞAKKARORÐ

Þátttakendur þakka AVS sjóðnum fyrir fjárstuðning við verkefnið sem gerði þessar rannsóknir mögulegar. Starfsmönnum Fiskeyjar og þá sérstaklega Heiðísi Smáradóttur, rannsókn- og þróunarstjóra fyrirtækisins, er þakkað fyrir þeirra framlag við framkvæmd og úrvinnslu tilraunanna. Dr. Igor Babiak og öðrum sérfræðingum Háskólans í Bodø í Noregi er ennfremur þakkað fyrir veittar upplýsingar og samstarf í verkefninu. Þá er Guðrúnu Sveinbjörnsdóttur, nemandi í BSc námi í líftækni við HA þökkuð aðstoð við mælingar í sumarstarfi við framkvæmd fyrri hluta verkefnisins.

## 6. HEIMILDIR

- Avery T S. and Brown JA.** 2005. Investigating the relationship among abnormal patterns of cell cleavage, egg mortality and early larval condition in *Limanda ferruginea*: *Journal of Fish Biology*, v. 67, p. 890-896.
- Björnsdóttir R, Johannsdóttir J, Coe J, Smáradóttir H, Agustsson T, Sigurgísladóttir S, Gudmundsdóttir BK.** 2009. Survival and quality of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) in intensive farming: Possible impact of the intestinal bacterial community. *Aquaculture* 286 (2009) 53-63.
- Black KD, Pickering AD.** 1998. *Biology of farmed fish*: Sheffield, UK, Sheffield Academic Press Ltd.
- Bromage N, Bruce M, Basavaraja N, Rana K, Shields R, Young C, Dye J, Smith P, Gillespie M, Gamble J.** 1994. Egg quality determinants in finfish: The role of overripening with special reference to the timing of stripping in the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*.
- Bromage N, Bruce M, Basavaraja N, Rana K, Shields R, Young C, Dye J, Smith P, Gillespie M, Gamble J.** 1995. Egg quality determinants in finfish: The role of overripening with special reference to the timing of stripping in the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*).
- Brooks, S., Tyler, C.R., and Sumpter, J.P.** 1997. Egg quality in fish: what makes a good egg? *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 7, 387-416.
- Folch J, Lees M, Stanley GHS.** 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 226(1):497-509.

- Griffiths S, Melville K, Cook M, Vincent S, Pierre MS, Lanteigne C.** 2001. Profiling of bacterial species associated with haddock larviculture by PCR amplification of 16S rDNA and denaturing gradient gel electrophoresis, *J. Aquat. Anim. Health* 13:355–363
- Hansen, G.H., Olafsen, J.A.** 1999. Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. *Microbial Ecology* 38 (1): 1-26.
- Holcomb M, Cloud JG, Woolsey J, Ingermann RL.** 2004. Oxygen consumption in unfertilized salmonid eggs: an indicator of egg quality? *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 138(3):349-354
- Izquierdo MS, Fernández-Palacios H, Tacon AGJ.** 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*, 197: 25-42.
- Jóhannsdóttir, J.Þ., Smáradóttir, H., Káradóttir, E.G., Þórarinsdóttir, E.E., Pétursdóttir, M. og Björnsdóttir, R.** 2008. Meðhöndlun lúðulirfa með nýrri blöndu bætibaktería. Mátis skýrsla #28-08.
- Kjesbu, O.S., Solemdal, P., Bratland, P., Fonn, M..** 1996. Variation in annual egg production in individual captive Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*.53 (3): 610-620.
- Kjorsvik E, Mangorjensen A, Holmefjord I.** 1990. Egg Quality in Fishes: *Advances in Marine Biology*, v. 26, p. 71-113.
- Marteinsdottir G, Brickman D, Campana S, Danielsdottir A, Harms I, Jonsdottir I, Logemann K, Pampoulie C, Ruzzante D, Saemundsson K, Thorsteinsson V, Taylor L, Valdimarsson H.** 2006. Role of sub-stock structure in the maintenance of Icelandic cod metapopulations. *Journal of Fish Biology*. 69: 226-226.
- Mazorra C, Bruce M, Bell JG, Davie A, Alorend E, Jordan N, Rees J, Papanikos N, Porter M, Bromage N.** 2003. Dietary lipid enhancement of broodstock reproductive performance and egg and larval quality in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture*. 227(1-4): 21-33.
- McEvoy, L.A.** 1984. Ovulatory rhythms and over-ripening of eggs in cultivated Turbot, SCOPHTHALMUS-MAXIMUS L. *Journal of Fish Biology*. 24 (4): 437-448.
- Norberg, B., Valkner, V., Huse, J., Karlsen, I., Grung, G.L.** 1991. Ovulatory rhythms and egg viability in the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture*. 97:365-371
- Rosenlund G, Halldorsson O.** 2007. Cod juvenile production: Research and commercial developments. *Aquaculture* 268 (1-4): 188-194.

**Rurangwa, E., Kime, D.E., Ollevier, F. and Nash, J.P.** 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* (234):1-28.

**Shields RJ, Brown NP, Bromage NR.** 1997. Blastomere morphology as a predictive measure of fish egg viability: *Aquaculture*, v. 155, p. 1-12.

**Skålsvik, T.H.** 2008. Quantitative characteristics of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) egg production throughout the reproductive season and their relationship to embryo and larval quality. Høgskolen i Bøddø. MS thesis.

**Þorkelsson G, Jonsdóttir R, Olafsdóttir, Hilmarsson OTh.** 2009. Beit á hvönn og bragð af lambakjöti. Matis skýrsla 20-09, 36 bls.

**Rafrænar heimildir:**

[http://www.matis.is/media/utgafa//Matra\\_thurrverk\\_lambakjot.pdf](http://www.matis.is/media/utgafa//Matra_thurrverk_lambakjot.pdf)

<http://www.ias.is/landbunadur/wgsamvef.nsf/0/e9b29701af57ad3000256cdf005253db?OpenDocument>  
t sótt 22. mars 2010.