

Vinnsla og vöruþróun
Processing and Product
Development

Líftækni
Biotechnology



Matvælaöryggi
Food Safety



Meðhöndlun hroгна og lirfa með nýrri blöndu bætibaktería

Jónína Þ. Jóhannsdóttir
Heiðdís Smáradóttir
Eyrún Gígja Káradóttir
Eydís Elva Þórarinsdóttir
María Pétursdóttir
Rannveig Björnsdóttir

Vinnsla og vöruþróun

Skýrsla Matís 28-08
September 2008

ISSN 1670-7192

Titill / Title	Meðhöndlun hrogna og lirfa með nýrri blöndu bætibaktería. Treatment of halibut (<i>Hippoglossus hippoglossus</i> L.) eggs and larvae using putative probionts isolated from the production system.		
Höfundar / Authors	Jónína Þ. Jóhannsdóttir, Heiðdís Smáradóttir, Eyrún Gígja Káradóttir, Eydís Elva Þórarinsdóttir, María Pétursdóttir, Rannveig Björnsdóttir		
Skýrsla / Report no.	28-08	Útgáfudagur / Date:	September 2008
Verknr. / project no.	1303-1706		
Styrktaraðilar / funding:	Tækniþróunarsjóður Rannís,		
Ágrip á íslensku:	<p>Markmið verkefnisins í heild sinni er að bæta lifun og gæði lúðulirfa í startföðrun og nota til þess umhverfisvænar aðferðir þar sem hrogn og lirfur eru meðhöndluð með nýrri blöndu bætibaktería sem einangraðar hafa verið úr eldisumhverfi lúðulirfa.</p> <p>Mikil afföll verða á fyrstu stigum lúðueldis og því mikilvægt að skapa ákjósanlegt umhverfi á þessum fyrstu og viðkvæmstu stigum eldisins. Notkun bætibaktería er ein leið til þess en bætibakteriur geta með ýmsum hætti haft jákvæð áhrif á hýsil sinn, s.s. komið í veg fyrir að óæskilegar bakteriur nái föfestu í meltingarvegi hans, örvað ónæmissvörun og bætt jafnvægi í meltingarvegi hans.</p> <p>Frankvæmdar voru þrjár aðskildar tilraunir í eldisstöð Fiskeyjar hf. þar sem meðhöndlað var með blöndu bætibaktería á mismunandi stigum eldisins. Áhrif meðhöndlunar voru metin m.t.t. afkomu og gæða hrogna og lirfa en samsetning bakteríuflóru eldisins var einnig skoðuð. Bætibakteríum var bætt út í eldisumhverfi hrogna en lirfur voru meðhöndlaðar í gegnum fóðurdyrin. Helstu niðurstöður benda til þess að meðhöndlun með nýrri blöndu bætibaktería geti haft áhrif á samsetningu bakteríuflóru hrogna, lirfa og fóðurdyra þeirra en að meðhöndla þurfi tíðar en gert var í rannsókninni ef viðhalda á áhrifum til lengri tíma. Endurtekin meðhöndlun á hrognastigi virtist lækka tíðni gallaðra kviðpokalirfa auk þess sem meðhöndlun frá upphafi frumföðrunar virtist hafa jákvæð áhrif á afkomu lirfa í lok frumföðrunar.</p> <p>Verkefnið var styrt af Tækniþróunarsjóði Rannís (2006-2008).</p>		
Lykilorð á íslensku:	Lúðueldi – bætibakteríur – hrogn – lirfur – bakteríuflóra		
Summary in English:	<p>Poor survival of larvae during the first feeding phases calls for measures to create optimal environmental conditions during the first and most sensitive phases of the larval production. The overall aim of the project was to promote increased survival and quality of halibut larvae, using putative probionts isolated from halibut production units.</p> <p>Probiotic bacteria can affect their host in various ways, e.g. by preventing the attachment of unfavourable bacteria, stimulating the immune system and promoting increased stability in the gastrointestinal tract.</p> <p>In this project three separate experiments were carried out at a commercial halibut farm, Fiskey Ltd. in Iceland. Different treatment schedules were used for treatment of eggs from fertilization and larvae throughout first feeding. A mixture of equal concentration of three selected strains was added to the tank water environment of eggs or through grazing of the live feed. The effects of treatment were evaluated with respect to the overall success of eggs and larvae as well as with respect to changes in the bacterial community structure. The results indicate that treatment may affect the bacterial community of eggs, larvae and live feed but more frequent treatments seem to be needed than examined in the present study. Repeated treatment of eggs resulted in reduced incidence of jaw deformation (gaping) amongst yolk sac larvae and treatment from the onset of exogenous feeding resulted in improved survival of larvae compared to sibling tank units.</p> <p>The project was supported by the Technology Development Fund of Rannís, the Icelandic Centre for Research (2006-2008).</p>		
English keywords:	Halibut aquaculture – eggs – larvae – probiotic bacteria – bacterial community		

Skýrsla Matís 28-08

September 2008

Meðhöndlun hrogna og lirfa með nýrri blöndu bætibaktería

Jónína Þ. Jóhannsdóttir – Matís ohf.

Heiðís Smáradóttir – Fiskey hf.

Eyrún Gígja Káradóttir – MSc nemi

Eydís Elva Þórarinsdóttir – Matís

María Pétursdóttir – Matís ohf.

Rannveig Björnsdóttir – Matís ohf. / Háskólinn á Akureyri



**Háskólinn
á Akureyri**
University
of Akureyri

EFNISYFIRLIT

1. INNGANGUR	1
2. FRAMKVÆMD	4
2.1. Blanda bætibaktería	4
2.2. Uppsetning tilrauna og sýnataka	5
2.2.1. Fortilraun: Meðhöndlun hrogna.....	7
2.2.2. Tilraun I: Meðhöndlun hrogna og lirfa.....	8
2.2.3. Tilraun II: Endurtekin meðhöndlun hrogna og lirfa	10
2.3. Sýnataka og úrvinnsla sýna	12
2.3.1. Ræktanleg bakteríuflóra	13
2.3.1. Heildarflóra baktería.....	13
2.4. Tölfræðiútreikningar	14
3. NIÐURSTÖÐUR	15
3.1 Afkoma og gæði	15
3.2. Ræktanleg bakteríuflóra	20
3.3. Heildarflóra baktería	24
4. UMRÆÐA OG ÁLYKTANIR	30
5. ÞAKKARORÐ	36
6. HEIMILDIR	36

1. INNGANGUR

Markmið þessa verkefnis er að stuðla að bættri afkomu og gæðum lúðulirfa á fyrstu stigum eldisins. Þetta var gert með því að meðhöndla lúðuhrogn og lirfur með valinni blöndu bætibaktería sem einangraðar höfðu verið úr eldiseiningum lúðulirfa sem komu vel út m.t.t. afkomu og gæða lirfa. Verkefnið er styrkt af Tækniþróunarsjóði Rannís og er liður í uppbyggingu rannsókna á sviði fiskeldis í samstarfi við fyrirtæki sem er í fremstu röð og þekkt er um heim allan fyrir góðan árangur í framleiðslu lúðuseiða. Verkefnið er unnið í samvinnu MATÍS ohf., Fiskey hf. og HA og er hluti af stærra verkefni, “Bætibakteríur í lúðueldi” þar sem meginmarkmiðið er að þróa nýjar umhverfisvænar aðferðir til að bæta lifun og gæði lúðulirfa í frumfóðrun.

Lúða (*Hippoglossus hippoglossus* L.) er í háum gæðaflokki og áhugi fyrir lúðueldi hefur farið vaxandi á liðnum árum (Olsen *et al.*, 1999; Jensen *et al.*, 2004; Kvale *et al.*, 2007). Það tekur um 3 ár að ala lúðu frá klaki í markaðsstærð (3-5 kg stærð). Margskonar vandamál tengd næringu og þroska eru vel þekkt og er meðaltals afkoma einungis á bilinu 0-10% (Olsen *et al.*, 1999).

Fyrstu stig eldisins eru megin flöskuháls í eldi lúðuseiða sem og annarra tegunda sjávarfiska. Örveruálag í eldisumhverfinu er sérstakt vandamál og er bakteríuálag og vöxtur tækifærisbaktería talið einn af megin orsakavöldum mikilla affalla lirfa á fyrstu stigum fiskeldis. Ástæðu þessa má m.a. rekja til náinnar snertingar baktería í umhverfi fisksins við yfirborð hans (Macey *et al.*, 2005; Kvale *et al.*, 2007) en einnig til þess að sérhæfð ónæmissvörun fiska nær ekki fullum þroska fyrr en löngu eftir klak og verða lirfur því að reiða sig á ósérhæfða þætti ónæmissvörunnar fram að þeim tíma (Olafsen 2001; Verner-Jeffreys *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2002; Makridis *et al.*, 2000a; Makridis *et al.*, 2000b; Björnsdóttir *et al.*, 2003). Mikill fjöldi baktería fylgir fóðurdýrum (*Artemia*) sem lúðulirfurnar nærast á fyrstu vikurnar eftir að þær byrja að taka til sín fóður og getur þetta lífræna álag orðið lirfunum ofviða ef ekkert er að gert (Lillehaug *et al.*, 2003). Nokkur efnanotkun hefur því reynst nauðsynleg í því markmiði að halda bakteríufjölda í skefjum. Mikilvægi þess að lágmarka efnanotkun í fiskeldi er ótvírætt en efna- og lyfjanotkun leiðir til hættu á ónæmi stofna og er því aldrei talin æskileg (Olafsen 2001; Keller *et al.*, 2004; Bergh *et al.*, 2002).

Mikilvægt er því að skapa ákjósanlegt umhverfi fyrir lirfur með jákvæðri bakteríuflóru svipað og hægt er að hafa áhrif á aðra þætti eldisins s.s. fitusýrusamsetningu fôðurdýra, skyggingu eldisvökva án notkunar þörunga o.s.frv. Möguleiki á að stýra örveruflóru í umhverfi og meltingarvegi tegunda í eldi og losna þannig alfarið við efnameðhöndlun, er tvímælalaust með ákjósanlegri valkostum og er að vonum mikill áhugi fyrir þeirri lausn við eldi sjávartegunda fiska (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 “lífandi bakteríur sem hafa jákvæð áhrif á einstaklinginn með því m.a. að bæta örverufræðilegt jafnvægi í meltingarvegi hans” (Olafsen 2001; Skjeremo og Vadstein 1999; Halami *et al.*, 1999). Jákvæð áhrif bætibaktería geta verið af ýmsum toga:

- hamlandi áhrif á vöxt sýkingarvaldandi örvera
- efla ónæmissvörun hýsils gegn sýkingarvaldandi örverum
- stuðla að auknu jafnvægi í meltingarvegi og efla með því viðnám hýsils gegn sjúkdómum.

Bætibakteríur sem ná fótfestu í hýsli eru jafnframt í samkeppni við sjúkdómsvaldandi bakteríur um næringu og viðloðunarstaði á hýslinum (Gatesoupe 1999).

Ónæmiskerfi lúðulirfa nær ekki fullum þroska fyrr en seint í frumfôðrun (Magnadottir *et al.*, 2005; Lange *et al.*, 2006) og er því meðhöndlun með bætibakteríum talinn vænlegur kostur til varnar sjúkdómum á fyrstu stigum eldisins (Gatesoupe 1999; Ouwehand *et al.*, 1999). Við samsetningu á blöndum af bætibakteríum fyrir fisk, hefur gjarnan verið stuðst við þá þekkingu sem fengist hefur við rannsóknir á bætibakteríum fyrir menn og spendýr. Þannig var megin uppistaða fyrstu blanda af bætibakteríum sem komu á markaðinn fyrir fisk gjarnan mjólkursýrubakteríur en í framhaldi af því einnig tegundir sem reyndust t.d. hamla vexti ríkjandi baktería í eldinu svo og tegundir sem eru náttúrulegar í umhverfi sjávar s.s. *Vibrio*, *Bacillus*, *Pseudomonas* o.fl. (Makridis *et al.*, 2000a; Paniagua *et al.*, 2001; Wong *et al.*, 2004). Bætibakteríur fyrir fiskeldi hafa ýmist verið einangraðar úr lífandi fôðurdýrum lirfa, eldisvökva eða meltingarvegi ýmissa fisktegunda (Robertson *et al.*, 2000; Hjelm *et al.*, 2004b; Hjelm *et al.*, 2004a; Makridis *et al.*, 2005; Fjellheim *et al.*, 2007) og hefur

meðhöndlun í mörgum tilfellum stuðlað að auknum vexti og gæðum fisklirfa með því t.d. að hindra að sjúkdómsvaldandi bakteríur nái fótfestu 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 fôðurdýr hafa verið auðguð með bætibakteríum og þannig hefur þeim verið komið í lirlfur (Makridis *et al.*, 2000b; Abutbul *et al.*, 2004; Lategan *et al.*, 2004; Makridis *et al.*, 2005; Planas *et al.*, 2006).

Niðurstöður rannsókna hafa sýnt að bakteríur sem ná fótfestu í meltingarvegi hafa meiri möguleika á að lifa af og hafa áhrif á umhverfi sitt (Gatesoupe 1999; Isolauri 2004; Morelli 2007). Bætibakteríur fyrir fisk hafa fyrst og fremst verið framleiddar með notkun við eldi hlýsjávartegunda í huga en nokkrar blöndur sem fást á almennum markaði hafa verið reyndar á fyrstu stigum lúðueldis hjá Fiskey hf. Þessar rannsóknir sýndu m.a. að uppgefnar tegundir ræktuðust í engu tilfella úr eldisumhverfi eða meltingarvegi lirlfanna og því líklegt að þessar tegundir hafi einfaldlega ekki lifað af eða náð fótfestu í eldinu við það umhverfishitastig sem þar er notað (4-11°C) (Lillehaug 2003). Þó ber einnig að athuga að margar tegundir baktería úr köldu og næringarsnauðu umhverfi, reynast oft á tíðum óræktanlegar á næringarætum við kjörhitastig í rannsóknastofunni (“viable but non-culturable”) (Bergh *et al.*, 2002; Giuliano *et al.*, 1999).

Endurtekin meðhöndlun með bætibakteríum á fyrstu stigum eldisins gæti reynst nauðsynleg þar sem hugsanlega má ná fram hamlandi áhrifum á vöxt tækifærisbaktería án þess að bætibakteríurnar nái fótfestu í meltingarvegi lirfa (Planas *et al.*, 2006). Því er nauðsynlegt að skilgreina bakteríuflóru í meltingarvegi hýsilsins og kortleggja tengsl hennar við vöxt, þroska og heilbrigði hýsils með það í huga að nýta tegundir í normalflóru hýsilsins við bætibakteríumeðhöndlun (Isolauri, 2004; Douglas og Sanders, 2008). Við val á mögulegum bætibakteríum er mikilvægt að horfa til eiginleika bakteríustofna til að ná fótfestu í því umhverfi þar sem þeir verða notaðir en jafnframt er mikilvægt að kanna vaxtarörvandi og ónæmisörvandi áhrif þeirra svo og önnur jákvæð áhrif á hýsilinn (Gatesoupe 1999; Gomez-Gil *et al.*, 2000; Marteau *et al.*, 2002).

Þessi skýrsla fjallar um framkvæmd og niðurstöður þriggja aðskilda tilrauna þar sem rannsökuð voru áhrif blöndu þriggja tegunda hugsanlegra bætibaktería á fyrstu stigum lúðuseiðaeldis hjá Fiskey hf. Blandan sem notuð var í þessum tilraunum var sett saman eftir

að framkvæmd hafði verið víðtæk leit að hugsanlegum bætibakteríum í meltingarvegi lúðulirfa í eldi hjá Fiskey hf. Safnað var sýnum úr meltingarvegi lúðulirfa í öllum framleiðslueiningum eins hrygningarhóps hjá Fiskey hf. og stóðu sýnatökur yfir í um fjóra mánuði. Gerð er frekari grein fyrir framkvæmd og niðurstöðum þeirrar leitar í Mátis skýrslu # 27-08. Nemandi í líftækni á auðlindasviði HA vann einnig sumarverkefni 2008 í tengslum við þennan hluta verkefnisins en þar voru rannsakaðir frekar vaxtareiginleikar bætibakteríanna þriggja við mismunandi umhverfisaðstæður og við samræktun með ríkjandi bakteríum í meltingarvegi lúðulirfa á öðru tímabili en rannsakað var í verkefninu. Verkefni nemandans var styrkt af Nýsköpunarsjóði námsmanna og Rannsóknasjóði Háskólans á Akureyri (Heimisdóttir 2008)

Rannsóknverkefnið er styrkt af Tækniþróunarsjóði Rannís og er að hluta til unnið af nemanda í rannsóknatengdu meistaranámi við Viðskipta- og raunvísindadeild Háskólans á Akureyri (Eyrún Gígja Káradóttir, áætluð námslok í desember 2008).

2. FRAMKVÆMD

Í þessari skýrslu er gerð grein fyrir framkvæmd og niðurstöðum meðhöndlunar með valinni blöndu bætibaktería í lúðueldi hjá Fiskey hf. Tilraunir voru framkvæmdar á tímabilinu apríl 2007 til maí 2008.

2.1. Blanda bætibaktería

Víðtæk leit að bætibakteríum var framkvæmd í seiðaeldi Fiskey hf. og hafa verið einangraðir þrír stofnar sem álitlegt þykir að prófa á fyrstu stigum eldisins. Margvíslegar aðferðir voru notaðar til að velja þessa stofna og er í Mátis skýrslu # 27-08 og skýrslu nemanda á auðlindasviði HA sumarið 2008 (Heimisdóttir 2008) gerð grein fyrir framkvæmd leitar að hugsanlegum bætibakteríum úr eldiseiningum hjá Fiskey hf. og skilgreiningu á þeim stofnum sem fyrir valinu urðu. Eiginleikar stofnanna voru rannsakaðir, m.a. vöxtur þeirra við

mismunandi umhverfisaðstæður (selta, pH) og vaxtarhamlandi áhrif þeirra á þekktu sýkingarvalda í fiski svo og á vöxt ríkjandi stofna úr eldiseiningum þar sem vöxtur eða lifun lirfa var undir meðallagi. Vaxtarkúrfur stofnanna voru jafnframt rannsakaðar svo og vöxtur þeirra í samrækt og bentu niðurstöður til þess að bestur vöxtur fengist þegar allir þrír stofnarnir voru ræktaðir saman.

Stofnarnir þrír sem fyrir valinu urðu voru ræktaðir upp á næringarætum á rannsóknastofunni og ræktirnar síðan frostþurrkaðar. Fyrir hvern framleiðsluskammt var ræktað upp úr frostþurrkaða duftinu og fjöldi baktería í hverju grammi duftsins ákvarðaður hverju sinni. Þetta var jafnframt gert til að tryggja að mengun hefði ekki komist í ræktirnar í framleiðsluferlinu. Stofnarnir voru greindir til tegunda með hliðsjón af lífefnafræðilegum eiginleikum, svo og með hlutaraðgreiningu á 16S rDNA (framkvæmt af Matís-Prokaria).

Blanda bætibakteríanna var sett saman úr jöfnu hlutfalli stofnanna þriggja og meðhöndlað með mismunandi styrk blöndunnar (lokastyrkur við meðhöndlun $10^3 - 10^5$ bakteríur/ml). Við meðhöndlun í eldinu var frostþurrkaða duftið leyst upp í ca. hálfum líter af eldisvökva úr hverju keru og flaskan látin standa í um 15 mín áður en blandað var varlega í flöskunni. Hrogn voru meðhöndluð með því að hella blöndunni beint út í eldisvökva kerjanna en við meðhöndlun lirfa voru fóðurdýr lirfa meðhöndluð með blöndunni í 30 mín fyrir gjöf.

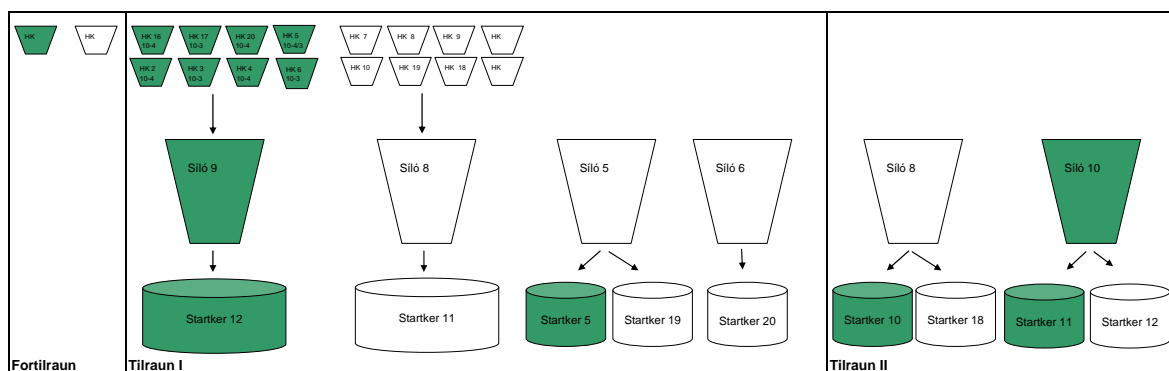
2.2. Uppsetning tilrauna og sýnataka

Í klakfiskastöð Fiskeyjar hf. er hrygningu klakfiskahópa stýrt með ljósi og er því aðgangur að hrognum á þremur tímabilum á ári hverju. Uppsetning tilrauna, meðhöndlun og sýnataka var í höndum starfsmanna Fiskeyjar hf. sem einnig sáu um mat á afkomu og gæðum hrogn og lirfa við lok tilrauna. Við tilraunir í eldinu er byggt á aðferðum sem þróaðar hafa verið af starfsmönnum Fiskeyjar og notaðar hafa verið við framleiðslu seiða til margra ára. Umfang tilrauna í eldinu þarf að miða við framboð á hrognum og lirlum hverju sinni auk þess sem lágmarks áhætta er ávallt tekin varðandi framleiðslu lúðuseiða hjá Fiskey hf.

Hrogn eru höfð í 0.25 m^3 hrognakerjum við $5.0 - 5.3 \text{ }^\circ\text{C}$ í 14 daga og sótthreinsuð með 400

ppm glutaraldehyde áður en safnað er úr 5-8 kerjum í eitt 10 m³ síló. Í sílóunum klekjast hrognin og nærast kviðpokalirfurnar á innihaldi kviðpokans við 5.0 – 5.3 °C næstu u.þ.b. 50 dagana en þá eru þær eru fluttar í 3.5 eða 7.0 m³ frumfóðrunarker. Meltingarkerfi lirfanna er mjög einfalt og vanþroska þegar lirfurnar byrja að nærast á utanaðkomandi fóðri sem fyrstu vikurnar er saltvatnsrækja (*Artemia franciscana*) (Great Salt Lake, Utah, USA). Saltvatnsrækjan er auðguð með fitusýrum og vítamínum og eru lirfur fóðraðar kvölds og morguns næstu u.þ.b. 60 dagana við 11 °C en á þeim tíma myndbreytist lirfan og verður að botnlægu seiði. Við myndbreytingu færast augun yfir á sömu hlið, efri hlið seiðanna dökknar og þau færa sig niður á botn kerjanna. Þegar hér er komið sögu eru seiðin tilbúin að taka til sín og melta þurrfóður.

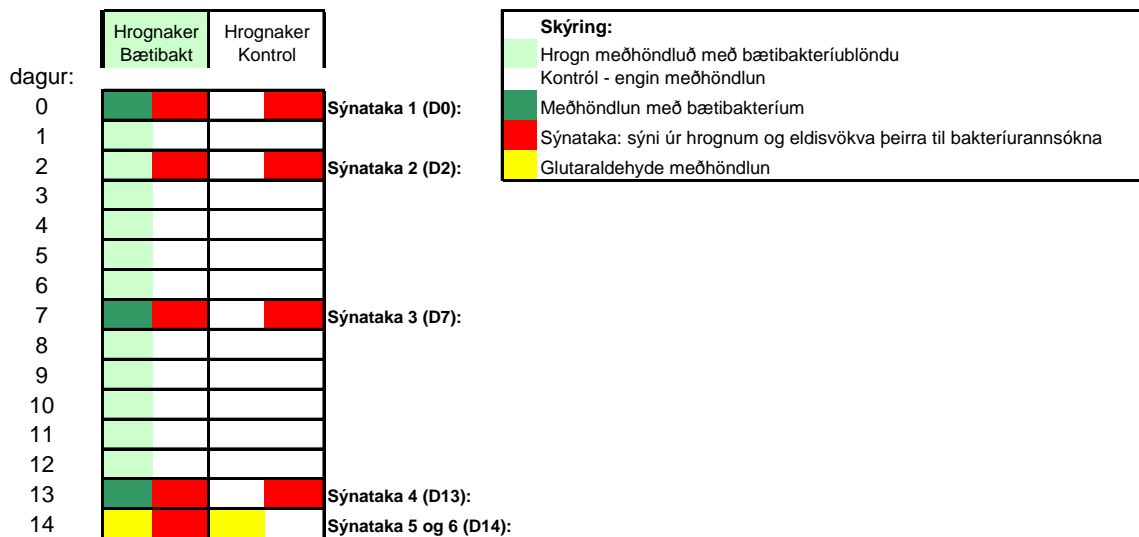
Framkvæmdar voru þrjár aðskildar tilraunir á fyrstu stigum lúðueldis í aðstöðu Fiskey hf. (sjá yfirlit á mynd 1). Í fortíraun voru rannsökuð áhrif bætibakteríublöndu á hrogn í einu hrognakeri með ómeðhöndlað ker sem viðmið og í framhaldi af því voru framkvæmdar tvær tilraunir þar sem hrogn og lirfur voru meðhöndluð með sömu bætibakteríublöndu. Meðhöndlun hófst á mismunandi tímamörkum eldisferilsins og rannsökuð voru áhrif á afkomu og gæði lirfa auk þess sem samsetning bakteríuflóru lirfa var kortlögð.



Mynd 1. Yfirlitsmynd tilrauna sem framkvæmdar voru með bætibakteríum á fyrstu stigum lúðueldis. Tilraunir voru framkvæmdar á tímabilinu apríl 2007 til maí 2008. Meðhöndlaðar einingar eru litaðar grænar og viðmiðunareiningar hvítar.

2.2.1. Fortilraun: Meðhöndlun hrogna

Fortilraun fór fram í lok apríl 2007 en markmið hennar var að kanna hvort hrogn þyldu meðhöndlun með bætibakteríublöndunni í þeim styrk sem notaður var. Hrogn í einu kerri voru ítrekað meðhöndluð með blöndunni og afkoma frjónvgaðra hrogna við lok tímabilsins ákvörðuð. Samsetning bakteríuflóru hrogna var jafnframt rannsökuð með hliðsjón af samsetningu bakteríuflóru hrogna í viðmiðunarkeri þar sem framleiðsla fór fram með hefðbundnum hætti. Hrogn voru meðhöndluð með blöndunni þrisvar sinnum yfir tímabilið (sjá yfirlit á mynd 2). Meðhöndlað var með 10^4 bakteríur/ml og var blandan sett saman úr jöfnu hlutfalli stofnanna þriggja.



Mynd 2. Uppsetning tilraunar og sýnataka. Meðhöndlað var með blöndu bætibaktería þrisvar sinnum á tímabilinu þ.e. skömmu eftir frjónvgun hrogna, 7 dögum eftir frjónvgun og 13 dögum eftir frjónvgun auk þess sem hrogn voru meðhöndluð með glutaraldehyde skömmu fyrir flutning í síló á degi 14. Sýnatökur voru framkvæmdar fyrir meðhöndlun með bætibakteríum 0, 2, 7 og 13 dögum eftir frjónvgun. Jafnframt voru tekin sýni á degi 14, bæði fyrir og eftir glutaraldehyde meðhöndlun hrogna fyrir flutning í ker (ekki náðist að taka sýni á degi 14 úr kontrolkeri).

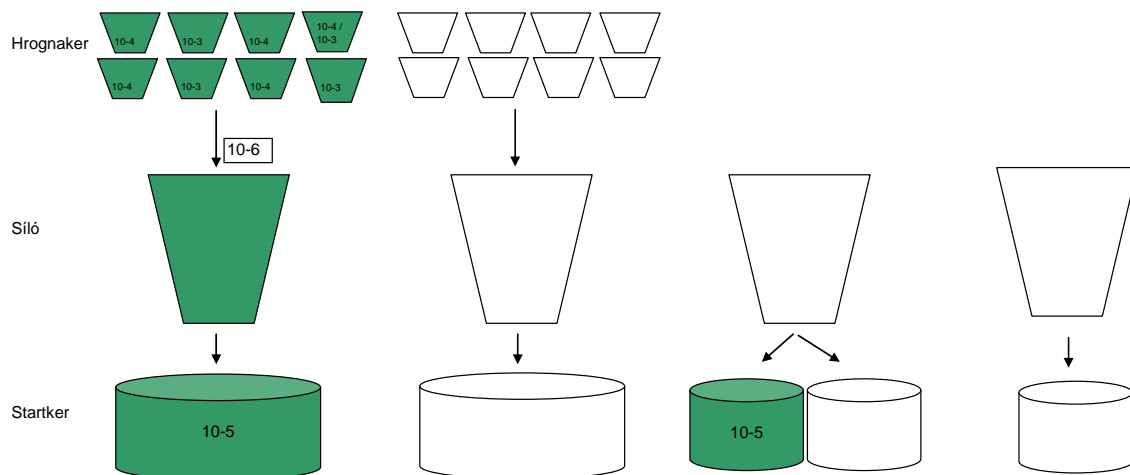
Fyrsta meðhöndlun með blöndu bætibaktería var framkvæmd um leið og hrognin höfðu verið frjónvgað. Vatnsyfirborð í kerinu var þá lækkað og ekkert vatnsrennsli haft í sólarhring á eftir. Einnig var meðhöndlað með bætibakteríum á degi 7 og degi 13 eftir frjónvgun. Alls voru tekin

6 sýni úr hvorri eldiseiningu, þ.e. fyrir fyrstu meðhöndlun á degi 0, á degi 2 þegar vatnsrennsli hafði verið á í sólarhring, á degi 7 áður en meðhöndlað var með bætibakteríum öðru sinni, áður en meðhöndlað var með bætibakteríum í þriðja skipti á degi 13 og loks á degi 14, bæði fyrir og eftir hefðbundna böðun hrogna með glutaraldehyde áður en þau eru flutt í síló.

Ekki reyndist unnt að taka sýni á degi 14 fyrir og eftir glutaraldehyde meðhöndlun í viðmiðunarkeri og því aðeins safnað 4 sýnum af hrognum og 4 sýnum af eldisvökva hrogna úr viðmiðunarkeri. Ekki var unnt að fylgja eftir þessum hrognum þar sem þau voru sameinuð öðrum hrognahópum við flutning í síló.

2.2.2. Tilraun I: Meðhöndlun hrogna og lirfa

Tilraunin var framkvæmd í júlí til september 2007 (normalhópur). Hrogn og lirfur voru meðhöndluð með blöndu bætibaktería á mismunandi stigum eldisins og áhrif meðhöndlunar á afkomu og gæði hrogna og lirfa rannsökuð auk þess sem samsetning bakteríuflóru var könnuð. Tvær mismunandi meðhöndlunarseríur voru framkvæmdar: i) meðhöndlun frá byrjun hrognastigs allt til loka frumfóðrunar og ii) meðhöndlun frá upphafi frumfóðrunar. Ávallt voru tekin sýni til viðmiðunar úr eldiseiningum sem meðhöndlaðar voru með hefðbundnum hætti allt tímabilið. Yfirlit yfir framkvæmd tilraunar má sjá á mynd 3.



Mynd 3. Uppsetning tilraunar I. Eldiseiningar þar sem meðhöndlað var með bætibakteríum eru litadar grænar og viðmiðunareiningar hvítar. Meðhöndlað var með blöndu bætibaktería í 8 hrognakerjum með mismunandi styrkleika (10^4 eða 10^3 bakteríur/ml) og jafnmörg ker höfð til viðmiðunar. Við flutning yfir í síló var meðhöndlað með bætibakteríum í styrkleikanum 10^6 bakteríur/ml. Lirfur í startfóðrun voru meðhöndlaðar með bætibakteríum í styrkleikanum 10^5 bakteríur/ml og var meðhöndlað tvisvar sinnum á dag tvo daga í röð, á dögum 0/1 og endurtekið á dögum 17/18

Öll hrognaker sem komu inn í stöðina á einni viku og nægðu til að setja í eitt síló, samtals 8 ker, voru meðhöndluð með bætibakteríublöndunni. Þessum hrognakerjum var fylgt eftir með meðhöndlun í frumfóðrun (1 ker) auk þess sem meðhöndlað var í einu startkeri frá byrjun frumfóðrunar.

Meðhöndlun og sýntaka á hrognastigi var framkvæmd á sömu tímapunktum og gert var í fortíraun að því undanskildu að styrkur meðhöndlunar var mismunandi eða 10^4 bakteríur/ml í 4 kerjum og 10^3 bakteríur/ml í 3 kerjum auk þess sem í einu kerri var byrjað að meðhöndla með 10^4 bakteríur/ml en styrkur minnkaður niður í 10^3 bakteríur/ml í annarri og þriðju meðhöndlun. Við það fengust svör við því hvort minni styrkur meðhöndlunar nægði til þess að bakteríur næðu fótfestu á hrognum en minni styrkur bætibaktería veldur því að minni útfellingar (lífrænn úrgangur) myndast í hliðum kerjanna. Eftir hefðbundna glutaraldehyde meðhöndlun hroгна við lok hrognastigs voru hrogn úr hverju kerri síuð frá eldisvökvanum og vegin til að mæla magn hroгна sem fer í síló. Hrognin voru meðhöndluð á þessu stigi, með bætibakteríublöndu í styrkleikanum 10^6 bakteríur/ml í 30 mín og síðan færð yfir í síló þar sem ekki var meðhöndlað með bætibakteríum. Sýni var tekið 10 dögum eftir flutning yfir í síló svo og við lok kviðpokastigs til þess að kanna hvort bætibakteríurnar væru enn til staðar.

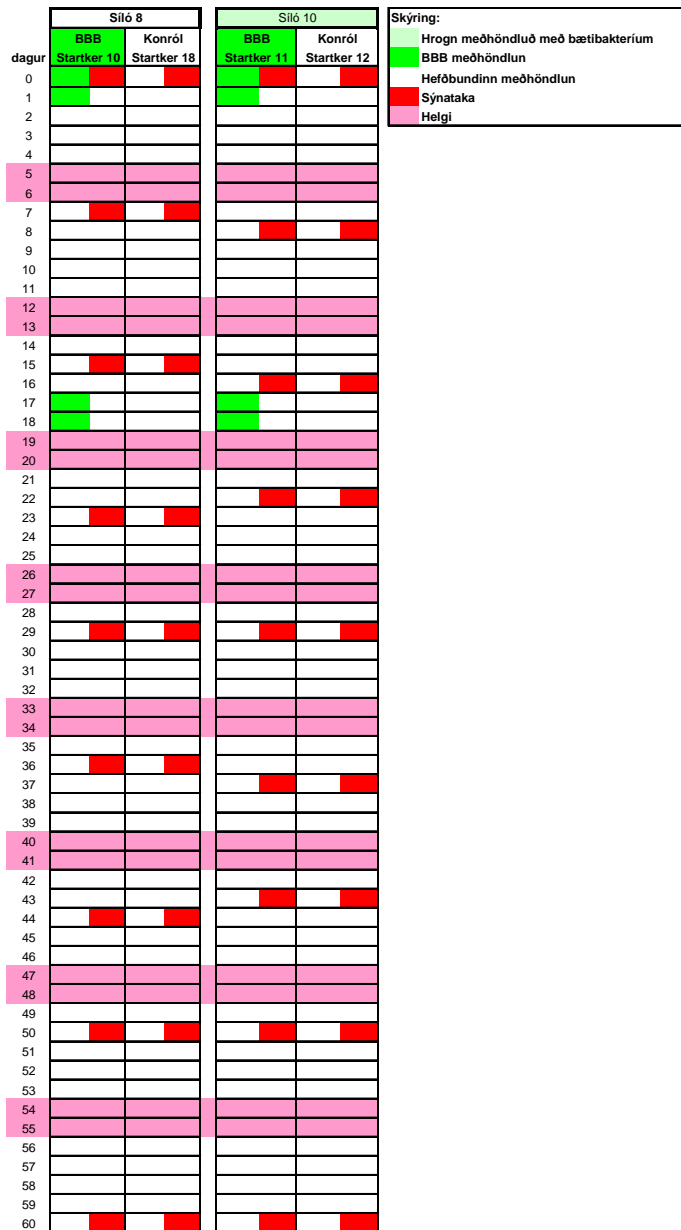
Á fyrstu stigum fóðrunar var meðhöndlað í tveimur kerjum og í tveimur meðhöndlunarhrinum, við upphaf frumfóðrunar (á degi 0 og 1) og rétt fyrir þann tíma þegar mestu afföll verða venjulega á lirfunum (á degi 17 og 18). Meðhöndlun fór þannig fram að fóðurdýr lirfa voru böðuð með bætibakteríublöndunni í styrkleikanum 10^5 bakteríur/ml í 30 mín fyrir gjöf. Meðhöndluð fóðurdýr voru gefin í ker tvisvar sinnum á dag (kvölds og morguns). Lirfusýnum var safnað vikulega yfir startfóðrunartímabilið, þ.e. þar til lirfur höfðu verið vandar á þurrfóður (ca. 60 dögum eftir upphaf frumfóðrunar).

Samtals var safnað 42 hrognasýnum, 6 sýnum af kviðpokalirfum (4 síló), 30 sýnum af lirfum í startfóðrun (4 ker) og 18 sýnum af fóðurdýrum sem ýmist voru meðhöndluð á hefðbundinn hátt eða með bætibakteríum að auki.

2.2.3. Tilraun II: Endurtekin meðhöndlun hrogna og lirfa

Meðhöndlun hrogna og lirfa var endurtekin í tilraun sem framkvæmd var í mars til maí 2008 (flýttur hópur). Hrogn fengu hefðbundna meðhöndlun á hrognatímabilinu en meðhöndlað var með bætibakteríum á tvo mismunandi vegu: i) hrogn meðhöndluð við enda hrognatímabils, þ.e. við flutning yfir í síló og síðan frá upphafi frumfóðrunar eða ii) einungis meðhöndlað frá upphafi frumfóðrunar. Til viðmiðunar voru tekin sýni úr síló og frumfóðrunarkerjum þar sem meðhöndlað var með hefðbundnum hætti. Systkinaker með sama upplagi lirfa voru notuð þar sem unnt var að koma því við. Þá var meðhöndlað með bætibakteríunum í öðru kerinu en hitt haft til viðmiðunar.

Meðhöndlun við flutning hrogna yfir í síló og í frumfóðrun var eins og áður var lýst í fortíraun og tilraun I. Meðhöndlað var með bætibakteríum í styrkleikanum 10^4 bakteríur/ml auk þess sem fôðurdýr voru böðuð með 10^5 bakteríur/ml í 30 mín fyrir gjöf. Meðhöndluð fôðurdýr voru gefin í ker kvölds og morguns tvo daga í röð (dagar 0 og 1, 17 og 18). Á mynd 4 má sjá yfirlit yfir uppsetningu tilrauna, meðhöndlun og sýnatökur.



Mynd 4. Uppsetning tilraunar II og tímasetning sýnatöku. Meðhöndlað var með blöndu bætibaktería við flutning hrognna yfir í siló. Lirfur í startfóðrun voru meðhöndlaðar tvisvar sinnum á dag tvo daga í röð (dagar 0 og 1, 17 og 18).

Samtals var safnað 2 sýnum af kviðpokalirfum (2 siló), 32 sýnum af lirfum í startfóðrun (4 ker) og 13 sýnum af fôðurdýrum sem ýmist voru meðhöndluð á hefðbundinn hátt eða með bætibakteríum að auki.

2.3. Sýnataka og úrvinnsla sýna

Sýnum var safnað af meðhöndluðum hrognum, kviðpokalirfum, lirfum í frumfóðrun og eldisvökva þeirra auk þess sem sýni voru tekin reglulega af meðhöndluðum og ómeðhöndluðum fóðurdýrum sem gefin voru í startker á tímabilinu. Hverju sinni voru tekin sýni af ómeðhöndluðum hrognum og lirfum til samanburðar. Öll sýni voru rannsökuð með tilliti til heildarfjölda ræktanlegra baktería (TVC) á MA (Marine Agar 2216; Difco) og ræktanlegra *Vibrio* baktería á TCBS (Thiosulphate Citrate Bile Sucrose agar; Difco) auk þess sem rannsökuð var samasetning heildarflóru baktería með PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) aðferð og 16S rDNA raðgreiningu. Að auki voru 12 ræktanlegir stofnar í hverju sýni í tilraun I greindir til tegunda út frá lífefnafræðilegum eiginleikum þar sem notuð voru 10 mismunandi próf.

Við sýnatökur úr eldiseiningum er nauðsynlegt að gæta fyllsta hreinlætis og að allur sýnatökubúnaður sé dauðhreinsaður. Sýni voru tekin í ílát sem fyrst voru fyllt af eldisvökva úr viðkomandi kerri og sótthreinsaður háfur síðan notaður til að veiða upp hrogn eða lirfur. Við upphaf frumfóðrunar var ~120 lirfum safnað hverju sinni og ~10 lirfum þegar sýni voru tekin eftir um 65 daga í fóðrun. Á öðrum sýnatökudögum var safnað á bilinu 10-120 lirfum, færri eftir því sem lirfurnar höfðu verið lengur í frumfóðrun. Sýnum af fóðurdýrum (*Artemia*) var safnað með sigti og dýrin skoluð undir rennandi vatni í 2 mín áður en þeim var komið fyrir í sterílu íláti. Sýnum var því næst komið fyrir á ís og gelmotta/plastmotta höfð á milli, til þess að koma í veg fyrir of mikla og snögga kælingu sýna. Sýni voru flutt sem fyrst á rannsóknastofu Matís/HA á Akureyri þar sem frekari úrvinnsla var framkvæmd innan 3 klst. frá sýnatöku.

Hrogn voru sigtuð frá eldisvökvanum, vigtuð og þynnt tífalt í peptone sjóvatni (0.1% peptone leyst í 70% sjóvatni). Lirfur eru fyrst svæfðar með yfirskammti af hypnodil (51 µg/mL lokastyrkur efnis) og yfirborðsótthreinsaðar (0.1% Benzalkonium klóríð) áður en þær eru taldar og vegnar yfir í sterílt ílát og þynntar tífalt í peptone sjóvatni. Lausnirnar voru því næst gerðar einsleitar í Ultra Thurax T-25 tættara (IKA Laborteknik) við blöndun í 4*10 sek með 10 sek hvíld á milli (8000 rpm) og þessi lausn síðan notuð til frekari rannsókna. Eldisvökvi hrognna var rannsakaður án frekari undirbúnings.

2.3.1. Ræktanleg bakteríuflóra

Af tífoldri þynningu sýna voru útbúnar frekari þynningar í peptone-sjóvatni og sáð úr þeim á yfirboð MA og TCBS agarskála. Jafnframt voru útbúnar þynningar af eldisvökvanum og þeim sáð á MA og TCBS agarskálur. Allar skálur voru ræktaðar við 15°C í um 5-7 daga og heildarfjöldi baktería og fjöldi hugsanlegra *Vibrio* baktería í hverju grammi/ml sýnis því næst ákvarðaður. Af hverju sýni voru skálur með ~100 koloníum valdar til greiningar á samsetningu ræktanlegra baktería með PCR-DGGE aðferð (Muyzer *et al.*, 1993).

Við greiningu og flokkun ræktanlegrar bakteríuflóru voru úr hverju sýni valdar MA skálur með 100-250 kóloníum/skál, tólf stofnar valdir af handahófi, þeim umsáð yfir á nýjar MA skálur og ræktað við 15°C þar til greinilegur vöxtur var sýnilegur á skálum (2-7 dagar). Stofnar voru því næst flokkaðir til ætta, ættkvísla og/eða tegunda m.t.t. svörunar í KOH prófi, Gram litun, Cytochrome oxidasa, Katalasa, MOF prófi (oxun/gerjun), næmi fyrir O/129 Vibriostatic compound, vöxtur með og án NaCl svo og vöxtur með og án Novobiosine. Ræktanleg flóra var síðan flokkuð í hópa m.t.t. svörunar í mismunandi prófum.

2.3.1. Heildarflóra baktería

Mynstur heildarflóru baktería í sýnum var greint með PCR-DGGE aðferð sem byggir á aðskilnaði tegunda vegna mismunandi bræðslumarks (Tm) erfðaefnis þeirra en það ákvarðast af fjölda CG tengja sem eru til staðar (Muyzer *et al.*, 1993). DGGE er talin vera mjög næm aðferð til að skilja á milli DNA búta af svipaðri stærð en sem eru mismunandi að uppbyggingu (Muyzer *et al.*, 1993).

Sýnin (1/10 þynning) eru fryst við -80°C þar til greining er framkvæmd. DNA er einangrað með einangrunarsetti (Gentra Tissue kit) og hreinleiki sýnisins síðan metinn með því að rafdraga afurð á 0.7% agarose geli í u.þ.b. 30 mín og lita með „ethidium bromide“ (EtBr) til að gera böndin sýnileg. Eftir einangrun er hluti erfðaefnis magnaður upp með PCR (polymerase chain reaction) þar sem notaðir eru þekktir alhliða vísar (universal primers) sem hannaðir eru út frá geni sem rannsóknir sýna að varðveist hefur í erfðamengi baktería (16S rDNA) (Aakra *et al.*, 1999, Bernard *et al.*, 2000). Í þessari rannsókn voru notaðir vísar sem eru sérhannaðir fyrir DGGE aðferðina. CG-hali er hengdur á annan þeirra og gerir það að verkum að afurðin helst að hluta til á tvíþátta formi í rafdrætti á DGGE geli. Notaðir voru

vísarnir 241FGC (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG CCTACGGGAGGCAGCAG -3') og 534R (5'- ATTACCGCGGCTGCTGG -3') (Griffiths *et al.*, 2001). Með notkun þessara vísa magnast upp 254 bp breytilegt svæði á 16S geninu (V4 svæði) sem er nægilegt til að skilja á milli ólíkra tegunda. PCR afurðin er síðan rafdrengin á 40-70% urea – formamide blönduðu DGGE geli með 0% stacking geli við 62 °C í 14 klst. Á hverju geli er einnig keyrður staðall sem inniheldur hreinræktir bakteríutegunda með mismunandi GC innihald og stöðvast því á mismunandi stöðum í gelinu og auðveldar það samanburð á milli gela. Bakteríustofnar sem notaðir voru í bætibakteríublöndunni voru hafðir í staðli til að hægt væri að fylgja þeim eftir í sýnum teknum úr meðhöndluðum einingum. Staðallinn var settur saman af: A: *Pseudoalteromonas elyakovii* (99% samsvörun við GenBank númer AB000389), B: *Vibrio splendidus* (100% samsvörun við GenBank númer AJ874364), C: *Marinovum algicola* (DSM 10251), D: *Shewanella baltica* (99% samsvörun við GenBank númer CP000891) og E: *Streptomyces* sp. (99% samsvörun við GenBank númer EU 257269). Að loknum rafdrætti er gelið litað í 15 mín. með Sybr-Gold (Invitrogen) og myndað á ljósaborði með UV lampu með “InGenius LHR gel imaging” kerfi (Syngene). Áhugaverð bönd í geli voru skorin út með dauðhreinsuðum pípettuoddi og komið fyrir í eppendorfglasi með 50 µl af MilliQ-vatni. Til að leysa upp erfðaefnisbútinn í gelinu voru sýni sett í skilvindu í 5 sekúndur og síðan teknir 5 µl úr hverju glasi í nýtt PCR hvarf þar sem notaðir voru sömu vísar og áður (241FGC og 534R) og sýni síðan send til Matis-Prokaria til raðgreiningar. Við tegundagreiningu á bakteríum eru niðurstöður raðgreiningar bornar saman við þekktar raðir úr BLAST gagnabönkum á netinu (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.4. Tölfræðiútreikningar

Tölulegar niðurstöður voru greindar með SigmaStat[®] 3.5 (Systat Software, Inc. CA 94804-2028 USA) og Normality Test (Kolmogorov-Smirnov). Afkoma lirfa var skoðuð með því að bera saman fjölda lifandi, dauðra og heildarfjölda lirfa í einstaka eldiseiningum með Chi-square prófi. Samanburður var gerður á vexti lirfa í mismunandi eldiseiningum með því að framreikna vöxt lirfa í öllum kerjum til sama dags (65 dagar eftir upphaf fæðunar) en það var gert með því að nota meðaltöl og frávik mælinga. Fjöldi ræktanlegra baktería er settur fram

sem meðaltal með frávikum (SD) af mælingum úr a.m.k. tveimur sýnum sem mæld voru ýmist í tví- eða þrítekningu. "Pearson correlation" var notað til þess að greina samband á milli fjölda baktería annars vegar og afkomu lirfa eða myndbreytingu hins vegar. Marktækur munur er talinn vera þegar $p < 0,05$. Aðhvarfsgreiningu var beitt til þess að skoða sambandið á milli þátta sem línulegt samband reyndist á milli

3. NIÐURSTÖÐUR

Í þessari skýrslu er gerð grein fyrir helstu niðurstöðum úr þremur aðskildum tilraunum sem framkvæmdar voru með bætibakteríum í framleiðslueiningum lúðuseiða hjá Fiskey hf. Áhrif meðhöndlunar var metin með tilliti til áhrifa á afkomu og gæði hrogna og lirfa en einnig með tilliti til samsetningar bakteríuflóru hrogna og lirfa á ýmsum tímapunktum í eldisferlinu.

3.1 Afkoma og gæði

Hrygningu klakfisks hjá Fiskey hf. er ljósastýrt og hrogn og svil fengin úr þremur aðskildum hrygningarhópum: normalhópi, flýttum hópi og seinkuðum hópi. Vel þekkt er að heildar árangur við eldi lúðuseiða er mjög mismunandi þegar mismunandi hrygningarhópar eru bornir saman og einnig frá ári til árs (Smáradóttir, Fiskey hf. munnleg heimild). Tilraunir með bætibakteríur voru framkvæmdar í normalhópi árið 2007 og síðan endurteknað í flýttum hópi árið 2008. Afkoma og gæði hrogna og lirfa í meðhöndluðum einingum voru síðan borin saman við ómeðhöndluð hrogn og lifur í kerjum sem voru í stöðinni á sama tíma og einnig var gerður samanburður við meðalgengi í öllum hrygningarhópnum hverju sinni.

Hrogn: Í fortilaun kom í ljós að útfellingar mynduðust í hliðum kersins eftir að bakteríum hafði verið bætt í kerid við fyrstu meðhöndlun. Hrognin loddu við útfellingarnar og skiluðu sér ekki þegar flutt var úr kerinu upp í síló. Við hefðbundna meðhöndlun myndast alltaf einhverjar útfellingar í kerjum en áberandi meira magn myndaðist í kerri þar sem meðhöndlað var með bætibakteríum. Af þessum sökum var ákveðið að í tilraun I yrði einnig meðhöndlað með minni styrk baktería og í ljós kom að útfellingar voru minna áberandi þegar minni

styrkur baktería var notaður.

Niðurstöður um afkomu frjóvgaðra hrogna úr einstaka kerum í fortílaun og tílaun I eru sýndar í Ttöflu 1).

Tafla 1. Frjóvgun og afkoma frjóvgaðra hrogna í einstaka eldiseiningum í fortílaun og tílaun I. Ker þar sem meðhöndlað var með bætibakteríum eru lituð græn.

Hrognaker Meðhöndlun	Fortílaun		Tílaun I																
	16-1	17-1	16-3	17-3*	20-3	2-4	3-4	4-4	5-4	6-4	7-4	8-4	9-4	19-4	10-4	18-4	1-5	12-4	
styrkur meðh. (bakt/ml)	Bætibakt	Kontrol	Bætibakteríur												Kontrol				
	10 ⁻⁴		10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻³									
frjóvgun (%)	66,0	38,8	26,0	60,5	61,1	57,5	12,0	49,0	18,4	31,3	30,9	40,4	35,5	10,6	48,0	37,1	23,9	20,4	
afkoma af frjóvguðum hrognum (%)	45	48	48	7	18	55	0**	27	27	14	55	40	17	33	46	27	44	13	
meðalfrjóvgun %			39,5												30,9				
meðal afkoma %			25***												34				

**gleymdist að skola ker, mikið drepst.*

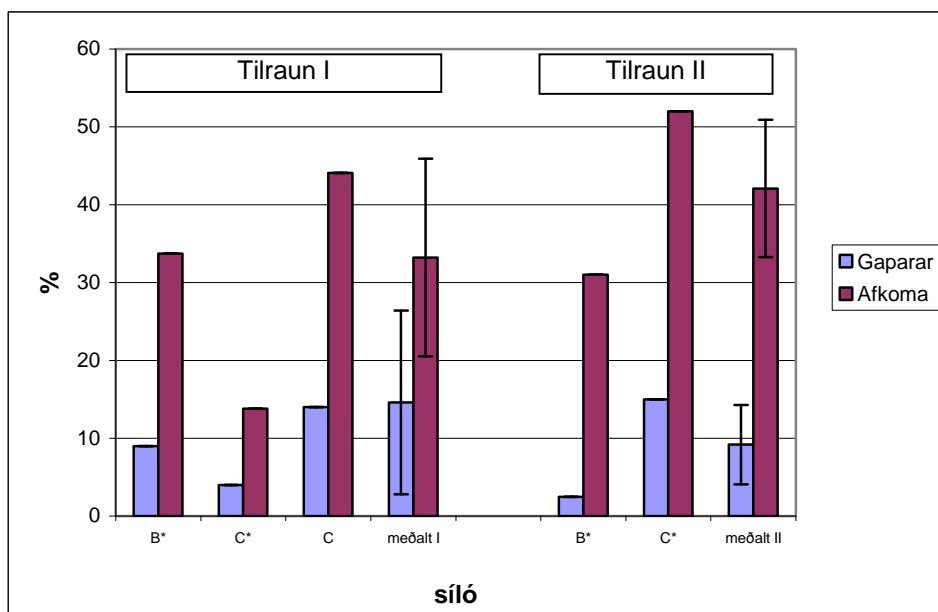
***keri hent*

****meðaltal í öllum kerjum, líka því sem er hent og gleymist að skola.*

Eins og sést í töflu 1 þá er frjóvgun hrogna mjög mismunandi í kerjunum en frjóvgunarprósenta er ákvörðuð fyrir meðhöndlun með bætibakteríum. Frjóvgun reyndist vera almennt betri í kerjum þar sem meðhöndlað var með bætibakteríum. Í fortílaun reyndist afkoma í meðhöndluðu ker 45% af frjóvguðum hrognum, svipað og í viðmiðunarkerinu og þykir það í meðallagi gott. Aftur á móti þegar niðurstöður fortílaunar og tílaunar I eru bornar saman þá reyndist afkoma frjóvgaðra hrogna ekki eins góð í meðhöndluðum kerjum eða að meðaltali 25% í meðhöndluðum kerjum samanborið við 34% í viðmiðunarkerjum. Þó ber að merkja að afkoma úr meðhöndluðum kerjum er að meðaltali 32% ef ekki eru tekin með þau ker þar sem óhöpp urðu á tímabilinu (gleymdist að skola hrogn, ker sem hrundi). Einnig ber að taka fram að hrognum í viðmiðunarkerinu var safnað í ker vikuna á eftir meðhöndluðu hrognunum og gæti það haft áhrif á niðurstöður. Í heild sinni benda niðurtöður til þess að meðhöndlun með bakteríublöndunni hafi ekki haft áhrif á afkomu hrogna, hvorki þegar meðhöndlað var með 10⁴ bakteríur/ml eða 10³ bakteríur/ml samanborið við hefðbundna meðhöndlun.

Kviðpokalirfur: Í tílaun I voru hrogn meðhöndluð á hrognastigi auk viðbótar meðhöndlunar í lok tímabilsins með bætibakteríublöndu í styrkleikanum 10⁵ bakteríur/ml þar sem hrogn úr um 8 kerjum voru meðhöndluð með þessum hætti og síðan sameinuð í eitt síló. Í tílaun II var aftur á móti um að ræða hefðbundna meðhöndlun á hrognastigi en hrogn meðhöndluð við flutning yfir í síló (10⁵ bakteríur/ml). Við lok kviðpokastigs var afkoman lirfa metin sem

hlutfall lifandi lirfa af áætluðum fjölda hrognna í hverjum L sem settur var í hvert síló en áætlað er að hver L innihaldi ~40.000 hrogn. Einnig er hlutfall kviðpokalirfa þar sem kjálkar festast í opinni stöðu (gaparar) áætlað með því að telja hlutfall gallaðra lirfa í ~150 lirfu úrtaki frá hverju síló. Áhrif meðhöndlunar með bætibakteríum voru metin m.t.t. afkomu og gæða kviðpokalirfa og til viðmiðunar var skoðað gengi í viðmiðunarsíló þar sem meðhöndlað var með hefðbundnum hætti auk þess sem árangur var borinn saman við meðaltals gengi í öllum framleiðslueiningum í stöðinni á tímabilinu (mynd 5).



Mynd 5. Afkoma kviðpokalirfa og hlutfall gapara í lok kviðpokastigs í tilraun I og II. Sýnd er niðurstöðar í bætibakteríumeðhöndluðum sílóum (B*) samanborið við síló þar sem meðhöndlað var á hefðbundinn hátt og var í stöðinni á sama tíma (C*). Einnig eru sýndar niðurstöður úr viðmiðunarkerjum með lirfum sem notaðar voru í áframhaldandi rannsóknir á frumfóðrunarstigi (C). Að auki er sýndur meðaltals árangur úr öllum eldisiseiningum í stöðinni á hvoru tímabili fyrir sig, með staðalfrávikum (meðalt I og meðalt II).

Eins og sjá má á mynd 5 er hlutfall gapara í síló þar sem hrogn voru meðhöndluð endurtekið með bætibakteríum (B* í tilraun I) hærra (9%) samanborið við viðmiðunarsíló (C*, 4%) en hlutfall gapara er aftur á móti mun lægra en meðaltalsgildi fyrir allar eldiseringar á tímabilinu (14.6±11.8). Þar sem hrogn voru meðhöndluð við flutning yfir í síló (B* í tilraun II) reyndist hlutfall gapara vera marktækt lægra (p=0.05) eða 2.5% samanborið við 15% í viðmiðunarsílóinu (C*) og einnig töluvert lægra en meðaltalsgildi fyrir allar eldiseringar á tímabilinu (9.2±5.1).

Endurtekin meðhöndlun á hrognastigi (tilraun I) reyndist gefa betri afkomu (33.7%)

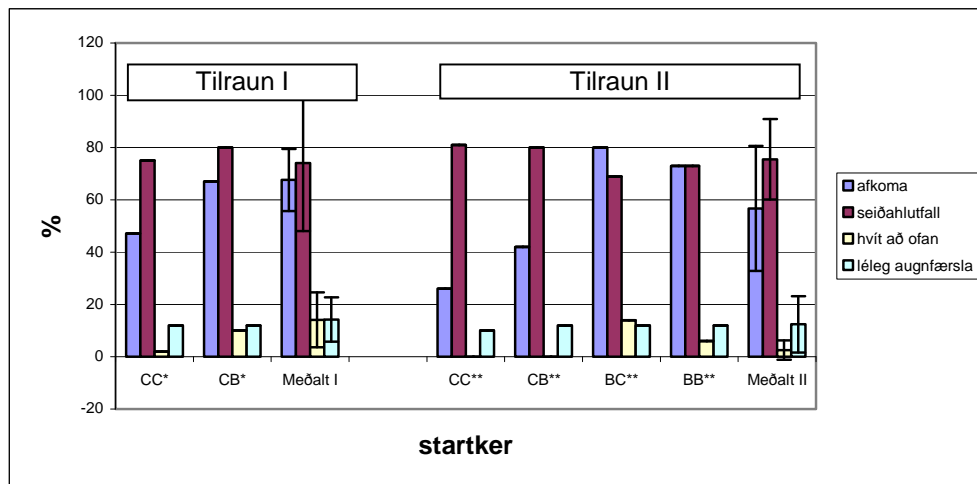
samanborið við kviðpokalirfur frá ómeðhöndluðum hrognum (13.8%) en afkoma í meðhöndluðum hóp var þó svipuð og meðaltalsafkoma úr öllum eldiseiningum á tímabilinu (33.2 ± 12.7). Afkoma kviðpokalirfa þar sem hrogn voru meðhöndluð við enda hrognastigs í tilraun II var marktækt ($p=0.05$) lægri (31.0%) í samanburði við viðmiðunarker (C*, 52.0%) og jafnframt lægri en meðaltalsafkoma úr öllum eldiseiningum á tímabilinu ($42.1 \pm 8.8\%$).

Þessar niðurstöður gefa vísbendingar um að meðhöndlun hroгна með bætibakteríublöndu geti haft jákvæð áhrif á hlutfall gapara á kviðpokastigi þó svo það hafi ekki jákvæð áhrif á afkomu kviðpokalirfa.

Lirfur: Við lok kviðpokastigs voru lirfur fluttar í startfóðrunarker og var þá byrjað að fódra með lifandi fódurdýrum (*Artemia*) sem meðhöndluð höfðu verið með bætibakteríublöndu. Meðhöndlað var í báðum gjöfum 2*2 daga við upphaf fóðrunar (dag 0 og 1) og aftur eftir um 2 vikur í fóðrun (dag 18 og 19). Afkoman er reiknuð út þegar kerid hefur verið tæmt, þá er fjöldinn sem fæst úr kerinu reiknaður sem % af heildarfjölda sem fór í kerid (skráð afföll + það sem kemur upp úr keru). Myndbreyting seiða er einnig metin með tilliti til augnfærslu og einnig hlutfall hvítra seiða (sem ekki hafa þróað með sér eðlilegan lit á efri hlið). Vöxtur lirfa í frumfóðrun er áætlaður með því að mæla þurrvigt á hópi lirfa (á bilinu ~150 lirfur/sýni 50 dögum eftir klak til ~15 lirfur/sýni eftir 50 daga í frumfóðrun) frá einstaka keru vikulega yfir tímabilið.

Endurtekin meðhöndlun með bætibakteríum á hrognastigi og áframhaldandi meðhöndlun í frumfóðrun endaði með hruni lirfa eftir um 60 daga í fóðrun. Afkoma kviðpokalirfa í viðmiðunarsílóu var einnig mjög léleg og voru þær lirfur ekki fluttar yfir í frumfóðrun. Þetta bendir til þess að gæði hroгна á þessu tímabili hafi almennt verið léleg. Í tilraun I fengust því einungis upplýsingar um afkomu og gæði lirfa í einu startkeri og var þar um að ræða lirfur sem meðhöndlaðar voru frá upphafi frumfóðrunar (CB*) svo og í viðmiðunarkeri (systkinaker úr sama sílóu) þar sem meðhöndlað var með hefðbundnum hætti (CC*). Lirfur í þessum kerjum voru því upprunnar frá sílóu með góða afkomu (44.1%) en töluvert hlutfall gapara (14%) (C1 á mynd 5). Í tilraun II fengust upplýsingar um afkomu og gæði lirfa frá startkeri sem innihélt lirfur sem meðhöndlaðar voru frá upphafi frumfóðrunar (CB**) og systkinakeri þess sem meðhöndlað var með hefðbundnum hætti (CC**). Einnig voru í

tilrauninni startker þar sem lirfur höfðu verið meðhöndlaðar við lok hrognastigs og áfram í frumfóðrun (BB**) svo og systkinaker þess sem innihélt lirfur sem meðhöndlaðar höfðu verið í lok hrognastigs en fengu hefðbundna meðhöndlun frá þeim tíma (BC**). Niðurstöður um afkomu og gæði lirfa má sjá á mynd 6.



Mynd 6. Afkoma og gæði lirfa í lok frumfóðrunar í tilraun I og II. Sýnd er afkoma, seiðahlutfall og hlutfall seiða sem ekki hafa myndbreyst fullkomlega m.t.t. litabreytinga og augnfærslu. Til samanburðar er sýnd afkoma og gæði lirfa sem meðhöndlað voru frá upphafi frumfóðrunar (CB*, CB**) svo og í systkinakerum þar sem meðhöndlað var á hefðbundinn hátt í báðum tilraunum (CC*, CC**). Einnig er sýnd afkoma og gæði lirfa sem meðhöndlaðar voru við lok hrognastigs og í frumfóðrun (BB**) svo og í viðmiðunarkeri (BC**). Að auki er sýnd meðaltals afkoma og gæði ($\pm S.D$) lirfa í öllum eildiseiningum á báðum þeim tímabilum sem um ræðir (meðaltal I og meðaltal II).

Í tilraun I var afkoma lirfa í lok frumfóðrunar marktækt betri ($p=0.05$) í kerri þar sem lirfur voru meðhöndlaðar með bætibakteríum frá upphafi frumfóðrunar (67%) samanborið við lirfur í systkinakeri þar sem meðhöndlað var með hefðbundnum hætti (47%). Afkoma meðhöndlaðra lirfa var aftur á móti svipuð og meðaltals afkoma lirfa í öllum hópnum ($67.6\% \pm 11.9$). Hlutfall seiða með ófullnægjandi litabreytingu (hvít seiði) var aftur á móti meiri í meðhöndluðu kerri (10%) en þó minni samanborið við allann hópinn (14.1 ± 10.5).

Í endurtekinni tilraun (tilraun II) var afkoma lirfa best í þeim tveimur startkerjum þar sem meðhöndlað hafði verið með bætibakteríum við lok hrognastigs (BC** og BB**).

Áframhaldandi meðhöndlun í frumfóðrun leiddi til 73% afkomu samanborið við 80% afkomu í viðmiðunarkerinu (systkinaker með sama upplagi lirfa) og var afkoma lirfa í þessu kerri marktækt betri ($p=0.05$) en meðaltals afkoma lirfa í öllum kerjum á tímabilinu (56.7 ± 23.9). Ófullnægjandi litabreyting lirfa í meðhöndluðu kerri var í meðallagi (6%) og minni samanborið við viðmiðunarker (14%). Augnfærsla lirfa í þessum kerjum reyndist í meðallagi og hlutfall seiða lítilllega minna í kerjum þar sem meðhöndlað var samanborið við meðaltal allra kerja en ekki reyndist um marktækan mun að ræða.

Afkoma lirfa sem meðhöndlaðar voru frá upphafi frumfóðrunar (CB**) reyndist einnig vera hærri (42%) samanborið við afkomu lirfa í systkinakeri (26%) en ekki reyndist vera marktækur munur á þessum tveimur hópum auk þess sem afkoma í báðum kerjum var töluvert undir meðaltali tímabilsins. Myndbreyting lirfa í tilraun II var svipuð í öllum tilraunakerjum og almennt yfir meðaltali fyrir allan hópinn.

Dauðar lirfur voru taldar upp úr hverju kerri á hverjum degi allt frumfóðrunartímabilið en ekki reyndist vera marktækur munur á fjölda þeirra milli meðhöndlana (niðurstöður ekki sýndar). Í öllum kerjum varð vart við aukinn fjölda dauðra lirfa eftir 7-14 daga í fóðrun og í tilraun II varð einnig vart við aukin afföll 32-38 dögum eftir upphaf frumfóðrunar í kerri þar sem meðhöndlað var frá upphafi frumfóðrunar. Sama mynstur var í systkinakerinu og benda niðurstöður til þess að gæði lirfa hafi verið í slakara lagi í þessum kerjum.

Gerður var samanburður á þurrvigum lirfa úr einstökum kerjum og á mismunandi tímamörkum yfir startfóðrunartímabilið og þótt töluverður munur væri á þyngd lirfa í mismunandi tilraunakerjum, reyndist sá munur ekki vera marktækur þar sem vöxtur lirfa í mismunandi kerjum á tímabilinu var afar mismunandi (niðurstöður ekki sýndar).

Ekki reyndust vera tengsl á milli afkomu og gæða kviðpokalirfa annars vegar og lirfa í lok frumfóðrunar ($R^2 < 0.2$). Ekki reyndust heldur vera tengsl á milli vaxtar lirfa í frumfóðrun og afkomu og gæða þeirra í lok tímabilsins.

3.2. Ræktanleg bakteríuflóra

Fjöldi ræktanlegra baktería var ákvarðaður með sáningu á mismunandi næringaræti. Sýni voru tekin af hrognum, yfirborðssótthreinsuðum lirfum og eldisvökva þeirra á mismunandi

tímápunktum. Einnig voru tekin reglulega sýni af fôðurdýrum sem gefin voru á tímabilinu og meðhöndluð höfðu verið með bætibakteríum eða með hefðbundnum aðferðum.

Í fortíraun var gerður samanburður á fjölda ræktanlegra baktería í hrognum annars vegar og eldisvökva þeirra hins vegar (niðurstöður ekki sýndar). Fyrstu dagana eftir frjóvgun hrogna reyndist vera lítill munur á fjölda baktería á hrognum og í eldisvökva þeirra. Fjöldi ræktanlegra baktería á hrognum óx verulega um viku eftir frjóvgun þótt ekki yrði vart við tilsvareandi aukningu á fjölda baktería í eldisvökva. Þessar niðurstöður gefa vísbendingar um að bakteríur nái smám saman fôtfestu og nái að fjölga sér á yfirborði hrogna eftir því sem líður á hrognatímabilið. Niðurstöður sýna einnig að fjöldi hugsanlegra *Vibrio* baktería (ræktun á TCBS) var töluvert meiri í meðhöndluðu kerri samanborið við viðmiðunarker (niðurstöður ekki sýndar). Skýringa á þessu er væntanlega fyrst og fremst að leita í því að bætibakteríublandan inniheldur *Vibrio* bakteríur.

Tafla 2. Heildarfjöldi ræktanlegra baktería (A) og fjöldi hugsanlegra *Vibrio* baktería (B) í frjóvuguðum hrognum í tíraun I. Sýni voru tekin strax eftir frjóvgun (0 def), viku eftir frjóvgun (7 def) og fyrir klak (14 def*). Sýni voru einnig tekin eftir yfirborðssóttthreinsun hrogna fyrir flutning í síló 14 dögum eftir frjóvgun (14 def). Sýndur er meðaltalsfjöldi ræktanlegra baktería (cfu; colony forming units) ±S.D. í hverju grammi (blautvigt) ómeðhöndlaðra hrogna (C) og hrogna sem meðhöndluð voru endurtekið yfir tímabilið með blöndu bætibaktería (B*).**

A	C (n=8)	B* (n=7)
0 def	$0.5 \cdot 10^4 \pm 10^4$	$4.6 \cdot 10^3 \pm 10^3$
7 def	$1.9 \cdot 10^6 \pm 10^6$	$1.8 \cdot 10^7 \pm 10^7$
14 def *	$1.7 \cdot 10^7 \pm 10^7$	$2.8 \cdot 10^7 \pm 10^7$
14 def **	$4.8 \cdot 10^4 \pm 10^4$	$4.1 \cdot 10^6 \pm 10^6$

B	C (n=8)	B* (n=7)
0 def	$1.9 \cdot 10^3 \pm 10^3$	$0.2 \cdot 10^3 \pm 10^2$
7 def	$0.9 \cdot 10^4 \pm 10^4$	$0.9 \cdot 10^6 \pm 10^6$
14 def *	$2.2 \cdot 10^3 \pm 10^3$	$0.6 \cdot 10^4 \pm 10^4$
14 def **	$0.1 \cdot 10^2 \pm 10^0$	$1.6 \cdot 10^3 \pm 10^3$

* fyrir yfirborðssóttthreinsun fyrir klak, með 400 ppm glutaraldehyde

** eftir yfirborðssóttthreinsun fyrir klak, með 400 ppm glutaraldehyde

Fjöldi ræktanlegra baktería í hrognum eykst frá því að vera $10^3 - 10^4$ strax eftir frjóvgun upp í

$10^6 - 10^7$ í hverju grammi 7 dögum eftir frjóvgun (Tafla 2). Marktækt meiri fjöldi baktería reynist vera í meðhöndluðum hópi ($p=0.05$) 7 dögum eftir frjóvgun en ekki reyndist vera marktækur munur á fjölda baktería milli meðhöndlana 14 dögum eftir frjóvgun. Greinilegt er að hefðbundin meðhöndlun hrognna með glutaraldehyde við flutning í síló slær mikið á bakteríufjölda en þó marktækt meira í viðmiðunarhópnum (3 log einingar) í samanburði við meðhöndlaðan hóp (1 log eining) ($p=0.05$). Þessar niðurstöður benda til þess að ræktanleg bakteríuflóra meðhöndlaðra hrognna hafi náð fötfestu á yfirborði hrognanna og sé ekki auðveldlega fjarlægð við yfirborðssóttthreinsun.

Meginuppistaða í bætibakteríublöndunni eru bakteríur af ætt *Vibrio* og sýna niðurstöður að fjöldi ræktanlegra *Vibrio* baktería var marktækt meiri í meðhöndluðum hópi samanborið við viðmiðunarhóp ($p=0.05$). Fjöldi ræktanlegra *Vibrio* baktería jókst frá því að vera $\sim 10^3$ í hverju grammi af hrognum (blautvigt) við frjóvgun upp í 10^4 í kontrollhópi og 10^6 í meðhöndluðum hópi 7 dögum eftir frjóvgun. Fjöldi *Vibrio* í hverju grammi hrognna minnkaði um 1-2 log einingar við hefðbundna glutaraldehyde meðhöndlun og var fjöldi þeirra eftir meðhöndlunina ennþá marktækt hærri í bætibakteríumeðhöndluðum hópi ($p=0.05$).

Tafla 3. Fjöldi ræktanlegra baktería (cfu; colony forming units) og fjöldi hugsanlegra *Vibrio* baktería í kviðpokalirfum við upphaf frumfóðrunar (~ 50 dögum eftir klak) í tilraun I og tilraun II. Taflan sýnir meðaltöl og staðalfrávik (S.D.) frá tveimur sýnatökum sem framkvæmdar voru samhliða úr hverri eldiseiningu. Í tilraun I er sýndur fjöldi baktería í ómeðhöndluðum lirfum (C*) og lirfum sem upprunnar voru frá hrognum sem meðhöndluð voru endurtekið með bætibakteríum á hrognastigi svo og lirfum sem meðhöndlaðar voru við lok hrognatímabilsins (B*). Einnig er sýndur fjöldi baktería í ómeðhöndluðum lirfum sem notaðar voru í tilrauninni (C). Frá tilraun II er sýndur fjöldi baktería í ómeðhöndluðum lirfum (C**) og lirfum frá hrognum sem meðhöndluð voru með bætibakteríum við lok hrognatímabilsins (B**).

Tilr I	C*	B*	C
	(n=1)	(n=1)	(n=1)
CFU lirfa ⁻¹	$0.9 \cdot 10^5 \pm 10^4$	$1.1 \cdot 10^6 \pm 10^5$	$0.6 \cdot 10^4 \pm 10^4$
<i>Vibrio</i> lirfa ⁻¹	$0.1 \cdot 10^2 \pm 10^0$	$0.1 \cdot 10^2 \pm 10^1$	$0.6 \cdot 10^3 \pm 10^3$

Tilr II	C**	B**
	(n=1)	(n=1)
CFU lirfa ⁻¹	$0.1 \cdot 10^3 \pm 10^1$	$0.2 \cdot 10^3 \pm 10^2$
<i>Vibrio</i> lirfa ⁻¹	< 1	$0.2 \cdot 10^2 \pm 10^1$

Endurtekin meðhöndlun á hrognastigi virtist ekki leiða til aukins fjölda baktería í

kviðpokalirfum 50 dögum eftir síðustu meðhöndlun (Tafla 3. Tílr. I) en aftur á móti var töluvert meira af hugsanlegum *Vibrio* bakteríum í lirfum sem meðhöndlaðar voru við lok hrognatímabils í tilraun II samanborið við viðmiðunarhóp (Tafla 3. Tílr. II)

Fjöldi ræktanlegra baktería í fódurdýrum sem gefin voru á tímabilinu reyndist vera afar breytilegur en meðhöndlun fódurdýra með bætibakteríublöndunni í 30 mín fyrir gjöf reyndist ekki leiða til aukins fjölda ræktanlegra baktería. Fjöldi baktería í lirfum í frumfóðrun jókst frá $10^2 - 10^3$ upp í $10^4 - 10^5$ cfu/lirfu eftir aðeins eina viku í frumfóðrun og hélst síðan svipaður út tímabilið (niðurstöður ekki sýndar). Fjöldi hugsanlegra *Vibrio* baktería var að öllu jöfnu um 1 log einingu lægri en heildarfjöldi baktería (niðurstöður ekki sýndar). Meðhöndlun með bætibakteríum leiddi til lítilsháttar aukningar á heildarfjölda ræktanlegra baktería og *Vibrio* baktería í lirfum í frumfóðrun (≤ 1 log eining).

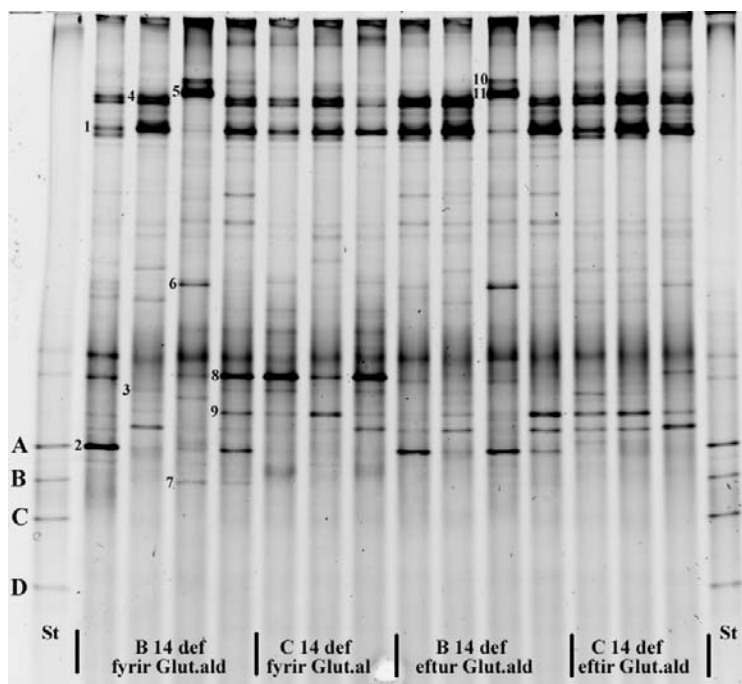
Jákvætt samband reyndist vera á milli afkomu hrogna og heildarfjölda baktería á hrognum fyrir yfirborðssóttthreinsum hjá meðhöndluðum hrognum ($R^2=0.80$). Einnig reyndist jákvætt samband á milli fjölda ræktanlegra baktería í kviðpokalirfum og bæði afkomu ($R^2=0.72$ hjá heildarfjölda baktería og 0.71 hjá *Vibrio*) og gaparaprósentu ($R^2=0.73$ hjá heildarfjölda baktería og 0.68 hjá *Vibrio*) lirfa við lok kviðpokastigs. Jákvætt samband var einnig á milli afkomu kviðpokalirfa og fjölda ræktanlegra baktería (cfu og *Vibrio*) í lirfum við lok kviðpokastigs ($R^2=0.92$) en neikvætt samband á milli fjölda ræktanlegra *Vibrio* baktería og seiðahlutfalls við lok frumfóðrunar ($R^2=0.68$).

Ræktanleg bakteríuflóra í tilraun I var flokkuð frekar m.t.t. lífefnafræðilegra eiginleika. Valdir voru 12 stofnar úr hverju sýni og þeir flokkaðir til ætta, ættkvísla og/eða tegunda m.t.t. vaxtar og svörunar í ýmsum prófum. Í heildina reyndust 328 stofnar sýna svörun í öllum prófum og voru þeir flokkaðir í 46 hópa samkvæmt niðurstöðum prófanna. Samtals 10 þessara hópa innihéldu fleiri en 10 einangraða stofna og geta því hugsanlega talist ríkjandi hópar í eldinu. Niðurstöður þessara greininga sýna enn fremur að bakteríustofnar frá sýnum sem tekin voru á mismunandi tímapiðum í eldisferlinum sýna mismunandi svörun í þeim prófum sem notuð voru en ekki reyndist munur á milli meðhöndlana.

3.3. Heildarflóra baktería

Notuð var PCR-DGGE aðferð til að rannsaka mynstur heildarflóru baktería í sýnum sem safnað var af hrognum, kviðpokalirfum og lirfum í frumfóðrun. Einnig var safnað sýnum af fódurdýrum með reglulegu millibili yfir hvort tímabil fyrir sig. Við PCR-DGGE greininguna voru valdir vísar sem magna upp V4 svæði á 16S rDNA geni baktería (bp 533-787) og er afurðin síðan aðskilin með rafdrætti á geli með afmyndandi styrkhallanda. Á hverju geli er hafður staðall til þess að auðvela samanburð á milli keyrslna og inniheldur hann hreinræktir bakteríutegunda m.a. bakteríutegundir sem notaðar voru í bætibakteríublönduna. Að loknum rafdrættir eru áhugaverð bönd skorin úr gelinu og afurðir raðgreindar til tegundagreiningar bakteríanna.

PCR-DGGE munstur bakteríuflórunnar í sýnum frá frjóvguðum hrognum leiddi í ljós töluvert fjölbreytta flóru baktería sem sjá má sem fjölda banda í gelinu (Mynd 7).

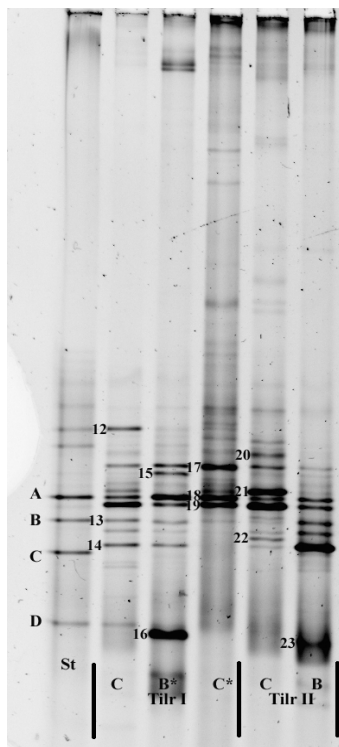


Mynd 7. DGGE munstur bakteríuflóru í sýnum af frjóvguðum hrognum sem safnað var úr einstökum hrognakerjum, bæði fyrir og eftir yfirborðssóttþreinsun hrognna við flutning yfir í síló 14 dögum eftir frjóvgun (14 def). Sýnt er mynstur bakteríuflóru meðhöndlaðra hrognna (B) samanborið við ómeðhöndluð hrogn (C) í nokkrum kerjum. Í gelinu er einnig keyrður staðall (St) sem inniheldur hreinræktir bakteríutegunda (A-D) og notaður er til að bera saman keyrslur. Tölusettar merkingar tákna þau bönd sem skorin voru út og send til raðgreiningar.

Endurtekin meðhöndlun á hrognatímanum leiddi til töluverðra breytinga á bakteríuflóru hrogna samanborið við mynstur baktería í ómeðhöndluðum hrognum. Hægt er að greina bakteríustofna sem notaðir voru í bætibakteríublöndunni (A og B) í 7 af 8 meðhöndluðum hrognasýnum og virðast bætibakteríurnar því hafa náð fótfestu á hrognum. Bætibakteríurnar virðast ekki vera hluti af bakteríuflóru hrogna sem fengið höfðu hefðbundna meðhöndlun (Mynd 7).

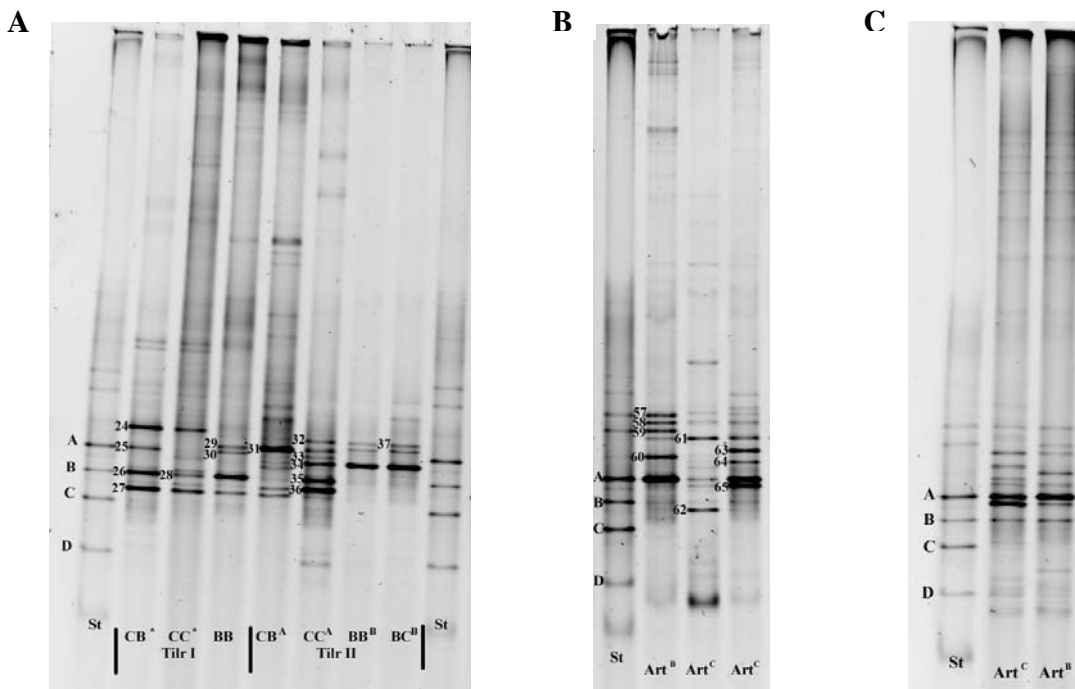
Yfirborðssóttthreinsun með glutaraldehyde við lok hrognatímabilisins virðist leiða til breytinga á samsetningu bakteríuflórunnar þar sem sum bönd eru ekki lengur greinanleg í DGGE gelinu eftir meðhöndlun (s.s. #8 á mynd 7). Stofn A í bætibakteríublöndu (eða náskyld tegund) virðist þola glutaraldehyde meðhöndlun en stofn B (#7) virðist hverfa við meðhöndlun hrogna með glutaraldehyde.

Sýni af kviðpokalirfum voru tekin við flutning lirfa yfir í frumfóðrun ~50 dögum eftir klak. PCR-DGGE munstur yfirborðssóttthreinsaðra lirfa úr tilraun I og II er sýnt á mynd 8.



Mynd 8. DGGE munstur bakteríuflóru í sýnum af ~120 yfirborðssóttthreinsuðum kviðpokalirfum við flutning í frumfóðrun ~50 dögum eftir klak. Sýnt er DGGE munstur frá lirfum sem upprunnar voru frá ómeðhöndluðum hrognum (C* og C) svo og hrognum sem meðhöndluð voru með bætibakteríublöndu endurtekið á hrognastigi (B* í tilraun I) eða einungis við flutning yfir í síló (B í tilraun II). Í gelinu er einnig keyrður staðall (St) sem inniheldur hreinræktir bakteríutegunda (A-D) og sem notaður var til að bera saman keyrslur. Tölusettar merkingar tákna þau bönd sem skorin voru út og send til raðgreiningar.

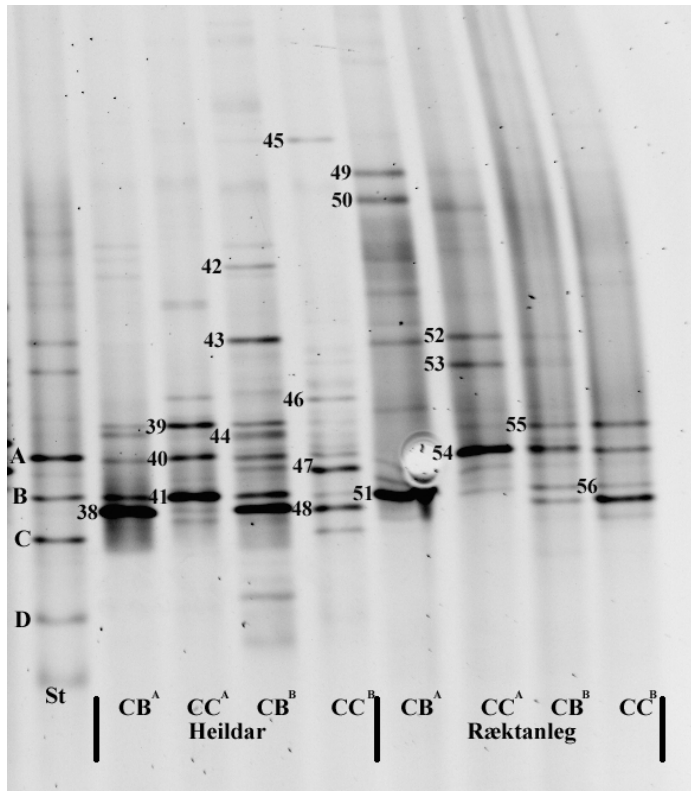
PCR-DGGE munstur kviðpokalirfa við upphaf fóðrunar reyndist vera mjög frábrugðið bakteríuflóru hroгна (Myndir 7 og 8). Bakteríur sem notaðar voru í bætibakteríublöndu, eða mjög skyldar tegundir, greindust í sýnum frá kviðpokalirfum í meðhöndluðum kerjum en reyndust einnig vera hluti ríkjandi flóru í viðmiðunarkerjum. Samkvæmt niðurstöðum PCR-DGGE greiningar virðist sem meðhöndlun með bætibakteríublöndu hafi haft áhrif á samsetningu bakteríuflóru kviðpokalirfa.



Mynd 9. DGGE munstur bakteríuflóru í sýnum af ~100 yfirborðssóttthreinsuðum lirfum frá tilraunakerjum eftir 7-8 daga í frumfóðrun úr tilraun I og tilraun II (A). Sýnt er DGGE munstur ómeðhöndlaðra lirfa (CC), lirfa sem meðhöndlaðar voru fyrir klak (BC), í frumfóðrun (CB) og bæði fyrir klak og í frumfóðrun (BB). Hástætt letur gefur til kynna lirfur af sama síló-uppruna. Einnig er sýnt DGGE munstur fódurdýra lirfa (Artemia) sem gefin voru í startker og sem fengið höfðu hefðbundna meðhöndlun (Art^C) eða voru meðhöndluð með bætibakteríum (Art^B) (B og C). Á öllum gelum voru keyrðir staðlar (St) sem innihéldu hreinræktir bakteríutegunda (A-D) og sem notaðir voru til að bera saman keyrslur. Tölusettar merkingar tákna þau bönd sem skorin voru út og send til raðgreiningar.

Samanburður á systkinakerjum (lirfur af sama síló-uppruna) leiddi í ljós að meðhöndlun fjórgaðra hroгна fyrir klak hafði ekki áhrif á samsetningu bakteríuflóru lirfa eftir eina viku í fóðrun (BB^B og BC^B , mynd 9). Bætibakteríur, eða mjög skyldar tegundir, greindust í bæði meðhöndluðum og ómeðhöndluðum lirfum frá öllum kerjum. Þó eru vísbendingar um að bætibakteríumeðhöndlun frá upphafi fóðrunar (CB) og bæði fyrir klak og í fóðrun (BB), gæti

hafa valdið breytingum á samsetningu bakteríuflórunnar þegar gerður er samanburður á systkinakerjum (CC og BC).



Mynd 10. DGGE munstur af samsetningu heildarflóru og ræktanlegrar flóru baktería í sýnum af ~75 yfirborðssóthreinsuðum lirfum frá einstaka kerjum eftir 20-23 daga í frumfóðrun. Sýnt er DGGE munstur frá ómeðhöndluðum lirfum (CC) og lirfum meðhöndluðum með bætibakteríum í frumfóðrun (CB). Hástætt letur gefur til kynna frá hvaða tilraun sýni eru tekin (tilraun I=A og tilraun II= B). Á gelinu er einnig keyrður staðall (St) sem inniheldur hreinræktir bakteríutegunda (A-D) og notaður var til að bera saman keyrslur. Tölusettar merkingar tákna þau bönd sem skorin voru út og send til raðgreiningar.

Fjölbreytt flóra baktería greindist í sýnum af lirfum eftir 21-23 daga í frumfóðrun (mynd 10). Þegar heildarflóra baktería í þessum sýnum var skoðuð virtist aðeins hluti hópanna vera ræktanlegur auk þess sem þeir hópar sem voru mest ríkjandi í ræktanlega hlutanum reyndust ekki alltaf greinanlegur hluti heildarflóru baktería (mynd 10). Þetta bendir til þess að ræktanlegur hluti flórunnar sé aðeins lítill hluti heildarflóru baktería og að ríkjandi tegundir ræktist ekki endilega upp á næringarætum í rannsóknastofunni. Bætibakteríurnar, eða mjög skyldar tegundir, virtust vera hluti af bæði ræktanlegri- og heildarflóru lirfa í öllum kerjum. Meðhöndlun með bætibakteríublöndu virtist hinsvegar geta haft áhrif á samsetningu ræktanlegrar bakteríuflóru en ekki heildarflóru baktería í lirfum (mynd 10).

Bakteríuflóra fódurdýra var rannsökuð með vikulegum sýnatökum yfir bæði tilraunátímabilin fyrir sig. Svo virtist sem meðhöndlun lifandi fódurdýra með háum styrk bætibaktería (10^7 baktería í L) í gegnum auðgunarblöndu, hefði ekki áhrif á fjölda ræktanlegra baktería (niðurstöður ekki birtar) en hins vegar virtust gæði fódurdýranna vera mjög mismunandi m.t.t. fjölda og samsetningar ræktanlegrar flóru og samsetningar heildarflóru (mynd 10). Bætibakteríur, eða mjög skyldar tegundir, virtust vera til staðar í fódurdýrum sem meðhöndluð voru með bætibakteríum en einnig í fódurdýrum sem ekki hlutu meðhöndlun með bætibakteríum. Aftur á móti virtist sem bætibakteríumeðhöndlun gæti haft áhrif á samsetningu bakteríuflóru fódurdýranna (mynd 10).

Bönd sem greind voru í flestum sýnum og geta því talist hluti ríkjandi bakteríuflóru í eldinu voru skorin úr geljum og tegundagreind. Einnig voru skorin úr geljunum bönd sem ekki voru eins í sýnum af hrognum og lírfum sem fengið höfðu ólíka meðhöndlun. PCR afurð var send til raðgreiningar til samstarfsaðila (Mátis-Prokaría) og röð síðan borin saman við gagnabanka á netinu. Með þessari aðferð er einungis verið að skoða mun á milli bakteríutegunda sem byggir á 254bp hluta 16S rDNA gensins og er það í flestum tilfellum of lítið til að hægt sé að bera kennsl á bakteríutegundir. Af þessum sökum eru afurðir oftast aðeins greindar til ættkvísla eða fjölskyldna (sjá niðurstöður í töflu 2).

Tafla 4: Niðurstöður tegundagreiningar PCR afurða baktería í böndum sem skorin voru úr DGGE geljum.

Band no.	Ættkvísl - Ætt ?	Deild	% einsleitni	GenBank nr.
2	Pseudoalteromonas	Gammaproteobacteria	100	EU935099
3	Pseudoalteromonas	Gammaproteobacteria	100	EU935099
4	Tenacibaculum ovolyticum	Flavobacteria	100	AY771741
	Lacinutrix sp.	Flavobacteria	100	EU581705
5	Psychroserpens	Flavobacteria	100	DQ167236
6				
7	Vibrio sp.	Gammaproteobacteria	99	AM941184
8	Marinomonas sp.	Gammaproteobacteria	100	DQ681162
9	Pseudoalteromonas sp.	Gammaproteobacteria	100	DQ985065
	Lacinutrix sp.	Flavobacteria	100	EU581705
10	Psychroserpens	Flavobacteria	100	DQ167236
	Lacinutrix sp.	Flavobacteria	100	EU581705
11	Psychroserpens	Flavobacteria	100	DQ167236
12	Firmicutes bacterium clone	Firmicutes	98	EF188711
13	Pseudoalteromonas	Gammaproteobacteria	100	EU935099
14	Stenotrophomonas sp.	Gammaproteobacteria	100	EU054384
15	Pseudoalteromonas	Gammaproteobacteria	100	EU935099
16	Shewanella sp.	Gammaproteobacteria	99	EU931529
17	Vibrio sp.	Gammaproteobacteria	99	AM941184
18	Pseudoalteromonas	Gammaproteobacteria	100	EU935099
19	Pseudoalteromonas	Gammaproteobacteria	100	EU935099
20	Oceanospirillaceae bacterium	Gammaproteobacteria	95	FM162973
21	Pseudomonas sp.	Gammaproteobacteria	99	EU770268
22	Bacilli bacterium clone	Firmicutes	99	EF703477
23	Stenotrophomonas sp.	Gammaproteobacteria	100	EU054384
24	Vibrio sp.	Gammaproteobacteria	100	EU655423
25	Pseudoalteromonas	Gammaproteobacteria	100	EU935099
26	Vibrio sp.	Gammaproteobacteria	100	EU655423
27	Vibrio sp.	Gammaproteobacteria	100	EU655423
28	Vibrio sp.	Gammaproteobacteria	100	EU655423
29	Shewanella sp.	Gammaproteobacteria	97	EU617351
30	Pseudoalteromonas	Gammaproteobacteria	100	EU935099
31	Shewanella sp.	Gammaproteobacteria	97	EU617351
32	Vibrio sp.	Gammaproteobacteria	100	EU655423
33	Vibrio sp.	Gammaproteobacteria	100	EU655423
34	Vibrio sp.	Gammaproteobacteria	99	AM941184
35	Vibrio sp.	Gammaproteobacteria	100	EU655423
36	Vibrio sp.	Gammaproteobacteria	100	EU655423
37	Lactobacillus plantarum	Lactobacillales	91	EF439681
38	Vibrio sp.	Gammaproteobacteria	100	EU655423
39	Vibrio sp.	Gammaproteobacteria	100	EU655423
40	Vibrio sp.	Gammaproteobacteria	100	EU655423
41	Vibrio sp.	Gammaproteobacteria	100	EU655423
42	Onothaef			
43	Acinetobacter sp.	Gammaproteobacteria	99	EU794195
44	Vibrio sp.	Gammaproteobacteria	89	AB257332
	Uncultured Sphingobacteriales	Sphingobacteria	98	EU361312
	Tenacibaculum sp.	Flavobacteria	98	AB274770
45	Flexibacter aurantiacus subsp	Flavobacteria	98	AB078044
46	Marinomonas sp.	Gammaproteobacteria	100	EU052766
47	Uncultured bacterium clone			
48	Stenotrophomonas sp.	Gammaproteobacteria	100	EU054384
49	Vibrio sp.	Gammaproteobacteria	100	EU655423
50	Vibrio sp.	Gammaproteobacteria	99	AM941184
51	Vibrio sp.	Gammaproteobacteria	99	AM941184
52	Pseudoalteromonas	Gammaproteobacteria	100	EU935099
53	Pseudoalteromonas	Gammaproteobacteria	100	EU935099
54	Pseudoalteromonas	Gammaproteobacteria	100	EU935099
55	Vibrio sp.	Gammaproteobacteria	100	EU655423
56	Vibrio sp.	Gammaproteobacteria	100	EU655423
57	Pseudoalteromonas	Gammaproteobacteria	100	EU935099
58	Acinetobacter sp.	Gammaproteobacteria	99	EU073105
59	Pseudoalteromonas	Gammaproteobacteria	100	EU935099
60				
61	Pseudomonas sp.	Gammaproteobacteria	100	EU935094
62	Corynebacterium sp.	Actinobacteridae	99	EU071498
63	Corynebacterium sp.	Actinobacteridae	99	EU071498
64	Vibrio sp.	Gammaproteobacteria	99	AM941184
65	Vibrio sp.	Gammaproteobacteria	99	AM941184

Niðurstöður raðgreiningar á PCR afurðum sem skorin voru úr DGGE geljum leiddi í ljós að samsetning bakteríutegunda í kviðpokalirfum var afar frábrugðin samsetningu bakteríutegunda í lirfum sem byrjaðar voru að taka til sín fæðu. Benda niðurstöður til þess að *Vibrio* sp. sé ríkjandi í lirfum í frumfóðrun en *Pseudoalteromonas* sp. meira ríkjandi í kviðpokalirfum. *Pseudoalteromonas*, *Marinomonas* og *Flavobacteria* sp. tegundir voru hinsvegar ríkjandi í bakteríuflóru hrogn (Tafla 4).

4. UMRÆÐA OG ÁLYKTANIR

Þær tilraunir sem hér er fjallað um eru hluti af stærra verkefni sem miðar að því að einangra hugsanlegar bætibakteríur úr meltingarvegi heilbrigðra lúðulirfa, framleiða þær og frostþurrka til geymslu og notkunar á fyrstu stigum lúðueldis í því markmiði að auka afkomu og gæði lúðulirfa.

Bætibakteríur sem fyrir valinu urðu voru ríkjandi í lirfum úr eldiseiningum sem gengið höfðu vel í framleiðslu hjá Fiskey hf. auk þess sem þær sýndu vaxtarhamlandi áhrif á þekktu sýkingarvalda í fiski og einnig bakteríur sem reyndust ríkjandi í lirfum úr eldiseiningum sem ekki sýndu jafn gott gengi í stöðinni á sama tíma. Vaxtar tilraunir á bætibakteríustofnum í rannsóknarstofunni leiddu auk þess í ljós að vöxtur stofnanna var bestur þegar allar þrjár tegundirnar voru ræktaðar saman.

Tegundagreining á stofnunum sem notaðar voru í bætibakteríublöndu þar sem 16S rDNA genið var raðgreint leiddi í ljós samsvörun við *Pseudoalteromonas* og tvær tegundir *Vibrio* baktería. Þetta eru tegundir sem einangraðar hafa verið úr fiskum og umhverfi þeirra og hafa auk þess verið notaðir sem bætibakteríur í fiskeldi (Gatesoupe 1999; Makridis *et al.*, 2000a; Paniagua *et al.*, 2001; Wong *et al.*, 2004). Styrkur meðhöndlunar er mjög mikilvægur þáttur þegar meðhöndlað er með bætibakteríum (Hai *et al.*, 2007). Af þeim sökum voru vaxtarhamlandi áhrif stofnanna rannsökuð á rannsóknastofunni í ýmsum styrkleikum og með mismunandi aðferðum auk þess sem eiginleikar stofnanna eftir frostþurrkun og geymslu voru rannsakaðir. Frostþurrkun reyndist ekki hafa áhrif á vaxtarhamlandi eiginleika bakteríanna.

Framkvæmdar voru þrjár aðskildar tilraunir í seiðaeldisstöð Fiskeyjar hf. þar sem hrogn og

lirfur voru meðhöndluð með bætibakteríublöndu á mismunandi tímupunkum í eldisferlinu. Bætibakteríum var bætt út í eldisumhverfi hrogna auk þess sem lirfur voru fóðraðar á lifandi fóðurdýrum sem meðhöndluð höfðu verið með bætibakteríum. Áhrif meðhöndlunar voru metin með tilliti til afkomu og gæða hrogna, kviðpokalirfa og lirfa í lok frumfóðrunar auk þess sem áhrif á fjölda ræktanlegra baktería og samsetning heildarflóru baktería voru metin.

PCR-DGGE aðferðin þar sem 16S rDNA gen baktería er skoðað, hefur mikið verið notuð við rannsóknir á samsetningu bakteríusamfélaga í umhverfissýnum m.a. sýnum úr sjávarfiska (Griffiths *et al.*, 2001; Jensen *et al.*, 2004; Brunvold *et al.*, 2007). Aðferðin hefur ýmsa annmarka m.a. þann að einungis er mögulegt að skoða lítinn hluta af geninu, og ræðst sá hluti af vali á vísun sem notaðir eru til mögnunar erfðaefnisins hverju sinni en af þeim sökum getur reynst erfitt að greina á milli mjög skyldra bakteríutegunda. Niðurstöður raðgreiningar benda hins vegar til þess að með aðferðinni sem hér var notuð, þ.e. val á vísun við mögnun og aðstæðum við aðskilnað í rafdrætti, þá reynist mögulegt að skilja á milli mismunandi tegunda *Vibrio* og *Pseudoalteromonas* sp. þó svo einhverjar tegundir gætu lent á sama stað í gelinu. Benda niðurstöður þessara tilrauna því til þess að aðferðin sé mjög hentug til að gefa góða yfirsýn yfir fjölbreytileika bakteríuflóru á fyrstu stigum lúðueldis og þeim breytingum sem verða við mismunandi meðhöndlun.

Niðurstöður fortíraunar bentu til þess að bætibakteríurnar næðu fótfestu á hrognum auk þess sem hrognin þoldu vel endurtekna meðhöndlun með háum styrk bætibaktería (10^7 bakteríur/L). Aftur á móti mynduðust töluverðar útfellingar á hliðum kersins og því var ákveðið að nota einnig minni styrk við meðhöndlun (10^7 bakteríur/L og 10^6 bakteríur/L) í tilraun I og reyndist sú meðhöndlun ekki hafa áhrif á afkomu frjóvgaðra hrogna.

Ekki var meðhöndlað með bætibakteríum á kviðpokastigi þar sem sílóin innihalda mjög mikið magn eldisvökva (10 þús L) og því hefði þurft að framleiða mikið magn baktería fyrir hverja meðhöndlun. Til þess að reyna að halda bætibakteríunum í umhverfi lirfanna eftir sótthreinsun hrogna, voru hrognin meðhöndluð með háum styrk bætibaktería í litlu rúmmáli eldisvökva (1L) fyrir flutning yfir í sílóin. Við sýnatöku við lok kviðpokastigs, um 50 dögum eftir síðustu meðhöndlun, reyndust bætibakteríur, eða mjög skyldar tegundir, vera til staðar í

meðhöndluðum lirfum en einnig í lirfum sem meðhöndlaðar höfðu verið með hefðbundnum aðferðum (PCR-DGGE niðurstöður). Þessar niðurstöður benda til þess að bætibakteríutegundirnar gætu verið upprunnar frá umhverfi lirfa á kviðpokastigi en eins og Olafsen (2001) bendir á, þá er bakteríuflóra sem nær fótfestu í meltingarvegi sjávarlirfa talin geta verið til komin við það að lirfurnar byrja að drekka vökva löngu áður en þær byrja að taka til sín fóður. Eftir að lirfur byrja að taka til sín utanaðkomandi fóður virðist hins vegar sem samsetning bakteríuflórunnar endurspeglar að stórum hluta bakteríuflóru fóðurdýranna (Verner-Jeffreys *et al.*, 2003; Jensen *et al.*, 2004; Korsnes *et al.*, 2006). Af þessum sökum var byrjað að meðhöndla lirfur strax við upphaf fóðrunar og síðan aftur eftir tæplega 3 vikur í fóðrun en á þeim tímamarki verður oft vart við að lirfur minnki át og hætti jafnvel alveg að taka til sín fóður sem getur leitt til 100% dauða lirfa í einstaka kerjum (Smáradóttir, Fiskey hf. munnleg heimild).

Rannsóknir sýna að viðvera bætibaktería í meltingarvegi manna og dýra ræðst m.a. af því hvaða aðferðum er beitt við gjöf bætibaktería (Klingberg og Budde, 2006). Í þessari rannsókn voru fóðurdýr notuð til þess að bera bætibakteríurnar í lirfur en fyrri rannsóknir hafa leitt í ljós að mikill fjöldi ræktanlegra baktería getur haft slæm áhrif á gæði fóðurdýranna m.t.t. hreyfanleika, litar og vaxtar (Bjornsdóttir *et al.*, 2008. *Aquaculture In Press*). Nokkrar aðferðir voru prófaðar til þess að koma bætibakteríum í fóðurdýrin en niðurstöður leiddu í ljós að besta aðferðin til þess var að bæta bakteríunum í háum styrk út í fóðurdýraræktir 30 mín fyrir gjöf. Þessi meðhöndlun hafði ekki áhrif á fjölda ræktanlegra baktería í fóðurdýrum samanborið við hefðbundna meðhöndlun en þær niðurstöður eru ekki í samræmi við niðurstöður Korsness *et al.*, (2006) sem fékk töluverða aukningu á fjölda ræktanlegra baktería við bætibakteríumeðhöndlun fóðurdýra. Niðurstöður þessa verkefnis benda aftur á móti til þess að meðhöndlun með bætibakteríum geti haft áhrif á samsetningu bakteríuflórunnar þar sem niðurstöður DGGE rannsókna leiddi í ljós svipaðan fjölda PCR afurða í meðhöndluðum og ómeðhöndluðum fóðurdýrum en mun á staðsetningu afurða í gelinu. Allar þrjár bætibakteríutegundirnar sem notaðar voru í bætibakteríublönduna, eða mjög skyldar tegundir, greindust í bæði meðhöndluðum og ómeðhöndluðum fóðurdýrum sem bendir til þess að þær gætu verið upprunnar frá fóðurdýrum lirfa.

Töluverð aukning varð á fjölda ræktanlegra baktería í meltingarvegi lirfa fyrstu vikunnar eftir að frumfóðrun hófst sem styður það sem aðrar rannsóknir hafa bent á, að bakteríur frá fóðurdýrum ná fótfestu í meltingarvegi lirfa (Huys *et al.*, 2001; Verner-Jeffreys *et al.*, 2003). Ekki reyndist marktækur munur á fjölda ræktanlegra baktería í meltingarvegi lirfa sem meðhöndlaðar voru með bætibakteríum í samanburði við ómeðhöndlaðar lirlur. Þessar niðurstöður benda til þess að bætibakteríurnar hafi ekki náð fótfestu í meltingarvegi lirlanna og því þurfi e.t.v. að meðhöndla oftár til þess að ná tilsettum árangri eins og áður hefur verið bent á (Planas *et al.*, 2006). Samsetning bakteríuflóru í sýnum af yfirborðssóttthreinsuðum lirlum í frumfóðrun reyndist endurspegla samsetningu bakteríuflóru fóðurdýranna eins og niðurstöður fyrri rannsókna hafa sýnt (Verner-Jeffreys *et al.*, 2003b; Jensen *et al.*, 2004; Korsnes *et al.*, 2006). Aftur á móti reyndist bætibakteríumeðhöndlun lirfa í frumfóðrun ekki hafa áhrif á samsetningu bakteríuflórunnar þegar til lengri tíma var litið og styður það fyrri rannsóknir sem gáfu vísbendingar um að erfitt gæti verið fyrir bætibakteríur að ná fótfestu í meltingarvegi lúðulirfa þegar bakteríuflóra fóðurdýra væri þegar búin að ná þar fótfestu (Makridis *et al.*, 2000b).

Niðurstöður þessarar rannsóknar benda til þess að meðhöndlun með bætibakteríum geti haft áhrif á samsetningu bakteríuflóru fóðurdýranna og meðhöndlaðra lirfa. Niðurstöður DGGE greiningar á bakteríuflóru fóðurdýra sýndu afurðir í sýnum af ómeðhöndluðum fóðurdýrum sem ekki fundust í meðhöndluðum sýnum. Sömu sögu er að segja um lirlur þar sem afurðir komu fram í meðhöndluðum lirlum sem ekki fundust í ómeðhöndluðum lirlum. Þessar niðurstöður gætu bent til vaxtarhamlandi/örvandi áhrifa bætibaktería á aðra flóru í meltingarvegi lirfa og styður það fyrri rannsóknir (Gatesoupe 1991; Vadstein *et al.*, 2004). Viku eftir bætibakteríumeðhöndlun lirfa greindust allar þrjár tegundirnar úr bætibakteríublöndunni (eða mjög skyldar tegundir) í lirlusýnum og benda niðurstöður til þess að bakteríurnar hafi náð fótfestu eftir meðhöndlun á fyrstu dögum frumfóðrunar. Þetta er ekki í samræmi við niðurstöður Makridis *et al.* (2006) sem bentu á að tvær meðhöndlanir á 10 daga tímabili væri ekki nægilegt til að breyta bakteríuflóru lúðulirfa.

Mikill munur reyndist vera á afkomu og gæðum lirfa í tilraunakerjum við lok frumfóðrunar og er það vel þekkt hjá Fiskey hf. að afkoma og gæði eru afar breytileg á hverju tímabili fyrir

sig (Smáradóttir, munnleg heimild). Ekki fannst neitt samband á milli fjölda ræktanlegra baktería og afkomu eða gæða lirfa í lok frumfóðrunar. Bakteríuflóra fóðurdýra var mjög breytileg í sýnum sem tekin voru vikulega yfir hvort tímabil fyrir sig og reyndist samsetning bakteríuflóru lirfa að hluta til endurspegla þennan breytileika sem vart varð í fóðurdýrunum. Meðhöndlun með bætibakteríunum virtist þó hafa áhrif á samsetningu bakteríuflórunnar og hamla vexti sumra tegunda en örva vöxt annarra. Endurtekin meðhöndlun á hrognastigi og á fyrstu stigum fóðrunar jók ekki afkomu lirfa en getur aftur á móti hafa haft jákvæð áhrif á litabreytingu lirfa í myndbreytingu. Lítilsháttar aukning varð á afkomu lirfa með meðhöndlun frá byrjun fóðrunar í samanburði við systkinaker sem innihélt lirlur af sama uppruna.

Þyngdaraukning lirfa í frumfóðrun reyndist vera mjög mismunandi en svo virtist sem lirlur af sama uppruna (systkinaker) hefðu svipaða vaxtarkúrfu. Meðhöndlun með bætibakteríum virtist ekki hafa áhrif á vöxt lirfa. Fjöldi dauðra lirfa á tímabilinu reyndist vera svipaður við mismunandi meðhöndlun með bætibakteríum. Um 1-5% lirfa drapst daglega í annarri viku í fóðrun í öllum kerjum og er það eðlilegt munstur í seiðaframleiðslu hjá Fiskey hf. (Smáradóttir, Fiskey hf. munnleg heimild). Mikil afföll sjást jafnframt samfara þeim líffræðilegu breytingum sem tengjast myndbreytingu lirfa og eftir 30-40 daga í fóðrun urðu mikil afföll á lirlum sem meðhöndlaðar höfðu verið með bætibakteríum í frumfóðrun í tilraun II. Slíkt hið sama gerðist í systkinakerinu sem innihélt ómeðhöndlaðar lirlur af sama uppruna og reyndist afkoma lirfa í þessum kerjum svipuð í lok tímabilsins. Þessar niðurstöður eru í takt við fyrri rannsóknir en þekkt er að myndbreyting getur valdið miklu álagi og haft mikil áhrif á ónæmissvörun jafnframt því að auka afföll (Ishibashi *et al.*, 2007; Manchado *et al.*, 2008).

Meðhöndlun með háum styrk bætibaktería á hrognastigi hafði ekki áhrif á afkomu frjóggaðra hrogna sem bendir til þess að bætibakteríutegundirnar hafi ekki mikil áhrif á hrognastigi eldisins. Aftur á móti greindist aukinn fjöldi ræktanlegra baktería, sérstaklega *Vibrio* baktería, í meðhöndluðum hrognum. DGGE greining benti jafnframt til þess að bakteríutegundirnar í blöndunni næðu fótfestu á hrognunum en virtust ekki vera til staðar á kontrólhrognum. Þetta gæti haft áhrif á gæði og lífsmöguleika hrognanna en fyrri rannsóknir benda til þess að bakteríuflóra hrogna sé mikilvæg m.t.t. verndar gegn tækifærissýklum (Vadstein *et al.*, 2004).

Frjóvgun hrogna reyndist ekki hafa áhrif á afkomu í lok hrognastigs en leiddar eru líkur að því að léleg frjóvgun leiði til aukins lífræns álags og þar með hættu á auknum bakteríuvexti (Makridis *et al.*, 2006; Nakase og Eguchi 2007). Mikill breytileiki er í fjölda ræktanlegra baktería en ekki fundust tengsl á milli bakteríufjölda og frjóvgunar hrogna. DGGE greining benti ennfremur til þess að ekki væri afgerandi munur á samsetningu bakteríuflóru hrogna sem fengið höfðu sömu meðhöndlun og gæti það skýrt mun á afkomu hrogna. Niðurstöður benda því til þess að bakteríuflóra hrogna hafi ekki afgerandi áhrif á gæði hrognanna.

Niðurstöður rannsókna á kviðpokalirfum eru sjaldnast sambærilegar þar sem uppruni kviðpokalirfa er aldrei sá sami í tveimur sílóum. Af þessum sökum er í rannsókninni einnig gerður samanburður við meðaltalsgengi í öllum eldiseiningum á hvoru tímabili fyrir sig. Niðurstöður benda til þess að meðhöndlun með bætibakteríum á hrognastigi leiði til lægri tíðni gapara samanborið við bæði viðmiðunarsíló og meðaltal gapara í öllum tilraunaeingum á tímabilinu. Afkoma kviðpokalirfa í viðkomandi síló var ennfremur betri en í viðmiðunarsíló. Mikill breytileiki var á fjölda ræktanlegra baktería í kviðpokalirfum við upphaf frumfóðrunar í báðum tilraunum og hafði meðhöndlun hrogna með bætibakteríum við flutning yfir í síló ekki áhrif á fjölda baktería í lirfum sem tekin voru sýni af ~50 dögum seinna. Engin tengsl fundust á milli fjölda ræktanlegra baktería og afkomu eða gaparaprósentu kviðpokalirfa eins og fyrri tilraunir hafa leitt í ljós (Bjornsdóttir *et al.*, óbirtar niðurstöður). Möguleg skýring á þessu gæti verið sú að bætibakteríumeðhöndlunin hafi leitt til breytinga á samsetningu bakteríuflórunnar sem ekki kemur fram í fjölda ræktanlegra baktería. Einnig ber að merkja að í þessari rannsókna reyndist fjöldi ræktanlegra baktería í kviðpokalirfum fremur lítil samanborið við fyrri rannsóknir og hugsalegt er að sambandið á milli fjölda baktería og hlutfalls gapara hverfi þegar fjöldi baktería er undir ákveðnu lágmarki.

Heildarniðurstöður tilrauna í þessu verkefni benda til þess að meðhöndlun lirfa með bætibakteríum í gegnum *Artemia* í 2*2 hrinum í upphafi frumfóðrunar hafi jákvæð áhrif á afkomu lirfa í lok frumfóðrunar samanborið við systkinaker sem innihalda lirfur af sama uppruna.

5. ÞAKKARORÐ

Aðstandendur verkefnisins vilja þakka starfsmönnum hjá Fiskey hf. fyrir mjög gott samstarf og umfangsmikla aðkomu að skipulagi og framkvæmd verkefnisins. Starfsmönnum hjá Mátis-Prokaria er einnig þakkað fyrir raðgreiningu sýna í verkefninu. Tækniþróunarsjóði Rannís er sömuleiðis þakkað fyrir rausnarlegt framlag til verkefnisins á árunum 2006-2008.

6. HEIMILDIR

- Aakra, A. Utaker, J.B. and I.F. Nes.** 1999. RFLP of rRNA genes and sequencing of the 16S-23S rDNA intergenic spacer region of ammonia-oxidizing bacteria: a phylogenetic approach. *Int. J. Systematic Bacteriology*. 49:123-130.
- Abutbul, S., Golan-Goldhirsh, A., Barazani, O. and D. Zilberg.** 2004. Use of *Rosmarinus officinalis* as a treatment against *Streptococcus iniae* in tilapia (*Oreochromis* sp.). *Aquaculture*. 238, 97-105.
- Bergh, O.E. and O.E. Evensen.** 2002. ICES Council Meeting Documents (ICES CM 2002/R:07)
- Bernard, L. Schafer, H. Joux, F. Courties, C. Muyzer, G. and P. Lebaron.** 2000. Genetic diversity of total, active and culturable marine bacteria in coastal seawater. *Aquatic Microbial Ecology*. 23:1-11.
- Bjornsdottir, R., Johannsdottir, J., Coe, J., Smaradottir, H., Agustsson, T., Sigurgisladottir, S. and Gudmundsdottir, B.K.** 2008. Survival and quality of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) in intensive farming: possible impact of the intestinal bacterial community. *Aquaculture In Press*.
- Björnsdóttir, R. and H. Smáradóttir.** 2003. Stýring örveruflóru í frumfóðrunarkerjum lúðulirfa (Rannís ver.#010 840 001) Lokaskýrsla. #21-03.
- Brunvold, L., Sandaa, R.-A., Mikkelsen, H., Welde, E., Bleie, H. and O. Bergh. O.** 2007. Characterisation of bacterial communities associated with early stages of intensively reared cod (*Gadus morhua*) using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). *Aquaculture*. 272, 319-327.
- Douglas, L.C. and M.E. Sanders.** 2008. Probiotics and prebiotics in dietetics practice. *J. American Dietetic Ass.* 108, 510-521.
- Fjellheim, A.J., Playfoot, K.J., Skjermo, J. and O. Vadstein.** 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.
- Giuliano, L. DeDomenico, M. DeDomenico, E. Hoefle, M.G. and M.M. Yakimov.** 1999. Identification of culturable oligotrophic bacteria within naturally occurring bacterioplankton communities of the Ligurian sea by 16S rRNA sequencing and probing. *Microb. Ecol.* 37(2): 77-85.
- Gomez-Gil, B., Roque, A. and J.F. Turnbull.** 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*. 191, 259-270.
- Gullian, M., Thompson F. and J. Rodriguez.** 2004. Selection of probiotic bacteria and

- study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 233: 1-14.
- Griffiths S, Melville K, Cook M, Vincent S, St Pierre M. and C. Lanteigne.** 2001. Profiling of bacterial species associated with haddock larviculture by PCR amplification of 16S rDNA and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Aquatic Animal Health*. 13(4):355-363.
- Hai, N.V., Fotedar, R. and N. Buller.** 2007. Selection of probiotics by various inhibition test methods for use in the culture of western king prawns, *Penaeus latisulcatus* (Kishinouye). *Aquaculture*. 272, 231-239.
- Halami, P.M, Chandrashekar A. and R. Joseph.** 1999. Characterization of bacteriocinogenic strains of lactic acid bacteria in fowl and fish intestines and mushroom. *Food Biotechnol.* 13(2): 121-136.
- Heimisdóttir, H.L.** 2008. Bætibakteríur – hin hliðin. Sumarverkefni styrkt af Nýsköpunarsjóði Námsmanna og Rannsóknasjóði Háskólans á Akureyri.
- Hjelm, M., Riaza, A., Formoso, F., Melchiorson, J. and L. Gram.** 2004a. Seasonal incidence of autochthonous antagonistic *Roseobacter* spp. and Vibrionaceae strains in a Turbot larva (*Scophthalmus maximus*) rearing system. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 7288-7294.
- Hjelm, M., Bergh, Ø., Riaza, A., Nielsen, J., Melchiorson, J., Jensen, S., Duncan, H., Ahrens, P., Birkbeck, H. and L. Gram.** 2004b. Selection and identification of autochthonous potential probiotic bacteria from turbot larvae (*Scophthalmus maximus*) rearing units. *Syst. Appl. Microbiol.* 27, 360-371.
- Huys, L., Dhert, P., Robles, R., Ollevier, F., Sorgeloos, P. and J. Swings.** 2001. Search for beneficial bacterial strains for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larviculture. *Aquaculture*. 193, 25-37.
- Ishibashi, Y., Kotaki, T., Yamada, Y. and H. Ohta.** 2007. Ontogenic changes in tolerance to hypoxia and energy metabolism of larval and juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 352, 42-49.
- Isolauri, E.** 2004. Manipulation of the gut microbiota and immunity: probiotics. *Int. J. Med. Microbiol.* 294, 102-102.
- Jensen, S., Ovreas, L., Bergh, O. and V. Torsvik.** 2004. Phylogenetic analysis of bacterial communities associated with larvae of the Atlantic halibut propose succession from a uniform normal flora. *Syst. Appl. Microbiol.* 27, 728-736.
- Keller, M. and K. Zengler,** 2004. Tapping into microbial diversity. *Nat. Rev Microbiol.* 2: 141
- Klingberg, T.D. and B.B. Budde.** 2006. The survival and persistence in the human gastrointestinal tract of five potential probiotic lactobacilli consumed as freeze-dried cultures or as probiotic sausage. *Int. J. Food Microbiol.* 109, 157-159.
- Korsnes, K., Nicolaisen, O., Skar, C.K., Nerland, A.H. and O. Bergh.** 2006. Bacteria in the gut of juvenile cod *Gadus morhua* fed live feed enriched with four different commercial diets. *ICES J. Mar. Sci.* 63, 296-301.
- Kvale, A., Nordgreen, A., Tonheim, S.K. and K. Hamre.** 2007. The problem of meeting dietary protein requirements in intensive aquaculture of marine fish larvae, with emphasis on Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture Nutrition.* 13, 170-185.
- Lange, S., Bambir, S.H., Dodds, A.W., Bowden, T., Bricknell, I., Espelid, S. and B. Magnadóttir.** 2006. Complement component C3 transcription in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 285-294.
- Lategan, M.J., Torpy, F.R. and L.F. Gibson.** 2004. Biocontrol of saprolegniosis in silver

- perch *Bidyanus bidyanus* (Mitchell) by *Aeromonas media* strain A199. *Aquaculture*. 235, 77-88.
- Lauzon, H, L, and R, Björnsdóttir.** 2006. Forvarnir í fiskeldi. *Rf skýrsla* #01-06 til AVS sjóðsins.
- Lee, C.C and P O'Bryen.** 2002. *World Aquaculture Society*, 188pp (OCEI-W-01-001)
- Lillehaug, A, Lunestad B.T. and K. Grave.** 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. and V.E. Coyne.** 2005. Improved growth rate and disease resistance in fanned *Haliotis midae* through probiotic treatment. *Aquaculture*. 245: 249-261.
- Magnadottir, B., Lange, S., Gudmundsdottir, S., Bogwald, J. and R.A. Dalmo.** 2005. Ontogeny of humoral immune parameters in fish. *Fish Shellfish Immunol.* 19, 429-439.
- Makridis, P., Costa, R.A. and M.T. Dinis.** 2006. Microbial conditions and antimicrobial activity in cultures of two microalgae species, *Tetraselmis chuii* and *Chlorella minutissima*, and effect on bacterial load of enriched *Artemia metanauplii*. *Aquaculture*. 255, 76-81.
- Makridis, P, Fjellheim A.J, Skjermo J. and O. Vadstein.** 2000a. Colonization of the gut in first feeding turbot by bacterial strains added to the water or bioencapsulated in rotifers. *Aquaculture Int.* 8: 367-380
- Makridis, P, Fjellheim A.J, Skjermo J. and O. Vadstein.** 2000b. 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. and M.T. Dinis.** 2005. Evaluation of candidate probiotic strains for gilthead sea bream larvae (*Sparus aurata*) using an in vivo approach. *Lett. Appl. Microbiol.* 40, 274-277.
- Manchado, M., Salas-Leiton, E., Infante, C., Ponce, M., Asensio, E., Crespo, A., Zuasti, E. and J.P. Cañavate.** 2008. Molecular characterization, gene expression and transcriptional regulation of cytosolic HSP90 genes in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Gene*. 416, 77-84.
- Marteau, P., Seksik, P. and R. Jian.** 2002. Probiotics and health: new facts and ideas. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 486-489.
- Morelli, L.,** 2007. In vitro assessment of probiotic bacteria: From survival to functionality. *Int. Dairy J.* 17, 1278-1283.
- Muyzer, G., De Waal, E.C. and A.G. Uitterlinden.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695-700.
- Nakase, G. and M.Eguchi.** 2007. Analysis of bacterial communities in *Nannochloropsis* sp. cultures used for larval fish production. *Fish. Sci.* 73, 543-549.
- Olafsen, J.A.** 2001. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture*. 200: 223-247.
- Olsen, Y., Evjemo, J.O. and A. Olsen.** 1999. Status of the cultivation technology for production of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) juveniles in Norway/Europe. *Aquaculture*. 176, 3-13.
- Ouwehand, A., Kirjavainen, P., Shortt, C. and S. Salminen.** 1999. Probiotics: mechanisms and established effects. *Int. Dairy J.* 9, 43-52.
- Paniagua, E, Paramá A, Iglesias R, Sanmartín M.L. and J. Leiro.** 2001. Effects of bacteria on the growth of an amoeba infecting the gills of turbot. *Dis Aquat. Org.* 45: 73-

- Panigrahi, A., Kiron, V., Puangkaew, J., Kobayashi, T., Satoh, S. and H. Sugita.** 2005. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 243, 241-254.
- Picchietti, S., Mazzini, M., Taddei, A.R., Renna, R., Fausto, A.M., Mulero, V., Carnevali, O., Cresci, A. and L. Abelli.** 2007. Effects of administration of probiotic strains on GALT of larval gilthead seabream: Immunohistochemical and ultrastructural studies. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 57-67.
- Planas, M., Perez-Lorenzo, M., Hjelm, M., Gram, L., Uglenes Fiksdal, I., Bergh, O. and J. Pintado.** 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.
- Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S. and P. Menasaveta.** 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture.* 191, 271-288.
- Robertson, P.A.W., O'Dowd, C., Burrells, C., Williams, P. and B. Austin.** 2000. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture.* 185, 235-243.
- Skjermo, J. and O. Vadstein.** 1999. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture.* 177: 333-343.
- Vadstein, O., Mo, T. and O. Bergh,** 2004. Microbial interactions, prophylaxis and diseases. In: *Culture of cold-water marine fish.* Moksness, E., E. Kjorsvik and Y. Olsen (eds.), pp. 28-73. Blackwell Publishing.
- Verner-Jeffreys, D.W, Shields R.J, Bricknell I.R. and T.H. Birkbeck.** 2003. Changes in the gut-associated microflora during the development of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae in three British hatcheries. *Aquaculture.* 219: 21-42.
- Wong, H, Wang P, Chen S-Y. and S-W. Chiu.** 2004. Resuscitation of viable but non-culturable *Vibrio parahaemolyticus* in a minimum salt medium. *FEMS Microbiol. Letters.* 233: 269-275.