

Vinnsla og vöruþróun
Processing and Product
Development

Líftækni
Biotechnology



Matvælaöryggi
Food Safety



Leit að bætibakteríum

Jónína Þ. Jóhannsdóttir
Eyrún Gígja Káradóttir
María Pétursdóttir
Jennifer Coe
Heiðdís Smáradóttir
Rannveig Björnsdóttir

Vinnsla og vöruþróun

Skýrsla Matís 27-08
September 2008

ISSN 1670-7192

<i>Titill / Title</i>	Leit að bætibakteríum. Searching for putative probiotics in the production system of halibut larvae.		
<i>Höfundar / Authors</i>	<i>Jónína Þ. Jóhannsdóttir, Eyrún Gígja Káradóttir (MS nemi), María Pétursdóttir, Jennifer Coe, Heiðdís Smáradóttir, Rannveig Björnsdóttir</i>		
<i>Skýrsla / Report no.</i>	27-08	<i>Útgáfudagur / Date:</i>	September 2008
<i>Verknr. / project no.</i>	1303-1706		
<i>Styrktaraðilar / funding:</i>	Tækniþróunarsjóður Rannís		
<i>Ágrip á íslensku:</i>	<p>Heildarmarkmið verkefnisins er að bæta lifun og gæði lúðulirfa í startfóðrun með notkun bætibaktería. Við samsetningu bætibaktería fyrir fisk hefur gjarnan verið horft til eldis hlýsjávartegunda og hafa þær bakteríutegundir sem notaðar hafa verið reynst ná illa fótfestu við þær umhverfisaðstæður sem um ræðir í eldi kaldsjávartegunda eins og t.d. lúðu. Í þessu verkefni er leitað að og borin kennsl á bakteríur sem eru ríkjandi í lúðulirfum úr eldiseiningum sem gengið hafa vel m.t.t. afkomu og gæða myndbreytingar lirfa. Gerðar voru rannsóknir á eiginleikum einangraðra bakteríustofna m.t.t. vaxtarhamlandi áhrifa á þekktu sýkingarvalda fyrir fisk svo og ríkjandi bakteríutegunda úr lúðulirfum í eldiseiningum þar sem afkoma og gæði lirfa reyndust undir meðallagi.</p> <p>Einangraðar voru ríkjandi bakteríur úr lirfum í öllum eldiseiningum Fiskey hf. á tveimur mismunandi tímabilum auk þess sem sýni voru tekin úr seiðum í útflutningsstærð. Niðurstöður rannsókna á vaxtarhamlandi áhrifum einangraðra stofna leiddu í ljós 18 bakteríustofna sem reyndust hindra vöxt þekktara sýkingarvalda og/eða bakteríustofna sem einangraðir höfðu verið úr eldisumhverfi lirfa. Niðurstöður raðgreininga leiddu í ljós góða samsvörun við 6 mismunandi bakteríutegundir. Í framhaldinu verður meðhöndlað með valinni blöndu bætibaktería á fyrstu stigum lúðueldis.</p> <p><i>Verkefnið var styrkt af Tækniþróunarsjóði Rannís (2006-2008).</i></p>		
<i>Lykilorð á íslensku:</i>	<i>Lúðueldi – bætibakteríur – fyrstu stig eldisins – bakteríuflóra</i>		
<i>Summary in English:</i>	<p>The overall aim of this project is to use probiotic bacteria to promote increased survival of halibut larvae during first feeding. Previous studies indicated that the microbial load of larvae and their environment represents a problem and the objective of this project was to search for possible candidates for probiotic bacteria to promote survival and growth of larvae use during the first and most sensitive phase of the production.</p> <p>Potential probiotic strains were selected on the basis of dominance in the gut of larvae from production units with successful growth, development and survival. The growth inhibiting activity was tested against known fish pathogens as well as bacteria dominating the intestinal community of larvae from production units with poor overall success.</p> <p>We isolated dominating bacteria in the gut of larvae from all production units of two different spawning groups at Fiskey Ltd. and also from export-size fingerlings. Growth inhibition studies revealed 18 bacterial isolates that inhibited growth of known fish pathogens and/or dominating bacterial isolates from the gut of larvae of an overall poor quality. 16S rRNA sequencing revealed a reasonable correlation to 6 bacterial species and presently. As a next step, halibut eggs and larvae will be treated with selected strains to test their potentiality as probiotics during the first production stages of halibut aquaculture.</p> <p><i>The project was supported by the Technology Development Fund of Rannís, the Icelandic Centre for Research (2006-2008).</i></p>		
<i>English keywords:</i>	<i>Marine aquaculture – larvae – probiotic bacteria – bacterial community</i>		

Skýrsla Matís 27-08

September 2008

Leit að bætibakteríum

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



EFNISYFIRLIT

1. INNGANGUR	3
2. AÐFERÐIR OG FRAMKVÆMD.	5
2.1. Efniviður	5
2.2. Úrvinnsla sýna	7
2.2.1 Ræktanleg bakteríuflóra	7
2.2.1 Eiginleikar bakteríustofna	8
3. NIÐURSTÖÐUR	10
4. UMRÆÐA OG ÁLYKTANIR	12
5. ÞAKKARORÐ	13
6. HEIMILDIR	14

1. INNGANGUR

Markmið þessa verkefnis er að leita að bakteríum sem hægt er að nota sem bætibakteríur á fyrstu stigum eldis lúðulirfa. Verkefnið er unnið í samvinnu MATÍS, Fiskeyjar hf. og HA og er hluti af umfangsmeira verkefni “Bætibakteríur í lúðueldi” þar sem meginmarkmiðið er að bæta lifun og gæði lúðulirfa í startfóðrun og nota til þess umhverfisvænar aðferðir (bætibakteríur). Verkefnið er liður í uppbyggingu rannsókna á sviði fiskeldis í samstarfi við fyrirtæki sem er í fremstu röð á því sviði og hefur til nokkurra ára verið stærsti framleiðandi lúðuseiða í heiminum.

Rannsóknir sýna að örveruálag og óhagstæð samsetning bakteríuflóru í eldisumhverfinu getur verið stórt vandamál við eldi sjávarfiska og er þetta talinn einn af orsakavöldum mikilla affalla lirfa á fyrstu stigum eldisins sem er megin flöskuháls í eldi lúðuseiða sem og seiða annarra tegunda sjávarfiska. Ástæðna fyrir þessu er m.a. að leita í náinni snertingu baktería í eldisumhverfi fiska við yfirborð þeirra (Macey og Coyne 2005) en einnig því að sérhæfð ónæmissvörun fiska nær ekki fullum þroska fyrr en löngu eftir klak og verða lifur því að reiða sig á ósérhæfða þætti ónæmissvörunar á þessum fyrstu og viðkvæmstu stigum eldisins (Olafsen 2001, Verner-Jeffreys *et al.*, 2003, Lee 2002, Makridis *et al.*, 2000a, Makridis *et al.*, 2000b). 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 lifrunum 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 og Zengler 2004, Bergh og Evensen 2002). Möguleiki á því 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 til það að skapa ákjósanlegt umhverfi á fyrstu stigum eldis sjávarfiska (Olafsen 2001, Gatesoupe 1999).

Einn möguleiki til að stýra bakteríuflóru eldisins er með notkun svokallaðra bætibaktería (probiotic bacteria) en þær hafa verið skilgreindar sem “lifandi bakteríur sem hafa jákvæð áhrif á einstaklinginn með því t.d. að bæta örverufræðilegt jafnvægi í meltingarvegi hans”

(Olafsen 2001, Skjermo 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).

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 dýr. Þannig var megin uppistaða fyrstu blanda af bætibakteríum sem komu á markaðinn fyrir fisk gjarnan mjólkursýrubakteríur en í framhaldi af því einnig tegundir sem sýndu sig t.d. geta hamlað vexti ríkjandi baktería í eldinu svo og tegundir sem eru náttúrulegar í umhverfi sjávar (*Vibrio*, *Bacillus*, *Pseudomonas* ofl.) (Makridis *et al.*, 2000a, Paniagua *et al.*, 2001, Wong *et al.*, 2004). Bætibakteríur hafa í mörgum tilfellum reynst vel við að auka vöxt og gæði fisklirfa með því að hindra að sjúkdómsvaldandi bakteríur nái þar fótfestu og/eða með því að efla ónæmissvörun lirfa (Macey og Coyne 2005, Gullian *et al.*, 2004). 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 lirfanna og því líklegt að þessar tegundir hafi einfaldlega ekki lifað af eða náð fótfestu í eldinu við það umhverfshitastig sem þar er notað (4-11°C) (Lillehaug *et al.*, 2003). Þó ber einnig að merkja 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).

Verkefnið er hluti af stærra verkefni (Bætibakteríur í lúðueldi) sem styrkt er af Tækniþróunarsjóði Rannís og er að hluta til unnið af nemanda í rannsóknatengdu meistaranámi við Viðskipta- og raunvísindadeild HA (Eyrún Gígja Káradóttir, áætluð námslok í desember 2008). 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 nemanda var styrkt af Nýsköpunarsjóði námsmanna og Rannsóknasjóði Háskólans á Akureyri (Heimisdóttir 2008)

2. AÐFERÐIR OG FRAMKVÆMD

Þessi skýrsla fjallar um framkvæmd og niðurstöður umfangsmikillar leitar að bætibakteríum sem framkvæmd var á tímabilinu janúar 2006 til júní 2008. Markmið rannsóknarinnar var að einangra og skilgreina bakteríur úr eldisumhverfi lirfa sem hugsanlega væri hægt að nota sem bætibakteríur á fyrstu stigum eldis lúðulirfa. Við upphaf leitarinnar voru sett fram ákveðin skilyrði sem hugsanlegar bætibakteríur þyrftu að uppfylla:

- stofnarnir þyrftu að vera til staðar í eldiseiningum þar sem afkoma, vöxtur og/eða gæði lirfa voru yfir meðallagi og/eða
- stofnarnir hindruðu vöxt þekktra sýkingarvalda fyrir fisk og/eða ríkjandi tegunda úr eldiseiningum þar sem afkoma og gæði lirfa reyndist undir meðallagi.

2.1. Efniviður

Stofnum var safnað úr meltingarvegi kviðpokalirfa og lirfa í startfóðrun í seiðaeldisstöð Fiskeyjar hf. á tímabilunum júlí – september 2005 og ágúst – október 2006. Auk þess voru tekin sýni úr meltingarvegi nokkurra stærri seiða (myndbreyttra) sem litu vel út og voru orðnar nægilegar stórar fyrir útflutning (október 2006). Ríkjandi bakteríur voru ræktaðar úr þessum sýnum og hugsanlegar bætibakteríur rannsakaðar m.t.t. hamlandi áhrifa á vöxt annarra baktería. Meðhöndlað var með hefðbundnum hætti í öllum eldiseiningum árið 2006 samkvæmt framleiðsluferli sem þróað hefur verið af starfsmönnum Fiskeyjar hf. Sýni sem safnað var á árinu 2005 voru að hluta til úr lirlum sem meðhöndlaðar voru með hefðbundnum hætti og að hluta til úr lirlum þar sem meðhöndlað var með blöndu bætibaktería sem fæst keypt á almennum markaði (REMUS®).

Uppsetning eldiseininga og sýnataka var í höndum starfsmanna Fiskeyjar hf. sem einnig sáu um skráningu affalla og mat á gæðum lirfa í lok kviðpokastigs (afkoma lirfa og hlutfall gallaðra lirfa þ.e. svokallaðra gapara) og einnig í lok startfóðrunar (vöxtur og afkoma lirfa svo og gæði myndbreytingar m.t.t. litabreytinga og augnfærslu). Þegar afkomutölur lágu fyrir voru skoðaðir betur þeir bakteríustofnar sem reyndust ríkjandi í meltingarvegi lirfa úr þeim sílóum og startkerjum sem best komu út m.t.t. afkomu lirfa, gaparaprósentu og gæða lirfa. Þetta var byggt á því að áætla má að ríkjandi bakteríuflóra sé lirfunum hagstæð í eldiseiningum þar sem afkoma og þroski eru yfir meðallagi. Valdir voru bakteríustofnar úr kviðpokalirfum í síló í þar sem afkoma var góð (45%) og öðru síló í þar sem afkoma var einnig góð auk þess sem gaparaprósenta var sérstaklega lág (8%), sem gæti bent til þess að bakteríuflóran væri hagkvæm fyrir lirfurnar. Einnig voru valdir bakteríustofnar úr lirfum í startkerjum þar sem afkoma og gæði lirfa var yfir meðallagi en það var metið við lok startfóðrunar. Samtals voru 384 bakteríustofnar skoðaðir sem hugsanlegir bætibakteríustofnar. Rannsókuð voru áhrif þessara bakteríustofna á vöxt þekktra sýkingarvalda í fiski (*Aeromonas salmonicida*, *Vibrio fluvialis* og *Vibrio anguillarum*) svo og 96 annarra bakteríustofna sem einangraðir höfðu verið úr fóðurdýrum (*Artemia*) og meltingarvegi lirfa í eldiseiningum (sílóum og startkerjum) þar sem afkoma og gæði lirfa reyndust undir meðallagi. Samtals voru því rannsakaðir 100 prófstofnar (sjá töflu 1).

Tafla 1. Uppruni og fjöldi bakteríustofna sem rannsakaðir voru sem hugsanlegar bætibakteríur og prófstofnar sem notaðir voru til rannsókna á vaxtarhamlandi hugsanlegra bætibakteríustofna.

Hugsanlegar bætibakteríur

Uppruni	Fjöldi stofna
Síló - meðhöndlað með REMUS® bætibakteríublöndu (2005). Afkoma í meðallagi (42%), lág gaparaprósenta (8%).	12
Síló - hefðbundin meðhöndlun (2005). Afkoma góð (45%)	12
Startker - hefðbundin meðhöndlun (2005). Afkoma mjög góð (93-100%)	36
Startker - hefðbundin meðhöndlun (2006). Afkoma mjög góð (94%). Sýni tekin á mismunandi tímamörkum yfir 50 daga tímabil.	224
Seiði í útflutningsstærð (2006).	100
Samtals	384

Prófstofnar ("neikvæðir" stofnar)

Uppruni	Fjöldi stofna
Þekktir sýkingarvaldandi stofnar (<i>Aeromonas salmonicida</i> , <i>Vibrio anguillarum</i> , <i>Vibrio fluvialis</i>)	4
Síló - hefðbundin meðhöndlun (2005). Afkoma slök (24-33%)	24
Startker - hefðbundin meðhöndlun (2005). Afkoma í meðallagi (65-76%)	48
Fóðurdýr (<i>Artemia</i>)	24
Samtals	100

Greining sýna og úrvinnsla var framkvæmt af nemanda við HA og starfsfólki Matís ohf. á rannsóknastofu Matís og HA að Borgum, Akureyri.

2.2. Úrvinnsla sýna

Við sýnatökur er nauðsynlegt að gæta ávallt fyllsta hreinlætis og að allur sýnatökubúnaður sé dauðhreinsaður. Lirfusýni voru tekin í dauðhreinsuð ílát sem fyrst eru fyllt af eldisvökva og sótthreinsaður háfur síðan notaður til að veiða lirfur upp úr kerinu. Lirfum var safnað úr sílóm (kviðpokastig) og startkerjum (frumfóðrun) í seiðaeldisstöð Fiskeyjar hf. og þau flutt strax á rannsóknastofu Matís og HA að Borgum, þar sem úrvinnsla sýna var framkvæmd innan 4 klst. frá sýnatöku. Fjöldi ræktanlegra baktería í lirfum var ákvarðaður með ræktun á næringarætum og frekari rannsóknir síðan framkvæmdar á hreinræktum stofnanna.

2.2.1 Ræktanleg bakteríuflóra

Byrjað var á því að svæfa lirfurnar í yfirskammti af hypnodil (51 µg/mL lokastyrkur efnis) og yfirborð þeirra síðan sótthreinsað (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 (IKA Labortechnik) við 8000 rpm í 4*10 sek með 10 sek hléi á milli. Frekari þynningar voru því næst útbúnar í peptone-sjóvatni og sáð úr þynningum á yfirborð MA (Marine Agar 2216, Difco) og TCBS (Thiosulphate Citrate Bile Sucrose agar, Difco) og skálarnar ræktaðar við 15°C í 5 daga. Að ræktunartímanum loknum var fjöldi ræktanlegra baktería í sýnum ákvarðaður og 12 kólóníur síðan valdar af handahófi af skálum sem innihéldu 100-250 kólóníur og hreinræktir útbúnar með umsáningu á nýjar MA skálar. Þegar sýnilegur vöxtur var kominn á skálarnar (2-5 dagar), voru stofnar 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, vaxtar með og án NaCl (2%) svo og vaxtar með og án Novobiosine (0.2%). Hluti stofna var einnig flokkaður nánar með API 50E staðfestingarprófi þar sem ræktunaraðstæður og ræktunartími voru

aðlagðar stofnum úr umhverfinu (ræktun í 2-3 daga við stofuhita) og að lokum lesið af samkvæmt leiðbeiningum frá framleiðanda.

Ræktanleg flóra var flokkuð í hópa m.t.t. svörunar í mismunandi prófum og hluti stofna úr hverjum hópi síðan tegundagreindir með 16S rRNA hlutaraðgreiningu. Þá er DNA einangrað úr 1/10 þynntum sýnum og notað til þess einangrunarsett (Gentra Tissue kit) þar sem farið var eftir leiðbeiningum frá framleiðanda. Hreinleiki sýnisins var 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 var hluti erfðaefnis magnaður upp með PCR (polymerase chain reaction) þar sem notaðir voru þekktir alhliða vísar (universal primers, F9 og R1544) sem hannaðir eru út frá geni sem rannsóknir sýna að varðveist hefur í erfðamengi baktería (16S rRNA) (Aakra *et al.*, 1999, Bernard *et al.*, 2000). PCR afurðir voru síðan raðgreindir með notkun 805R raðgreiningarvísis (framkvæmt af Matís-Prokaria). Til tegundagreiningar á bakteríum eru niðurstöður raðgreininga bornar saman við þekktar raðir úr BLAST gagnabönkum á netinu (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.2.1 Eiginleikar bakteríustofna

Vaxtarhamlandi áhrif bakteríustofna á vöxt annarra stofna voru rannsakaðir, bæði gegn þekktum sýkingarvaldandi stofnum (*Listonella anguillarum*, *Aeromonas salmonicida salmonicida*) svo og gegn stofnum sem reyndust ríkjandi í meltingarvegi lirfa í kerjum þar sem afkoma og gæði lirfa voru undir meðallagi. Einnig var rannsakaður vöxtur stofnanna við mismunandi umhverfisskilyrði s.s. í blöndu með öðrum stofnum svo og við mismunandi hitastig, seltu og í viðveru efna sem notuð eru í eldinu.

Vaxtarhamlandi áhrif bakteríustofnanna á vöxt annarra bakteríustofna voru rannsökuð með hefðbundnum aðferðum sem allar miðast að því að skoða vöxt prófstofna í návist hugsanlegra bætibakteríustofna. Prófstofnum var þá sáð á agarskálar þar sem bætibakteríustofni hafði verið komið fyrir með mismunandi hætti, þ.e.a.s. í holum í ætinu (fljótandi ræktir), strikað á yfirborð skála eða komið fyrir í þar til gerðum pappaskífum (fljótandi ræktir) sem síðan var komið fyrir á yfirborði skála þar sem prófstofnum hafði verið sáð. Lesið var af skálum þegar bakteríuvöxtur var orðinn greinilegur og

vaxtarhamlandi áhrif ákveðin m.t.t. greinilegra eyða í vexti prófstofna nálægt bætibakteríustofnunum og gefur stærð eyðu til kynna styrkt vaxtarhamlandi áhrifanna.

Holuagar

Notuð var aðlöguð útgáfa af “well-diffusion” aðferð (Chythanya *et al.*, 2002; Vaseeharan and Ramasamy, 2003) þar sem útbúnar voru TSA-sw agarskálar (Tryptic Soy Agar; Difco, leyst í 70% v/v sjóvatni, ~2.5 % lokastyrkur NaCl). Heimasmiðað form var síðan notað til þess að útbúa 5 mm holur sem ná niður í agarinn, u.þ.b. 2 mm frá botni agarsins (Hermannsdóttir 2005). Prófstofnum var síðan sáð á yfirborð skálanna og 25 µl af fljótandi rækt bætibakteríustofa í ýmsum þynningum komið fyrir í holunum. Vaxtarhamlandi áhrif stofna var síðan skráð sem eyða í vexti prófstofna eftir ræktun við 20°C í 24, 72 og 120 klst.

Pappaskífuaðferð

Notuð var breytt útgáfa af pappaskífuaðferð Chythanya *et al.* (2002) þar sem útbúinn var TSA-sw agar eins og áður var lýst og pappaskífum, 6 mm í þvermál (BBL Becton, Dickinson and Company, USA) komið fyrir á yfirborði hans. Prófstofnum var sáð á yfirborð skálanna og í pappaskífurnar settir 20 µl af sterílsíuðu floti frá bætibakteríuræktum og eins og áður voru skoðuð hamlandi áhrif á vöxt prófstofna eftir ræktun við 20°C í 24, 72 og 120 klst.

Yfirstrikunaraðferð

Hreinrækt bætibakteríustofna (24 klst rækt) var strikað í eina línu yfir yfirborð TSA-sw agarskálar og prófstofnum sáð bæði upp að og í gegnum línuna. Vaxtarhamlandi áhrif voru síðan skoðuð eftir ræktun við 20°C í 24, 72 og 120 klst. Einnig voru skoðuð vaxtarhamlandi áhrif bakteríuafurða með aðlagaðri BLIS aðferð (bacteriocin-like inhibitory substance) sem lýst var af Hai *et al.* (2007). Þá var bætibakteríum sáð í eina línu á TSA agar eins og áður og ræktað í 24 klst við 20°C. Ræktirnar voru síðan fjarlægðar með því að skafa þær af yfirborði agarskálanna og þeim síðan hvolft yfir pappír vættum með klóróformi (90%) í 30 mín. Skálarnar voru síðan loftþurrkaðar í 10 mín og prófstofnum strikað þvert yfir eða í gegnum línuna. Hamlandi áhrif

bakteríuafurðanna á vöxt prófstofnanna voru svo skoðuð eftir ræktun við 20°C í 24, 72 og 120 klst.

Eftir rannsóknir á 384 stofnum reyndust 18 stofnar hafa hamlandi áhrif á vöxt annaðhvort þekktra sýkingarvalda og/eða vöxt stofna sem reyndust ríkjandi í meltingarvegi lúðulirfa úr eldiseiningum þar sem afkoma reyndist undir meðalagi. Þessir stofnar voru tegundagreindir með raðgreiningu á 16S rDNA geninu og komu í ljós 6 tegundir baktería sem áhugavert þótti að rannsaka nánar m.t.t. vaxtareiginleika við mismunandi aðstæður. Stofnar voru þá ræktaðir upp í fljótandi TSB æti (Tryptic Soy Broth; Difco, leyst í 70% v/v sjóvatni, ~2.5 % lokastyrkur NaCl) í 24 klst. við 20°C og síðan umsáð í mismunandi blöndum í nýtt æti til að kanna áhrif þeirra á vöxt hvers annars. Ræktir voru hafðar á hristing við 20°C í samtals 120 klst og vöxtur mældur með ljósgleypni við 600 nm á 10 mín fresti í Bioscreen C (OY Growth Curves AB Ltd., Finland). Vöxtur við mismunandi sýrustig, hitastig og saltstyrk ætis var rannsakaður í fljótandi BHI æti sem í var bætt salti í þremur mismunandi styrkleikum (0%, 1% og 2.5%) og þar sem notuð voru þrjú mismunandi sýrustig (pH 6, pH 7 og pH 8).

3. NIÐURSTÖÐUR

Hér verður gerð grein fyrir helstu niðurstöðum leitar að hugsanlegum bætibakteríum í meltingarvegi lúðulirfa á fyrstu stigum eldisins. Einnig er gerð grein fyrir helstu niðurstöðum rannsókna á áhrifum þessara baktería á vöxt annarra bakteríustofna (prófstofna) en þar voru rannsakaðar fjórar tegundir þekktra sýkingarvalda í fiski (*Listonella anguillarum*, *Aeromonas salmonicida salmonicida*) og sömuleiðis ríkjandi bakteríustofnar einangraðir úr lúðulirfum í eldiseiningum þar sem gæði eða afkoma lirfa var undir meðallagi (“neikvæðir” bateríustofnar).

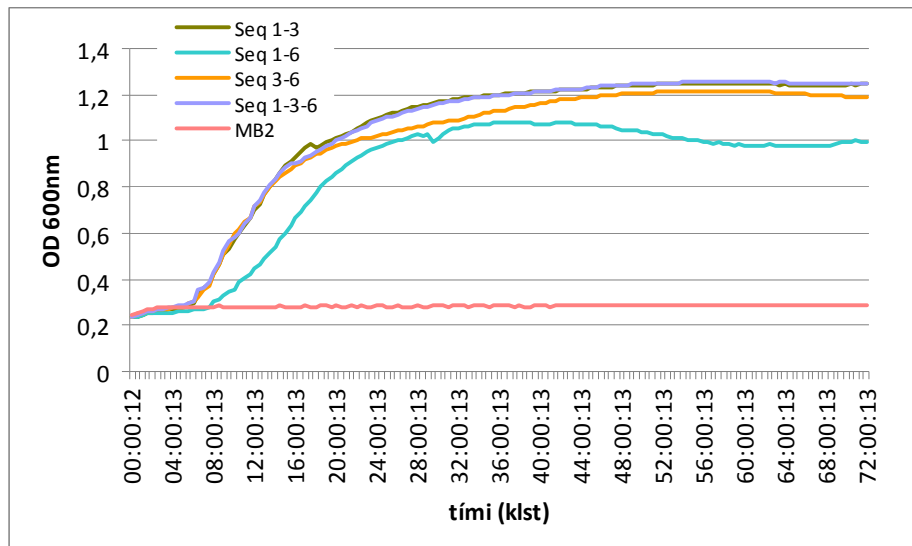
Lirfusýnum var safnað úr öllum eldiseiningum á tveimur mismunandi tímabilum hjá Fiskey hf. á árunum 2005 og 2006, samtals úr 13 sílóum og 23 startkerjum, auk þess sem sýni voru tekin úr seiðum í útflutningsstærð. Við rannsóknir á vaxtarhamlandi áhrifum hugsanlegra bætibakteríustofna á vöxt annarra baktería (prófstofna), reyndust holuagarsaðferð og yfirstrikunaraðferð koma best út.

Með þessum aðferðum fundust 18 bakteríustofnar sem reyndust hafa vaxtarhamlandi áhrif á þekkta sýkingarvaldandi stofna og/eða “neikvæða” bakteríustofna sem einangraðir

höfðu verið úr eldiseiningum Fiskeyjar hf. Af þessum 18 stofnum voru 5 stofnar sem einangraðir höfðu verið úr lirfum í sílóí þar sem meðhöndlað var með REMUS® og þar sem gaparaprósenta var lág. Hinir 13 stofnarnir voru einangraðir úr lirfum í startkeri þar sem meðhöndlað var með hefðbundnum hætti (2006) og þar sem afkoma reyndist sérstaklega góð (94%).

Megin markmið rannsóknarinnar var að leita hugsanlegra bætibakteríustofna sem upprunnir væru úr eldisumhverfi hjá Fiskey hf. og því tekin ákvörðun um að vinna ekki frekar með þá 5 stofna sem einangraðir höfðu verið úr eldiseiningu þar sem meðhöndlað hafði verið með REMUS®. Hinir stofnarnir 13 voru greindir til tegunda með hefðbundnum aðferðum (að meðaltali 10 mismunandi próf) svo og með hlutaraðgreiningu á 16S rRNA. Niðurstöður raðgreiningar leiddu í ljós góða samsvörun við 6 mismunandi bakteríutegundir sem flokkaðar voru sem *Pseudoalteromonas* og *Vibrio* tegundir.

Niðurstöður vaxtartilrauna leiddu í ljós aukinn vöxt þegar þremur mismunandi stofnum var blandað saman (seq 1, 3 og 6) samanborið við vöxt þessara stofna hvers í sínu lagi (Mynd 1).



Mynd 1. Niðurstöður vaxtartilraunar þar sem þrjár bakteríustofnar (Seq 1,3,6) eru ræktaðir í mismunandi blöndum í 72 klst. og ljósgleypni mæld með regluglegu millibili. Heildarfjöldi ræktaðra baktería er ávallt sá sami við upphaf vaxtartímans.

Bakteríustofnarnir þrjú reyndust vaxa best á næringaræti sem innihélt 2% styrk NaCl en enginn þeirra óx án NaCl. Stofnarnir reyndust auk þess vaxa betur við 22°C samanborið

við bæði 42°C og 33°C auk þess sem þeir virtust þola vel glutaraldehyde en það er notað við hefðbundna yfirborðssóttthreinsun hrognna (niðurstöður ekki sýndar).

4. UMRÆÐA OG ÁLYKTANIR

Þessi rannsókn er hluti af stærra verkefni sem miðar að því að auka afkomu og gæði lirfa í startfóðrun og nota til þess umhverfisvænar aðferðir (bætibakteríur). Niðurstöður fyrri rannsókna benda eindregið til þess að tengsl séu á milli afkomu lirfa og samsetningar bakteríuflóru í lirfum og eldisumhverfi þeirra (Björnsdóttir *et al.*, 2003) og því er mikill áhugi fyrir því að kortleggja bakteríuflóru lirfa í mismunandi eldiseiningum þar sem afkoma og gæði lirfa eru afar breytileg. Slíkar rannsóknir eru undirstaða þess að unnt sé að gera tilraunir til að stýra bakteríuflóru eldisins með t.d. bætibakteríum.

Í dag eru á markaðnum nokkrar tegundir af blöndum bætibaktería til notkunar m.a. á fyrstu stigum kaldsjávareldis fiska en óljóst er hver er uppruni þessara baktería eða hvort þær henti yfirleitt sem bætibakteríur á fyrstu stigum lúðueldis. Því er mikill áhugi fyrir því að einangra jákvæðar bakteríur sem eru hluti af náttúrulegri flóru eldisins og leita síðan leiða til þess að auka hlutfall þeirra í eldinu. Markmið þessa hluta rannsóknarinnar var að einangra hugsanlegar bætibakteríur úr eldisumhverfi lúðulirfa á fyrstu stigum eldisins og því var sjónum fyrst og fremst beint að eldiseiningum þar sem afkoma og þroski lirfa voru yfir meðallagi. Líklegt var talið að þar væri að finna bakteríuflóru sem er lirfunum hagstæð.

Bætibakteríur eru lifandi bakteríur sem geta haft hamlandi áhrif á vöxt sýkingarvaldandi örvera auk ýmiskonar jákvæðra áhrifa á einstaklinginn (meltingarflóra, ónæmissvörun o.fl.) (Olafsen 2001; Skjermo og Vadstein 1999; Halami *et al.*, 1999). Í þessari rannsókn voru hugsanlegar bætibakteríur valdar á grundvelli þess að þær væru ríkjandi í eldiseiningum þar sem afkoma, vöxtur og gæði lirfa væru yfir meðallagi. Bætibakteríurnar voru einnig valdar með hliðsjón af vaxtarhamlandi áhrifum á vöxt þekktra sýkingarvalda og/eða ríkjandi bakteríuflóru í meltingarvegi lirfa í eldiseiningum þar sem vöxtur og gæði lirfa reyndust undir meðallagi, svo og ríkjandi flóru í fóðurdýrum en þeim fylgir ávallt mikill fjöldi baktería.

Skoðaðir voru bakteríustofnar sem voru einangraðir úr eldiseiningu þar sem meðhöndlað var með REMUS® og reyndust 5 þeirra hafa hamlandi áhrif á vöxt prófstofnanna sem rannsakaðir voru. Tekin var ákvörðun um að skoða þessa stofna ekki frekar þar sem mestur áhugi er fyrir því í verkefninu að einangra bakteríur sem eru upprunnar úr eldiseiningum seiðaframleiðanda (Fiskey hf.). Helstu niðurstöður leitarinnar voru þær að 6 mismunandi bakteríutegundir fundust sem höfðu hamlandi áhrif á vöxt prófstofnanna og leiddi raðgreining í ljós góða samsvörun við *Vibrio* sp., *Pseudoalteromonas* sp., *Marinomonas* sp. og *Shewanella* sem eru algengar tegundir í fiski og umhverfi þeirra. Stofnar sem heyra til þessara hópa hafa auk þess verið rannsakaðar sem áhugaverðar bætibakteríur í fiskeldi (Gatesoupe, 1999; Makridis *et al.*, 2000a; Paniagua *et al.*, 2001; Wong *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2008). Valdar voru þrjár tegundir, ein *Pseudoalteromonas* og tvær tegundir *Vibrio* baktería, til að setja saman blöndu fyrir tilraunir með bætibakteríumeðhöndlun á fyrstu stigum lúðueldis. Tegundirnar þrjár voru m.a. valdar með hliðsjón af jákvæðum áhrifum þeirra á vöxt hvorrar annarrar. Bakteríurnar voru ræktaðar upp í miklu magni til meðhöndlunar á fyrstu stigum lúðueldis. Meðhöndlað var á hrognastigi eldisins (endurteknar meðhöndlunir) svo og við frumfóðrun lirfa (meðhöndlun í gegnum fóðurdýr lirfa) eða einungis í startfóðrun lirfa.

5. ÞAKKARORD

Tækniþróunarsjóði Rannís er þakkað fyrir rausnarlegt framlag til verkefnisins á árunum 2006-2008. Aðstandendur verkefnisins vilja jafnframt þakka Fiskey hf. fyrir mjög gott samstarf og umfangsmikla aðkomu að skipulagi og framkvæmd verkefnisins. Starfsmönnum Matís-Prokaria er einnig þakkað fyrir samstarfið. Að verkefninu kom einnig sumarnemandi sem styrktur var af Nýsköpunarsjóði námsmanna og Rannsóknasjóði Háskólans á Akureyri og er sjóðunum þakkað framlag þeirra til verkefnisins.

6. HEIMILDIR

- Aakra, A. Utaker, J.B. og 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.
- Bergh, O.E. og O.E. Evensen.** 2002. ICES Council Meeting Documents (ICES CM 2002/R:07)
- Bernard, L. Schafer, H. Joux, F. Courties, C. Muyzer, G. og P. Lebaron.** 2000. Genetic diversity of total, active and culturable marine bacteria in coastal seawater. *Aquatic Microbial Ecology*. 23:1-11.
- Björnsdóttir, R. og H. Smáradóttir.** 2003. Stýring örveruflóru í frumfóðrunarkerjum lúðulirfa (Rannís ver.#010 840 001) Lokaskýrsla. #21-03.
- Chythanya, R., Karunasagar, I., og I. Karunasagar,** 2002. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. *Aquaculture*. 208, 1-10.
- 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.
- 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
- 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.
- Hermannsdóttir, R.** 2005. Áhrif lífvirkra efna á ríkjandi bakteríur í lúðueldi. Lokaverkefni til BS prófs í líftækni á Auðlindasviði við Háskólann á Akueyri, 55 pp.
- Keller, M. and K. Zengler,** 2004. Tapping into microbial diversity. *Nat.Rev Microbiol.* 2: 141.
- Kumar, R., Mukherjee, S.C., Ranjan, R. and S.K. Nayak.** 2008. Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*. *Fish Shellfish Immunol.* 24, 168-172.
- 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 farmed *Haliotis midae* through probiotic treatment. *Aquaculture*. 245: 249-261.
- 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.
- Olafsen, J.A.** 2001. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture*. 200: 223-247.
- 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: 73-76.
- Skjermo, J. and O. Vadstein.** 1999. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture*. 177: 333-343.
- Vaseeharan, B. and Ramasamy, P.** 2003. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Lett. Appl. Microbiol.* 36, 83-87.
- 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.