

Vinnsla og vöruþróun  
Processing and Product  
Development

Líftækni  
Biotechnology



Matvælaöryggi  
Food Safety



# Notkun lífvirkra efna í lúðueldi

Jónína Þ Jóhannsdóttir  
Heiðdís Smáradóttir  
Jennifer Coe  
Rut Hermannsdóttir (MS nemi)  
María Pétursdóttir  
Rannveig Björnsdóttir

Vinnsla og vöruþróun

Skýrsla Matís 51-07  
Desember 2007

ISSN 1670-7192



Titill / Title	<b>Notkun lífvirkra efna í lúðueldi</b>		
Höfundar / Authors	Jónína Þ Jóhannsdóttir, Heiðdís Smáradóttir, Jennifer Coe, Rut Hermannsdóttir (MS nemi), María Pétursdóttir, Rannveig Björnsdóttir		
Skýrsla / Report no.	51-07	Útgáfudagur / Date:	Desember 2007
Verknr. / project no.	1664		
Styrktaraðilar / funding:	Líftækninet HA Háskólasjóður KEA		
Ágríp á íslensku:	<p>Megin markmið verkefnisins var að stuðla að aukinni afkomu lúðulirfa í eldi og nota til þess umhverfisvænar aðferðir. Notuð voru lífvirk efni sem auðvelt var að nálgast, stuðluðu að auknu verðmæti sjávarfangs og hefðu jafnframt einhverja þá virkni sem óskað var eftir þ.e. bakteríudrepani/-hamlandi, prebiotik eða ónæmisörvandi virkni. Gerðar voru tilraunir með ýmis efni í verkefninu þ.e. kítósan afleiður auk peptíða sem unnin voru úr kolmunna, þorski og ufsa. Áhrif meðhöndlunar með efnunum voru metin m.t.t. vaxtar og afkomu lirfa og fóðurdýra svo og m.t.t. samsetningar bakteríuflóru og örvunar ósérhæfðrar ónæmissvörunar í lirlfum.</p> <p>Helstu niðurstöður benda til að hentugasta aðferðin til að koma efnunum í lirlfur er að nota fóðurdýr (<i>Artemia</i>) og var í verkefninu þróað aðferð til að meðhöndla þau. Lífvirku efnin virtust ekki hafa bakteríuhamlandi áhrif í eldisumhverfi fóðurdýranna en stuðla að breyttri samsetningu bakteríuflórunnar. Lífvirk efni virtust fyrst og fremst nýtast sem bætiefni þar sem fóðurdýr voru bústin og spræk. Afkoma og gæði lirfa í eldiseiningum Fiskey hf. er mjög mismunandi og eru engin augljós tengsl á milli afkomu á kviðpokastigi og afkomu og gæða lirfa í lok startfóðrunar. Samsetning bakteríuflóru reyndist einnig mjög mismunandi í kviðpokalirlfum og lirlfum í startfóðrun. Framkvæmdar voru þrjár aðskildar tilraunir í seiðaeldisstöð Fiskeyjar þar sem lirlfur í startfóðrun voru meðhöndlaðar með lífvirkum efnunum. Helstu niðurstöður leiddu í ljós að mikilvægt er að meðhöndla með réttum styrk efna og í hæfilega langan tíma þar sem of mikill styrkur getur haft neikvæð áhrif á vöxt og myndbreytingu lirfa. Meðhöndlun með kolmunnapeptíðum þótti gefa lofandi niðurstöður og hafa góð áhrif á myndbreytingu lirfa. Lífvirk efni virtust ekki hafa afgerandi áhrif á fjölda ræktanlegra baktería í meltingarvegi lirfa en meðhöndlun með kolmunna- og þorskpeptíðum gæti hugsanlega breytt samsetningu flórunnar. Rannsóknir á ósérhæfðri ónæmissvörun lúðulirfa leiddu í ljós tilvist C3 og Lysozyme frá lokum kviðpokastigs en framleiðsla á IgM hefst ekki fyrr en um 28 dögum eftir að startfóðrun hefst. Meira magn IgM mældist á fyrstu vikunum í lirlfum sem meðhöndlaðar voru með ufsapeptíðum og gæti það bent til ónæmisörvandi áhrifa.</p> <p>Niðurstöður verkefnisins í heild sinni benda til þess að þau lífvirku efni sem rannsökuð voru hafi ekki afgerandi áhrif á bakteríuflóru eldisins en meðhöndlun lirfa í startfóðrun með réttum styrk lífvirkra efna gæti haft góð áhrif á afkomu og vöxt lirfa og örvað ósérhæfða ónæmissvörun lirfa á þessu viðkvæma stigi eldisins þegar þær hafa enn ekki þróað sérhæft ónæmissvar.</p> <p><b>Verkefnið var styrkt af Líftæknineti HA (2005-2007) og Háskólasjóði KEA (2006).</b></p>		
Lykilorð á íslensku:	Lúðueldi – fyrstu stig eldisins - afkoma – bakteríuflóra – lífvirk efni – ónæmisörvun – sameindafræðilegar aðferðir (PCR-DGGE)		

*Summary in English:*

The aim of this project was to promote increased survival of halibut larvae during first feeding by using bioactive products. The bioactive products were selected by the criterion that they were easily accessible and induced any of the desired effects i.e. inhibiting bacterial growth, prebiotic effects or immunostimulants. The products studied are chitosan and peptide hydrolysates from blue whiting, cod and saithe. The effects of treatment were evaluated with respect to growth and survival of larvae and the live feed (*Artemia*) as well as effects on bacterial numbers or the community structure of the intestinal microbiota of larvae and stimulation of the innate immune system of the larvae.

The results indicate that treating live feed (*Artemia*) is a suitable method to carry the bioactive products to the larval intestines during first feeding and a new technique has been standardised for treatment of the live feed with the products. The bioactive products did not affect the total bacterial count in the *Artemia* but the composition of the bacterial community may be changed as a result of the treatment. The *Artemia* seems to use the bioactive products as a food supplement and was well suited to be used as live feed. A significant variation in overall success of larvae was observed without any obvious correlation between survival of larvae at the end of the yolk sac stage and at the end of first feeding. A different bacterial pattern was observed in the intestine at the yolk sac stage compared to first feeding larvae. Three separate experiments were carried out in the halibut production units at Fiskey Ltd. where larvae were treated with various bioactive products. The results emphasize the importance of treating larvae with the appropriate concentrations of the products, as elevated concentrations can negatively affect growth and metamorphosis of the larvae. Treatment with peptides from blue whiting resulted in relatively good survival of larvae with similar success of metamorphosis compared to control units. The bioactive products did not effect bacterial growth but there were indications that peptides from blue whiting and cod may affect the composition of the intestinal community of bacteria in the larvae. Results from studies of the immunological parameters indicate the presence of C3 and Lysozyme already from the end of the yolk sac stage and the initialization of IgM production after approximately 28 days in feeding. Production of IgM was stimulated in larvae treated with peptides from saithe, indicating immunostimulating effects of this product.

The overall results indicate that the bioactive products studied did not affect the bacterial flora during the first production stages of halibut larvae. However, if used in the appropriate quantities and at the right time, the products may promote survival and growth and stimulate the innate immunity of larvae.

***The project was supported by the “Líftækninet HA” (2005-2007) and the “Háskólasjóði KEA” (2006).***

*English keywords:*

*Marine aquaculture – production of larvae – survival – bacteria – bioactive compounds – immunostimulation – molecular methods (PCR-DGGE)*

## EFNISYFIRLIT

<b>1. INNGANGUR</b> .....	<b>1</b>
<b>2. AÐFERÐIR OG FRAMKVÆMD.</b> .....	<b>6</b>
<b>2.1. Lífvirk efni</b> .....	<b>6</b>
2.1.1. Framleiðsla lífvirkra efna .....	7
<b>2.2. Uppsetning tilrauna</b> .....	<b>8</b>
2.2.1. Næmi bakteríuflóru gegn lífvirkum efnum – <i>in vitro</i> rannsóknir. ....	9
2.2.2. Kortlagning bakteríuflóru í eldiseiningum lúðueldis .....	10
2.2.3. Meðhöndlun fódurdýra með lífvirkum efnum – <i>in vivo</i> rannsóknir.....	11
2.2.4. Meðhöndlun lirfa með lífvirkum efnum – <i>in vivo</i> rannsóknir.....	14
<b>2.3. Meðferð sýna</b> .....	<b>17</b>
2.3.1. Greining próteina í lífvirkum efnum (Experion).....	18
2.3.2. Ræktun og ákvörðun á fjölda ræktanlegra baktería .....	18
2.3.3. Greining og flokkun á ræktanlegri bakteríuflóru .....	18
2.3.4. Mynstur heildarflóru greint með sameindafræðilegum aðferðum (PCR – DGGE) .....	19
2.3.5. Raðgreining .....	20
2.3.6. Örvun ósérhæðrar ónæmissvörunar lúðulirfa .....	20
<b>3. NIÐURSTÖÐUR</b> .....	<b>22</b>
<b>3.1. Greining próteina í lífvirkum efnum</b> .....	<b>23</b>
<b>3.2. Áhrif lífvirkra efna á fódurdýr</b> .....	<b>24</b>
<b>3.3. Áhrif lífvirkra efna á lúðulirfur</b> .....	<b>25</b>
<b>3.4. Áhrif lífvirkra efna á bakteríuflóru</b> .....	<b>30</b>
<b>3.5. Áhrif lífvirkra efna á ósérhæða ónæmissvörun lúðulirfa</b> .....	<b>39</b>
<b>4. UMRÆÐA OG ÁLYKTANIR</b> .....	<b>45</b>
<b>5. KOSTNAÐUR</b> .....	<b>48</b>
<b>6. ÞAKKARORÐ</b> .....	<b>48</b>
<b>7. HEIMILDIR</b> .....	<b>49</b>

## 1. INNGANGUR

Fyrstu stig fódrunar hafa löngum verið flöskuháls í eldi lúðuseiða sem og annarra tegunda sjávarfiska. Mikil afföll verða jafnan á þessum stigum eldisins og benda fyrri rannsóknir til þess að lífrænt álag (bakteríur) og samsetning bakteríuflóru geti verið stórt vandamál en lítið er vitað um áhrif einstakra bakteríutegunda á þessum stigum. Rannsóknir sýna ennfremur að nauðsynlegt er að hafa stöðugt eftirlit með meðferð og umgengni allri til þess að halda bakteríuálagi undir viðunandi mörkum og má þar sem dæmi nefna fódurdýr lirfa (*Artemía*) sem reynast afar mismunandi að gæðum með tilliti til fjölda og samsetningar bakteríuflóru, klakprósentu, lifunar o.fl. Bakteríuálag sem fylgir fódurdýrum sem lifurnar nærast á fyrstu vikurnar eftir að þær byrja að taka til sín fóður getur þannig orðið lifrunum ofviða ef ekki er leitast við að halda bakteríufjölda í skefjum.

Fiskey hf. hefur á liðnum árum verið stærsti framleiðandi lúðuseiða í heiminum og hafa samstarfsaðilar að þessari rannsókn unnið saman að fjölda verkefna þar sem bakteríuflóra á mismunandi stigum eldisins hefur verið rannsökuð. Marktæk lækkun hefur orðið á lífrænu álagi á fyrstu stigum fódrunar (fjöldi og samsetning ræktanlegrar bakteríuflóru) og meðaltalsafkoma lirfa úr startfóðrun hefur náð auknum stöðugleika og stefnir fyrirtækið á framleiðslu um 1 milljón lúðuseiða árið 2008. Í rannsóknum á þessu sviði var í upphafi lögð megin áhersla á fyrstu stig fódrunar en niðurstöður þessara rannsókna bentu jafnframt til þess að lifur væru afar misjafnar af gæðum þegar í startfóðun kemur. Sérhæfð ónæmissvörun lirfa nær ekki þroska fyrr en um 15-20 dögum eftir að fóðrun með þurrfóðri (weaning) hefst, sem er u.þ.b. 19 vikum eftir klak og þurfa lifurnar því að reiða sig eingöngu á ósérhæfða ónæmissvörun á þessu stigi. Mikill áhugi er því fyrir því að leita leiða til þess að örva ósérhæfða ónæmissvörun svo að lifurnar þoli betur það bakteríuálag sem er fyrir hendi. Heildarmarkmið rannsókna á þessu sviði er að stuðla að aukinni og öruggari framleiðslu lirfa/seiða sjávarfiska af bestu mögulegu gæðum og með því að beita umhverfisvænum aðferðum.

Því er nauðsynlegt að leita leiða til þess að stýra aðstæðum á fyrstu stigum eldis sjávarfiska, með það að markmiði að mynda hagstætt umhverfi með tilliti til bakteríuflóru án þess að meðhöndla þurfi með ýmiskonar efnum í því skyni að halda bakteríuvexti í skefjum. Fyrri rannsóknir benda til að hægt sé að hafa áhrif á samsetningu bakteríuflórunnar með því að bæta hagstæðri flóru í fódurdýr og/eða eldisumhverfi lirfa (verkefnið “Forvarnir í fiskeldi” sem styrkt var af AVS sjóðnum og lauk árið 2006). Önnur möguleg leið og sem jafnframt er umhverfisvæn, er að

meðhöndla með lífvirkum efnum í því markmiði að fækka bakteríum (bakteríuhamlandi/drepanði áhrif), styðja við vöxt æskilegrar flóru á kostnað óæskilegrar (prebiotic áhrif) og/eða efla ónæmissvörun lifra þegar þær hafa enn ekki þróað með sér sérhæfða ónæmissvörun og gera þær þannig hæfari að takast á við það lífræna álag sem fyrir er í eldisumhverfinu (ónæmisörvandi áhrif).

Lirfurnar hafa á þessu stigi ekki þroskað með sér sérhæfða ónæmissvörun og eru því ekki í stakk búnar til að bera sérhæft kennsl á aðskotahluti á borð við bakteríur, en ósérhæfð/meðfædd ónæmissvörun er til staðar og veitir nokkra vernd gegn bakteríum í umhverfi lifranna. Sem dæmi um ósérhæfða ónæmissvörun má nefna ýmiskonar frumugerðir og viðtaka/prótein sem “þekkjja” algengar sameindir á yfirborði baktería s.s. glycoprotein (Medzhitov 2002, Elward 2003). Binding þessara viðtaka/próteina við yfirborð baktería setur í gang ferli sem að lokum leiðir til eyðingar viðkomandi baktería. Til viðbótar við þetta hlutverk, er ósérhæfða ónæmiskerfið nauðsynlegur þáttur í virkjun og þróun sérhæfs ónæmissvars og hefur þetta hlutverk verið mikið rannsakað í spendýrum (Fearon 1997, Lo 1999). Líklegt er talið að svipuð tengsl séu á milli ósérhæfðrar og sérhæfðrar ónæmissvörunar í fiskum (Dixon 2001).

Ósérhæfðri ónæmissvörun má gróflega skipta í náttúrulega (physical), frumubundna (cellular) og vessabundna (humoral) svörun en vessabundin ónæmissvörun byggir á mótefnasameindum sem geta verið bæði frumubundnir og fríir (Magnadóttir 2005). Átfrumur (granulocytes, neutrophils og monocytes/macrophages) svo og ósérhæfðar frumur með frumudrepanði (*cytotoxic*) virkni hafa lykilhlutverki að gegna í ósérhæfðri ónæmissvörun (Evans 2001, Neumann 2001). Aðrar frumugerðir geta einnig haft mikilvægum hlutverkum að gegna og má þar sem dæmi nefna þekjufumur (epithelial) og svokallaðar *dendritic* frumur (Press 1994, Dalmo 1996).

Ónæmisvarnir fiska við náttúrulegar aðstæður eru yfirleitt mjög góðar en þéttleiki (stress) í eldi, mengun og hitabreytingar í náttúrunni eru allt þættir sem geta dregið úr þessum vörnum. Ýmsir þættir ósérhæfðrar ónæmissvörunar hafa verið notaðir sem mælikvarði á áhrif mismunandi umhverfisþátta á ósérhæfða ónæmissvörun fiska og sýna rannsóknir m.a. að stress af völdum t.d. hitabreytinga í umhverfi fisksins hafa neikvæð áhrif á ónæmissvörun fiska. Að sama skapi hafa ónæmisörvandi efni og ýmiskonar íblöndunarefni í fóður jákvæð áhrif á virkni ónæmiskerfisins (Magnadóttir 2005).

Hjá fiskum er IgM náttúrulegt mótefni, framleitt á ýmsum þroskastigum sem ósérhæft mótsvar gegn ýmsum þáttum (Magnadóttir 2006). Það finnst í slímhúð og hefur breiða virkni gegn ýmsum framandi og eigin sameindum s.s. veiru- og snýkjudyraafurðum, eigin kjarnasýrum,

myosini ofl. (Magnadóttir 2006). Hjástoðarkerfið (*complement system*) er kerfi sameinda og leiðir virkjun lykilsameinda (*complement factor 3; C3*) til eyðingar sýkingarvaldandi baktería. C3 er einn af fyrstu liðunum í ósérhæfðri ónæmissvörun auk þess sem C3 tekur þátt í virkjun sérhæfðrar ónæmissvörunar og gegnir þessi sameind því lykilhlutverki í bæði ósérhæfðu og sérhæfðu ónæmissvari (Nakao and Yano, 1998). Borin hafa verið kennsl á C3 sameindina í lúðulirfum (Lange 2004a, Lange 2004b). Lysozyme er hluti af vessabundnum vörnum gegn sýklum, það er bakteríudrepani ensím og hefur greinst í mörgum fisktegundum (Magnadóttir 2006). Það klýfur ákveðin sykrutengi í vegg bæði Gram jákvæðra og Gram neikvæðra baktería en getur einnið virkað sem áthúðunarþáttur og ræst hjástoðkerið og átfrumur. Það fyrirfinnst m.a. í slímhúð, eitilvef og plasma flestra fiska.

Ýmis efni og sameindir hafa verið rannsakaðar með það í huga að örva ónæmissvörun lirfa sjávarfiska. Rannsóknir sýna að svokölluð lektín (sérstök tegund próteina), þekking og bindast ákveðnum kolvetnasameindum sem er að finna á yfirborði baktería og örva með því ósérhæfða ónæmissvörun margra fisktegunda (Boshra 2006). Ýmsar tegundir þörunga hafa einnig sýnt bakteríudrepani eiginleika og hafa slíkar tegundir verið rannsakaðar m.t.t. notkunar í fiskeldi (Kim 2007). Lactoferrin eru járn-bindandi prótein úr mjólk og hafa rannsóknir sýnt að þessi prótein búa yfir bæði örverudrepani og andoxunar eiginleikum, auk þess sem þau hafa sýnt sig að örva ósérhæfða ónæmissvörun í ýmsum tegundum fiska (Makridis 2000). Glúkana (*glucans*) er að finna m.a. í sveppum, geri og alls kyns kornvörum og hafa rannsóknir sýnt að þessi efnasambönd hafa vírus-, bakteríu- og snýkudýradrepani áhrif í fiskum. Í mönnum eru glúkanar taldir styrkja ónæmissvörun og veita vörn gegn bæði krabbameini og of háu kólesterólmagni í blóði (Couso 2003). Ýmsar afurðir unnar úr kítíni (kítosan) hafa einnig örverudrepani eiginleika og aðrar gerðir stuðla að hraðari endurnýjun skaddaðra vefja. Sumar gerðir kítósans hafa jafnframt sýnt örvandi áhrif á ósérhæfða ónæmissvörun margra tegunda og þ.m.t. fiska. Slíkt hið sama er að segja um ýmis lífvirk peptíð/sameindir sem unnin hafa verið úr sjávarfangi og talið er að prótein úr fiski geti einnig haft ýmiskonar lífvirkni til að bera. Auðvelt er að koma litlum peptíðum í fóður og auk þess að vera næringarrík, geta þau jafnframt verkað bakteríuhamlandi/-drepani með því að rjúfa himnur baktería (Olafsen 2001).

Niðurstöður rannsókna í samstarfi þátttakenda að verkefninu benda eindregið til þess að minna bakteríuálag í eldinu (sér í lagi í fóðurdýrum lirfa) leiði til aukins stöðugleika í framleiðslunni. Með auknum stöðugleika má vænta aukinnar afkomu svo og gæða í framleiðslunni. Mikilvægi



Þess að auka afkomu lúðulirfa í eldi er ótvírætt. Lúða er í sérstökum verðflokki sem hágæðaafurð og hvert seiði því afar dýrmætt. Framleiðslukostnaður hjá Fiskey hf. er í dag um 250 ísl. kr á lúðuseiði, sem gengið hefur í gegnum myndbreytingu og þolir flutning. Stór hluti þess kostnaðar liggur í startfóðrun lirfanna, þ.e. tímabilinu frá því næring kviðpoka er uppurin og þar til hægt er að fódra lirfurnar á þurrfóðri. Það er samdóma álit þeirra er standa að eldi sjávartegunda fiska, að örveruflóra og vandamál tengd örverufræðilegu álagi á fyrstu stigum eldisins sé eitt af helstu áhersluatriðum sem rannsaka þurfi og ráða bót á. Þegar lagt var upp með verkefnið, voru bundnar vonir við að meðhöndlun með þeim lífvirku afurðum sem fyrir valinu urðu, gæti leitt til fækkunar baktería, breyttrar samsetningar bakteríuflóru og/eða örvunar ósérhæfðrar ónæmissvörunar lúðulirfa á þessu stigi eldisins

Við val á lífvirkum efnum var ákveðið að horfa til eftirfarandi þátta:

- a) efni með þekkt virkni og sem leitað er eftir (kítósan)
- b) efni unnin úr fiski og sem nýlegar rannsóknir benda til að hafi ýmiskonar lífvirkni (peptíð hydrolýsöt úr fiski).

Rannsóknir hafa sýnt að hægt er að vinna úr fiski prótein með mikla lífvirkni (Kristinsson 2000). Um byltingu er að ræða ef unnt reynist að vinna úr vannýttu hráefni, lífvirkar afurðir sem nýta má til að auka vöxt og afkomu lirfa sjávarfiska á fyrstu stigum eldisins. Ef vel tækist til væri margt sem fengist:

- aukið verðmæti sjávarfangs í bættri framleiðsla sem og nýtingu vannýtts hráefnis
- minni efnanotkunar yrði þörf í eldinu ef unnt væri með þessum leiðum að minnka bakteríuálag í eldinu
- efling almennrar ónæmissvörunar lirfa sem gefur öflugri vörn gegn sýkingum almennt.

Í samantekt gæti meðhöndlun með lífvirkri afurði því leitt til lækkunar framleiðslukostnaðar og um leið umhverfisvænni framleiðslu.

Eins og áður segir er þekkt að ýmsar tegundir lífvirkra afurða hafa bakteríudrepandi/-hamlandi virkni, en fram til þessa hefur ekki verið hægt að yfirfæra þá lífvirkni til hagnýtingar í fiskeldi.

Markmið verkefnisins í heild sinni var að rannsaka möguleika á að bæta lifun og gæði lúðulirfa í startfóðrun með notkun lífvirkra efna. Ýmis lífvirk efni voru rannsökuð í þessu markmiði s.s.

valdar kítósan-afurðir svo og peptíð hydrolysöt unnin úr þorski, kolmunna og ufsa. Undirmarkmið verkefnisins voru eftirfarandi:

- að kanna lífvirkni valinna efna sem nýst gætu á fyrstu stigum fiskeldis. Meðhöndlað var með efnunum á mismunandi stigum eldisins (*in vivo*) og rannsökuð áhrif meðhöndlunar á fjölda og samsetningu bakteríuflóru í meltingarvegi lúðulirfa. Ennig var rannsakað næmi ríkjandi bakteríustofna úr eldinu gegn lífvirku efnunum (*in vitro*).
- að meðhöndla með lífvirkum efnum í því markmiði að auka afkomu og gæði lúðulirfa. Lögð var megináhersla á að rannsaka með hvaða leiðum best væri að meðhöndla lirfur (í gegnum eldisumhverfi þeirra eða fóðurdýr) auk þess sem áhrif lífvirkra efna á gæði og lifun fóðurdýra voru rannsökuð. Byggt verður áfram á þessari þekkingu í nýju verkefni: “Lífvirk efni við lirfueldi lúðu og þorsks” sem styrkt hefur verið af AVS sjóðnum (2007-2008)
- að leitast við að skapa nýja þekkingu um áhrif lífvirkra efna á ósérhæfða ónæmissvörun lúðulirfa.

Verkefnið var unnið í framhaldi af verkefnunum “Forvarnir í Fiskeldi” (styrkt af AVS sjóðnum 2004-2007), “Oppdrett av marine larver” (styrkt af Nora 2004-2006), “Stýring örveruflóru í startfóðurkerjum lúðulirfa” (styrkt af Tækniþróunarsjóði Rannís 2001-2003) og í tengslum við verkefnið “Vinnsla kolmunna í verðmætar afurðir” (styrkt af AVS 2004-2005) og “ProPephealth” sem er hluti af SeafoodPlus verkefni sem Matís er þátttakandi að (styrkt af Evrópusambandinu 2004-2008). Hluti verkefnisins var í höndum Rutar Hermannsdóttur sem er nemandi í rannsóknatengdu meistaranámi við Viðskipta- og Raunvísindadeild Háskólans á Akureyri. Áætluð námslok nemanda eru í maí 2008. Hluti niðurstaðna verður einnig til umfjöllunar í doktorsritgerð Rannveigar Björnsdóttur við Háskóla Íslands þar sem áætluð námslok er árið 2008.

## 2. AÐFERÐIR OG FRAMKVÆMD

### 2.1. Lífvirk efni

Í verkefninu var sjónum einkum beint að notkun lífvirkra efna sem auðvelt er að nálgast og sem geta aukið verðmæti sjávarfangs. Lífvirku efnin sem fyrir valinu urðu voru kítósan og peptíðhydrolysöt unnin úr þorski, kolmunna og ufsa. Auk þess var aðferðum við vinnslu peptíðhydrolysata úr fiski beitt til þess að vinna samskonar afurðir úr afskurði við vinnslu á þorski.

Sú krafa var gerð til lífvirku afurðanna að þær væru auðveldar í notkun í eldinu og hefðu einhverja þá virkni sem óskað er eftir, þ.e.:

- Bakteríudrepani/-hamlandi virkni – þ.e. sem leiðir til fækkunar baktería í fóðurdýrum og/eða eldisumhverfi lirfa.
- Prebiotik virkni – þ.e. styður við vöxt ”æskilegrar” bakteríuflóru í fóðurdýrum/lúðulirfum á kostnað óæskilegrar flóru. Áhrif metin m.t.t. vaxtar og afkomu lirfa svo og samsetningar bakteríuflóru.
- Ónæmisörvandi virkni - örvar ónæmissvörun lirfanna og eflir þannig varnir þeirra gegn sýkingum af völdum annarra örvera. Áhrif metin með hliðsjón af örvun valinna þátta ósérhæfðrar ónæmissvörunar lúðulirfa (IgM ónæmisglóbúlín, C3).

Lífvirku efnin voru fengin fullunnin frá framleiðendum að undanskildum lífvirkum afurðum sem unnin voru úr afskurði við vinnslu á þorski en þessi afurð lífvirkra efna var framleidd í verkefninu með sömu aðferðum og notaðar voru við framleiðslu peptíðhydrolysata úr kolmunna og ufsa (verkefnið “Kolmunni sem markfæði”).

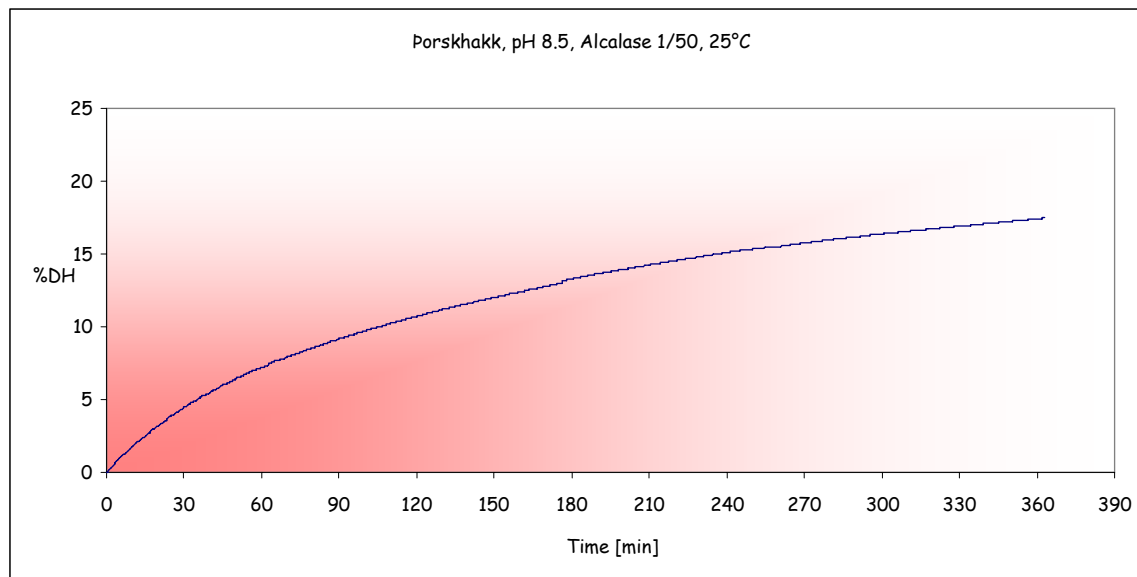
Lífvirku afurðirnar sem notaðar voru hafa ekki áður verið notaðar í fiskeldi og því ekki þekkt hvaða skammtastærðir hentuðu eða hversu oft nauðsynlegt væri að meðhöndla. Því var byrjað á að rannsaka hvaða aðferðir hentuðu best til að koma efnunum í lirfurnar, skammtastærðir og tíðni meðhöndlunar.

### 2.1.1. Framleiðsla lífvirkra efna

Kítósan fáskykra var fengin frá Genís hf. og er það afurð sem er mikið unnin og hefur þekkta lífvirkni í mönnum s.s. ónæmisörvandi áhrif og var því áhugavert að kanna hvort sömu áhrif fengjust á fyrstu stigum lúðueldis. Afurðin frásogast auðveldlega og er tiltölulega stöðug í blóðrásinni en það gefur möguleika á langtímaáhrifum eftir meðhöndlun (munnleg heimild: Jóhannes í Genís). Kolmunnapeptíð er fengið frá öðru verkefni innan MATÍS (SEAFOODplus European Integrated Programme). Við framleiðsluna var basi er notaður til að brjóta niður próteinin í lítil peptíð (Picot 2006). Afurðin var framleidd árið 2004 og fór í gegnum mikið hreinsunarferli. Lífvirkni afurðarinnar var mikið rannsökuð og bentu niðurstöður m.a. til verndandi áhrifa gegn krabbameini þar sem afurðir heftu fjölgun brjóstakrabbameinsfruma (Picot 2006). Ufsapeptíð var framleitt með sömu aðferðum og sérstaklega framleitt fyrir verkefnið af Iceprotein hf. á Sauðárkróki. Um er að ræða mjög hreina afurð sem inniheldur hátt magn próteina (98%).

Við framleiðslu lífvirkra peptíð úr þorskafskurði var notuð aðferð sem byggir á notkun ensíma sem kljúfa niður prótein með vatnsrofi við basískar aðstæður (*hydrolysis*). Hráefnið var fengið frá Brim og var notaður þorskvöðvi svo og ýmsar aukaafurðir úr þorskvinnslu, ss. augu, milta, beingarðar og afskurður. Þróun aðferðar til framleiðslu lífvirkra próteina/peptíða með vatnsrofi var í höndum doktorsnema á Matís, Margrétar Geirsdóttur.

Ensím sem brjóta niður prótein (*proteinases*) eru notuð til að kljúfa peptíðtengi próteina í hráefninu og mynda með því minni einingar, peptíð. Hér var notað ensímið Alcalase 4.1. Fiskurinn er hakkaður smátt, blandað við vatn í ákveðnum hlutföllum og lausnin gerð einsleit. Sýrustig lausnarinnar er síðan stillt á pH 8.5 sem er kjörsýrustig ensímsins. Eftir því sem hvarfið gengur lengra, eru fleiri tengi rofin og smærri peptíðeiningar myndast. Til þess að fylgjast með ferli ensímniðurbrotsins er sýrustigi haldið stöðugu með viðbættum basa og út frá magni basa sem þarf til þess er hægt að reikna svonefnt “Degree of hydrolysis” (%DH) eða hversu mörg tengi hafa rofnað í hvarfinu (sjá mynd 1).



Mynd 1. Ferill ensímiðurbrots. Fylgst með “Degree of hydrolysis” (%DH) sem fall af tíma.

Að vatnsrofi loknu er ensímvirkni stöðvuð með snöggru hitun og óleyst efni, bein, fita og önnur óhreinindi síðan skilin frá vatnsfasanum. Að lokum er vökvinn frystur og síðan frostþurrkaður. Próteinstyrkur vökvans fyrir frostþurrkun, var mældur með Biuret aðferð (Beyer 1983) sem byggir á myndun litakomplex kopars og próteina í lausninni. Styrkur litar er mældur með ljósgleypnimæli og heildarstyrkur próteina fenginn með samanburði við staðallausn með þekktum próteinstyrk. Frekari lýsing á aðferðinni má finna í ársskýrslu verkefnisins fyrir fyrra verkefnisár (Rf skýrsla #12-06).

## 2.2. Uppsetning tilrauna

Tilraunir voru að hluta til framkvæmdar á rannsóknastofu Matís (*in vitro* rannsóknir) og að hluta til í seiðaeldisstöð Fiskeyjar hf. á Hjalteyri (*in vivo* rannsóknir). Rannsóknir í eldinu voru framkvæmdar í framleiðslueiningum fóðurdýra og lirfa.

Á rannsóknastofunni voru rannsakaðir eiginleikar lífvirku efnanna m.t.t. vaxtarhamlandi áhrifa á þekhta sýkingarvaldandi bakteríustofna svo og ríkjandi bakteríur úr meltingarvegi lúðulirfa. *In vitro* rannsóknir voru framkvæmdar í sameiginlegu rannsóknarrými Matís, Matvælaaseturs HA og Háskólans á Akureyri að Borgum og framkvæmdar af starfsmönnum Matís svo og nemenda í rannsóknatengdu meistaranámi við HA.

Við tilraunir í eldinu var byggt á aðferðum sem þróaðar hafa verið af starfsmönnum Fiskeyjar og notaðar hafa verið til framleiðslu á seiðum til margra ára. Taka ber fram að tilraunir í eldinu miðast við að vel gangi og ávallt sé lágmarks áhætta tekin varðandi framleiðslu lúðuseiða hjá Fiskey hf.

### **2.2.1. Næmi bakteríuflóru gegn lífvirkum efnum – *in vitro* rannsóknir.**

Framkvæmdar voru grunnrannsóknir á áhrifum lífvirku efnanna áður en farið var að rannsaka áhrif þeirra í eldinu. Bakteríudrepani/hamlandi áhrif er lífvirkni sem m.a. var leitað eftir, þ.e. efni sem hafa hamlandi áhrif á vöxt baktería í eldinu.

Rannsókuð voru vaxtarhamlandi áhrif kítósans, fimm mismunandi afurða þorskpeptíða (hydrolysa á vöðva, augum, milta, marningi og aukaafðurðum), kolmunnapeptíða og ufsapeptíða. Efnin voru rannsökuð í mismunandi styrkleika (1:1, 1:2, 1:10, 1:100, 1:1000) auk þess sem rannsakað var hvort efnin héldu lífvirkni sinni eftir gerildehyðingu í autoclave (121°C undir þrýstingi). Leitað er eftir hamlandi áhrifum á vöxt ákveðinna baktería (úr eldinu) en hráefninu fylgir allmikið magn baktería sem lífvirknin nær ekki yfir en ljóst að ekki er æskilegt að auka enn á lífrænt álag í eldisumhverfi lirfa með því að bæta út í það miklum fjölda baktería.

Bakteríuhamlandi áhrif lífvirkra efna voru rannsökuð á þann hátt að valdir stofnar baktería voru ræktaðir upp á næringaragarskálum í viðveru lífvirkra efna af mismunandi styrk. Þeir stofnar sem unnið var með voru annarsvegar þekktir sýkingarvaldandi stofnar sem finnast í sjó og sjávarfangi (*Vibrio fluvialis*, *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida achromogenes* og *Aeromonas salmonicida*) og hinsvegar stofnar sem reyndust ríkjandi í fóðurdýrum og lirfum í lúðueldi Fiskey. Mismunandi aðferðir voru notaðar við rannsóknir á bakteríuhamlandi áhrifum efnanna (pappaskífuaðferð og holuagarsaðferð). Í báðum tilfellum er nauðsynlegt að vinna með nýjar bakteríuræktir og vinna allt sterílt. Fyrir nákvæmari lýsingu á aðferðum er vísað í ársskýrslu fyrir fyrra verkefnisár (Rf skýrsla 12-06).

Pappaskífuaðferð er þekkt aðferð sem notuð er til þess að meta áhrif ýmissa efna á vöxt bakteríustofna. Notað var almennt næringaræti, TSA (Tryptic Soy Agar; Difco) sem leyst var upp í 70% af gömlu sjóvatni (*aged seawater*). Bakteríustofnum var síðan sáð yfir allt yfirborð agarsins (bómullarpinni vættur í bakteríurækt). Frostþurrkað duft af lífvirku efnunum var leyst upp í peptone sjóvatni í ákveðnum styrk og 10µl af lausninni sett á pappadiska sem komið var

fyrir á yfirborði skálanna. Skálarnar eru ræktaðar við herbergishita þar til þétt rækt hefur myndast (um viku) en við aflestur er metið hvort eyða hafi myndast í kringum pappadiska.

Holuagar er fljótleg og auðveld aðferð sem byggist á pappaskífuaðferð. Ákveðið var að reyna þessa aðferð þegar í ljós kom að erfitt reyndist að meta áhrif lífvirku efnanna í háum styrk þar sem einungis lítið magn efna kemst fyrir á litlum pappaskífum. Aðferðin var hönnuð af nemanda í rannsóknatengdu B.Sc. námi við HA (Rf skýrsla 12-06). Notað var TSA sem leyst var í 70% sjóvatni og holur síðan útbúnar með sérstöku áhaldi eftir að æti var hellt á skálarnar. Eftir sáningu bakteríustofna á yfirborð agarsins (bómullarpinni) var 100 µl af mismunandi styrk lausna lífvirkra efna bætt í holurnar og skálarnar síðan ræktaðar við herbergishita þangað til greinilegur þéttur vöxtur var sýnilegur. Við aflestur er metið hvort eyða hefði myndast í kringum holur.

### **2.2.2. Kortlagning bakteríuflóru í eldiseiningum lúðueldis**

Rannsóknir sýna að bakteríuflóra í meltingarvegi lirfa getur haft afgerandi áhrif á vöxt, þroska og lifun lirfa á fyrstu stigum eldis sjávarfiska og ýmsar leiðir hafa verið reyndar til þess að hafa áhrif á eða stýra bakteríuflóru á þessum stigum eldisins. Grundvöllur slíkra rannsókna er að kortleggja þá bakteríuflóru sem fyrir er og þær breytingar sem verða á henni. Í rannsóknum samstarfsaðila að verkefninu hafa verið gerðar endurteknar tilraunir til þess að afla upplýsinga um hvaða samsetning flóru sé lifrunum hagstæð og/eða óhagstæð á mismunandi stigum eldisins. Þetta hefur ekki reynst mögulegt með því að horfa einvörðungu á ræktanlegan hluta flórunnar, enda gefa heimildir um efnið til kynna að einungis lítill hluti umhverfisflóru á köldum svæðum reynist ræktanlegur. Af þessum sökum var talið mikilvægt að styðjast jafnframt við aðferðir sem gefa hugmynd um samsetningu heildarflóru eldisins (sameindafræðilegar aðferðir). Báðar þessar aðferðir voru notaðar til þess að kortleggja heildarflóru baktería sem er til staðar í meltingarvegi lirfa á fyrstu stigum eldisins og skoða tengsl við afkomu og gæði lirfa við lok startfóðrunar.

Í þessari rannsókn var með sýnatökum fylgt eftir öllum eldiseiningum sem komu í seiðaeldisstöð Fiskeyjar á einu tímabili (ágúst – október 2006), þ.e. allt frá kviðpokastigi til loka startfóðrunar. Sýnum var safnað úr samtals 9 sílóum (kviðpokalirfur) og 14 startkerum. Meðhöndlað var með hefðbundum hætti í öllum einingum og sýni tekin í lok kviðpokastigs, þ.e. við flutning í startker, svo og þrisvar sinnum yfir tímabilið úr hverju startkeri. Sýnum var einnig safnað af fóðurdýrum

sem gefin voru á sýnatökudögum. Samtals var safnað 51 sýni úr eldiseiningum (9 úr sílóum og 3-sinum úr 14 startkerjum) auk 16 sýna af fôðurdýrum á tímabilinu.

Fjöldi ræktanlegra baktería var ákvarðaður með ræktun á MA (Marine Agar; Difco) og TCBS (Thiosulphate Citrate Bile Sucrose agar, Difco). Heildarflóra baktería var greind með sameindafræðilegum aðferðum (PCR-DGGE). Hluti sýna af ræktanlegri flóru var jafnframt flokkaður flokkuð til ætta og ættkvísla mtt. lífefnafræðilegra eiginleika og síðan tegundagreindir með 16S rDNA hlutaraðgreiningu (framkvæmt af Prokaria).

Í lok startfôðrunartímabils var kominn í ljós árangur úr einstökum eldiseiningum m.t.t. afkomu, myndbreytingar og gæða lirfa. Í framhaldi af því var samsetning bakteríuflórunnar skoðuð með hliðsjón af útkomu úr einstaka kerri.

### **2.2.3. Meðhöndlun fôðurdýra með lífvirkum efnum – *in vivo* rannsóknir**

Megin tilgangur þessara tilrauna var að þróa og staðla aðferðir við meðhöndlun fôðurdýra (*Artemia*) með lífvirkum efnum, með það að markmiði að nota þau til að bera efnin í lúðulirfur í startfôðrun. Tilgangur þessara tilrauna var einnig að kortleggja bakteríuflóru fôðurdýra á ræktunartímanum og rannsaka áhrif lífvirkra efna á fjölda baktería og samsetningu bakteríuflóru fôðurdýranna. Sé mögulegt að meðhöndla lirfurnar með lífvirkum efnum í gegnum fôðurdýr, einfaldar það mjög meðhöndlun lirfanna og eykur auk þess öryggi við meðhöndlun, þar sem talsverð áhætta getur verið í því fólgin að bæta út í eldisumhverfi liranna efnum sem stuðlað gætu að auknum vexti baktería (lítil peptíð eru ákjósanleg næring fyrir bakteríur).

Byrjað var á að staðla aðferðir við meðhöndlun fôðurdýra m.t.t. styrks efna svo og tíðni og tímasetningu meðhöndlunar. Þetta var talið afar mikilvægt m.t.t. tilrauna í framhaldinu þar sem rannsökuð voru áhrif lífvirkra efna á afkomu og vöxt lúðulirfa. Með hliðsjón af því að nota ætti fôðurdýr lirfa til þess að koma lífvirku efnunum í lirfur, var jafnframt mikilvægt að velja þau efni sem gæfu bestu fôðurdýrin m.t.t. afkomu og bakteríuflóru. Gerðar voru endurteknar tilraunir á meðhöndlun fôðurdýra með kítósan og hydrolysati af þorski, kolmunna og ufsa í mismunandi styrk efna svo og val á tíma við meðhöndlun. Yfirlit yfir tilraunauppsetningar í fôðurdýraræktunum má sjá í töflu 1.



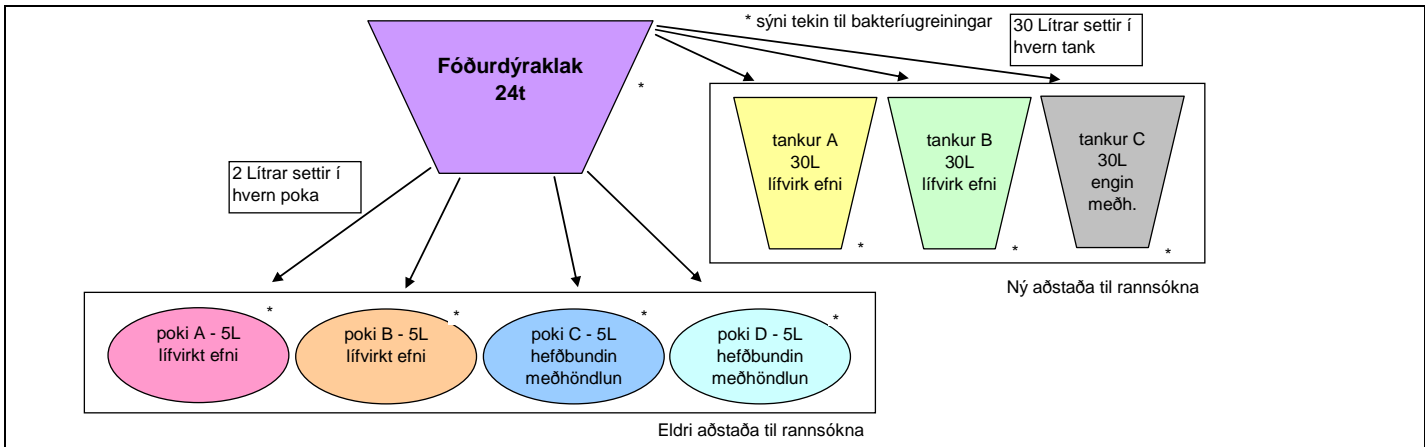
**Tafla 1. Yfirlit yfir meðhöndlun fóðurdýra, lífvirk efni, styrkur meðhöndlunar og hvernig efnum var komið í fóðurdýr.**

Lífvirk efni	Styrkur meðhöndlunar (%)						Tegund meðhöndlunar
	0,005	0,01	0,05	0,1	0,15		
Kítósan	0,005	0,01	0,05	0,1	0,15		Leyst í sjó / Fitublanda
Kolmunnapeptíð	0,025	0,05	0,1	0,2			Leyst í sjó / Fitublanda
Þorskpeptíð	0,01	0,025	0,03	0,05	0,1	0,2	Leyst í sjó
Þorskur + Kolmunni	0,1						Leyst í sjó
Ufsapeptíð	0,05	0,1	0,2				Leyst í sjó / Fitublanda

Tilraunir voru framkvæmdar í fóðurdýraræktun Fiskey hf. að Hjalteyri og var uppsetning tilrauna alfarið í höndum starfsmanna Fiskey sem einnig sáu um að taka sýni til bakteríuræktunar og að meta lifun og gæði fóðurdýra á meðan á tilraunum stóð.

Fiskey kaupir hrogn frá Aquafauna-BioMarine, klekur þeim, auðgar með næringarefnum og notar síðan sem startfóður fyrir lúðulirfur. Til að auka hreinlæti í eldinu eru fóðurdýrin afskurnuð fyrir klak í fersku léttisöltu vatni með klórlausn og síðan eru þau klakin við 25-30°C með súrefnismagni ekki undir 2 mg/L, seltu um 34,5 prómil, sýrustigi á bilinu pH 7,8-8,2 og stöðugri lýsingu (2000 lux) og tekur klakið þá um 24 klst. Eftir klak eru fóðurdýr sett í stóran dall þar sem fjöldi þeirra er stilltur af og best er að hafa um 300 þús fóðurdýr/ml. Fóðurdýrin eru auðguð með sérstakri fitublöndu í 24 eða 32 klst. og í framhaldi af því skoluð og loks gefin í startfóðurker.

Tilraunir á fóðurdýrum voru framkvæmdar í litlum tilraunaeyningum en stuðst var við hefðbundnar ræktunaraðferðir sem þróaðar hafa verið af starfsmönnum Fiskey hf. og reynt að hafa allar aðstæður sem líkastar þeim aðstæðum sem notaðar eru í eldinu. Í fyrri hluta tilrauna var meðhöndlað í tilraunapokum sem taka 5L af fóðurdýrum. Hægt var að meðhöndla í nokkrum pokum hverju sinni, þannig að unnt var að tvítaka tilraunir og keyra ómeðhöndluð fóðurdýr samhliða. Á tímabilinu var sett upp ný aðstaða í fóðurdýraræktun Fiskey sem auðveldar allar rannsóknir á meðhöndlun fóðurdýranna. Í þessari nýju aðstöðu voru settir upp 3 stórir stáltankar sem a.m.k 30L af fóðurdýrum og eru aðstæður því mun líkari hefðbundnum aðstæðum í fóðurdýraræktun og eykur það áreiðanleika niðurstaðna. Mynd 2 sýnir dæmi um uppsetningu tilrauna í fóðurdýraræktun í upphaflegri og nýrri aðstöðu Fiskeyjar.



Mynd 2. Dæmi um uppsetningu tilrauna. Fóðurdráklakur er tekinn úr 24t auðgunardalli og komið fyrir í litlum tilraunaeinungum. Í eldri aðstöðu voru pokar sem tóku 5L af fóðurdráklaki en í nýrri aðstöðu eru 3 stáltankar sem taka a.m.k. 30L af fóðurdráklaki. Meðhöndlað er með lífvirkum efnum sem ýmist er bætt í eldisvökva dýranna eða í fitublöndu sem notuð er til auðgunar fóðurdráklaks. Alltaf voru hafðar einingar til viðmiðunar þar sem meðhöndlað var á hefðbundinn hátt.

Gerðar voru tilraunir til að meðhöndla fóðurdráklakinn með lífvirkum efnum ýmist leystum upp í sjóvatni og síðan bætt út í ræktun fóðurdráklaks við lok ræktunartímans (efnin eru vatnsleysanleg og leysast því auðveldlega upp í sjó), eða að efnunum var blandað í fitublöndu sem notuð er til að auðga fóðurdráklakinn (auðgað með fitublöndu síðustu 24 klst. ræktunartímans). Við blöndun efna í fitublönduna þarf mun minna magn efna samanborið við þegar efnunum er bætt út í eldisvökva fóðurdráklaks. Þessi aðferð er jafnframt talin ákjósanlegri m.t.t. lífræns álags í eldisumhverfi fóðurdráklaks.

Meðhöndlað var með einu efni í einu (kítósan, þorskpeptíð, kolmunnapeptíð eða ufsapeptíð) auk þess sem rannsókuð voru samlegðaráhrif við meðhöndlun með kolmunnapeptíðum samhliða þorskpeptíðum. Rannsókuð voru áhrif meðhöndlunar með lífvirkum efnum í mismunandi styrk og í mismunandi langan tíma (30 mín, 60 mín, 120 mín eða 24 klst). Sýni voru tekin eftir 24 klukkutíma ræktun en einnig voru tekin sýni til rannsókna á bakteríum í fitublöndu sem lífvirkum efnum hafði verið bætt í. Þetta var gert til þess að fylgjast með áhrifum geymslu á bakteríuflóru blöndunnar.

Til að fá sem marktækastar niðurstöður voru gerðar endurteknar tilraunir þar sem meðhöndlað var í nokkrum einungum í hvert skipti og ávallt voru hafðar til samanburðar einingar fóðurdráklaks þar sem meðhöndlað var á hefðbundinn hátt auk þess sem stundum voru hafðar samanburðareiningar þar sem ekkert var meðhöndlað.

Áhrif meðhöndlunar voru metin m.t.t. fjölda ræktanlegra baktería og samsetningu bakteríuflóru. Í lok ræktunartímans var auk þess metin lifun fóðurdýra, litur og almennt útlit skoðað og metið hvort unnt væri að nota fóðurdýrin til fóðrunar lirfa. Fyrir nánari lýsingu á framkvæmd tilraunanna er vísað í ársskýrslu verkefnisins fyrir fyrra verkefnisár (Rf skýrsla #12-06).

#### **2.2.4. Meðhöndlun lirfa með lífvirkum efnum – *in vivo* rannsóknir**

Meginmarkmið þessara tilrauna var að kanna áhrif lífvirkra efna á afkomu, vöxt og gæði lirfa í startfórðun. Áhrif meðhöndlunar voru einnig metin m.t.t. fjölda og samsetningar bakteríu flóru í meltingarvegi lirfa svo og m.t.t. valinna þátta í ósérhæfðri ónæmissvörun lirfa (C3, IgM og lysozyme).

Samtals hafa verið framkvæmdar þrjár aðskildar tilraunir þar sem meðhöndlað var með:

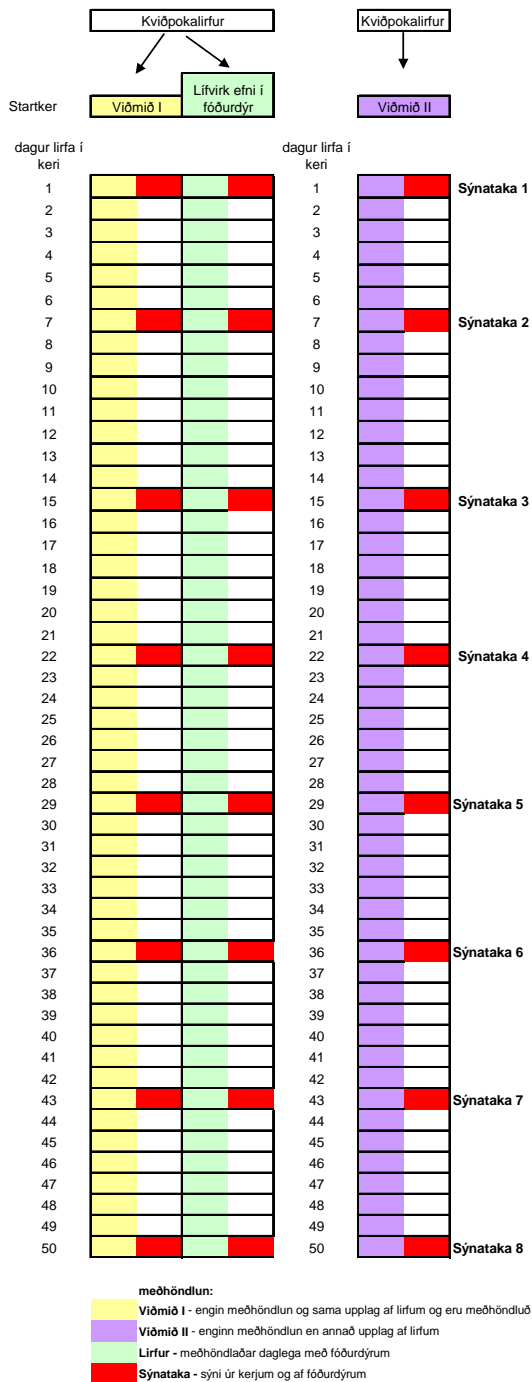
- 1) hydrolysati úr þorski og kolmunna
- 2) kítósan
- 3) hydrolysati úr ufsa.

Uppsetning tilrauna, meðhöndlun og sýnataka var í höndum starfsmanna Fiskey hf. sem einnig sáu um skráningu affalla, mat á vexti og afkomu lirfa svo og á hlutfalli vanskapaðra lirfa. Úrvinnsla sýna fór fram á rannsóknastofu Matís að Borgum.

Tilraunir voru settar upp með hliðsjón af hefðbundnu eldisferli Fiskey hf. Hrogn eru höfð í hrognakerjum í um 14 daga og síðan safnað úr 5-8 kerjum í eitt síló þar sem kviðpokalirfur lifa á innihaldi kviðpokans næstu u.þ.b. 55 dagana. Þegar startfóðrun hefst er lirlfum úr hverju síló skipt í 1-2 startker (jafnvel 3 ef afkoma úr sílóum mjög góð) og er þá byrjað að fódra með fóðurdýrum (*Artemia*) frá fyrsta degi og þar til þurrfóðurgjöf hefst eftir u.þ.b. 50 daga.

Ýmist var meðhöndlað með lífvirkum efnum með því að bæta efnunum út í eldisvökva fóðurdýra eða í gegnum fitublöndu sem fóðurdýrin er auðguð með fyrir gjöf. Að jafnaði var meðhöndlað daglega í startkerjum og sýni tekin til rannsókna vikulega. Til samanburðar voru ávallt tekin sýni úr jafn mörgum eða fleiri einingum þar sem meðhöndlað var með hefðbundnum hætti (viðmið) auk þess sem vikulega voru tekin sýni úr rækt fóðurdýra sem gefin voru í aðrar eldiseiningar stöðvarinnar á tímabilinu. Meðhöndlanir með lífvirkum efnum voru framkvæmdar í þremur aðskildum hrygningarhópum Fiskey. Mynd 3 sýnir yfirlit yfir uppsetningu þessara tilrauna og sýnatökudaga.

Meðhöndlun með kolmunna- og þorskpeptíðum: skoðaðar voru tvær aðferðir til að koma



Mynd 3. Yfirlit yfir uppsetningu tilrauna í eldiseiningum lúðulírfa. Viðmið I inniheldur lírur af sama upplagi og það sem meðhöndlað er með lífvirkum efnum. Viðmið II inniheldur lírur af ólíkum uppruna.

lífvirkum efnum í lírurnar, annarsvegar í gegnum fódurdýr þar sem uppleystum efnum er bætt beint út í fódurdýraræktir (kolmunna- og þorskpeptíð) og hins vegar í gegnum umhverfi þar sem efnum var bætt í eldisumhverfi lírfa (þorskpeptíð). Samtals var meðhöndlað í 6 kerjum þar sem meðhöndlað var eins í tveimur kerjum og tvö ker sem meðhöndluð voru með hefðbundnum aðferðum höfð til viðmiðunar. Lírur úr stóru startfóðrunarkeri voru fluttar í 8 tilraunaeyningar (100L ker), þar sem á bilinu 96-184 lírur voru settar í hvert ker. Flutningur fór fram 34 dögum eftir að startfóðrun hófst og síðan fengu lírur 4 daga til að jafna sig eftir flutninginn áður en meðhöndlun hófst. Styrkur meðhöndlunar fódurdýra var 1,65g/5L með þorskpeptíðum og 1,0g/5L með kolmunapeptíðum og fódurdýr gefin 2svar á dag. Styrkur þorskpeptíða út í eldisumhverfi lírfa var í upphafi 10g/100L tvisvar á dag en mikið grugg settist í kerin þannig að á sjöunda degi tilraunar var ákveðið að minnka styrk meðhöndlunar í 5g/100L einu sinni á dag. Í lírakerjum gekk allt vel fyrstu dagana og virtust lírur þola vel meðhöndlunina. Á 5. degi drepast allar lírur í þeim tveimur kerjum þar sem meðhöndlað var með fódurdýrum sem meðhöndluð voru með þorskpeptíðum og lauk því þeim hluta tilraunarinnar. Hætt var að meðhöndla með lífvirkum efnum á degi 29 þegar myndbreytingarferlið var lokið og eftir það voru lírur gefin fódurdýr sem voru meðhöndluð með

venjulegum hætti þar til lokasýnataka og skráning niðurstaðna fór fram 33 dögum eftir

upphafsdag tilrauna, þ.e. eftir c.a 70 daga í startfóðrun. Nánari lýsingu á tilraunum þar sem meðhöndlað var með þorskpeptíðum og kolmunnapeptíðum er að finna í ársskýrslu verkefnisins fyrir fyrra verkefnisár (Rf skýrsla #12-06).

Meðhöndlun með kítósani: við lok kviðpokastigs voru lirfur fluttar úr einu síló í tvö startker og lirfur í öðru meðhöndlaðar með kítósani í gegnum fóðurdýr. Þannig fékkst viðmiðunarker sem innihélt sama upplag lirfa og því betur fallið til samanburðar auk þess sem við flutning var þess gætt að flytja jafnt á milli kera (ekki fyrst í annað og svo í hitt) til þess að tryggja sem jöfnust gæði lirfa í kerjum. Þessu til viðbótar var haft annað viðmiðunarker sem innihélt lirfur af ólíku upplagi og þar sem meðhöndlað var með hefðbundnum hætti út tímabilið. Fóðurdýr voru meðhöndluð með kítósani sem blandað var í fitublöndu (0.2g/L fóðurdýr) og lirfur fóðraðar tvisvar á dag.

Fylgst var vandlega með vexti og afkomu lirfa á tímabilinu og kom í ljós að á degi 22 voru lirfur sem meðhöndlaðar voru með kítósani hættar að taka til sín fóður. Af þessum sökum var hlé gert á meðhöndlun í eina viku og síðan byrjað að meðhöndla aftur með sama styrk efnis en aðeins einu sinni á dag (seinni gjöf).

Sýni voru tekin vikulega og hefur samtals verið safnað 24 sýnum af lirfum á ákveðnum dögum (sjá Mynd 3), auk 16 sýna af fóðurdýrum sem gefin voru á tímabilinu (8 sýni af kontról fóðurdýrum og 8 sýni af kítósan-meðhöndluðum dýrum). Áhrif meðhöndlunar voru metin m.t.t. fjölda ræktanlegra baktería og samsetningar bakteríuflóru og jafnframt m.t.t. örvunar valinna þátta ósérhæfða ónæmiskerfisins. Í lok tilrauna var jafnframt metin afkoma, vöxtur og gæði myndbreytingar lirfa.

Meðhöndlun með ufsapeptíðum: lirfur í einu startkeri voru meðhöndlaðar með ufsapeptíðum og eitt startker haft til viðmiðunar sem innihélt lirfur af sama upplagi (Viðmið I). Að öðru leyti var uppsetning tilraunar eins og sýnt er á mynd 3. Fóðurdýr voru meðhöndluð með ufsapeptíðum sem blandað var í fitublöndu (0.02g/L fóðurdýr) og lirfur fóðraðar einu sinni á dag. Vegna reynslu úr fyrri tilraun var ákveðið að meðhöndla lirfur með minni styrkt efna og aðeins einu sinni á sólarhring til að koma í veg fyrir eitrunaráhrif. Samtals var safnað 17 sýnum af lirfum auk 10 sýna af fóðurdýrum (5 sýni af kontról fóðurdýrum og 5 sýni af ufsa-meðhöndluðum dýrum) sem gefin voru á tímabilinu. Áhrif meðhöndlunar var metin eins og áður var lýst.

### 2.3. Meðferð sýna

Við sýnatökur er nauðsynlegt að gæta ávallt fyllsta hreinlætis og að allur sýnatökubúnaður sé dauðhreinsaður. Sýni úr fôðurdýraræktum voru tekin í lok ræktunartímans með hefðbundnum aðferðum (þróaðar af starfsmönnum Fiskey hf.). Dýrin voru skoluð undir rennandi ferskvatni og vökvi látinn renna af áður en þau voru sett í dauðhreinsuð ílát. Við sýnatökur á lirfum voru sýni tekin í dauðhreinsuð ílát sem fyrst eru fyllt af eldisvökva úr kerinu og háfur síðan notaður til að veiða upp lirfur. Sýni eru geymd í ísskáp eða á ís og þau flutt sem fyrst á rannsóknastofu Mátis á Akureyri. Meðhöndla þarf sýni með mismunandi aðferðum allt eftir því hvaða mælingar á að framkvæma en mikilvægt er að undirbúa sýni sem fyrst (innan 4 klst.) þar sem fyrri rannsóknir sýna að ef of langur tími líður frá sýnatöku getur það haft mikil áhrif sérstaklega á niðurstöður örverurannsókna.

Á rannsóknastofunni eru sýni af fôðurdýrum vegin yfir í dauðhreinsuð ílát, þynnt tífalt í dauðhreinsuðu peptone-sjóvatni (0,1% peptone leyst í 70% af gömlu sjóvatni) og lausnin því næst gerð einsleit í ULTRA THURAX tættara við blöndun í 3\*10 sek með 10 sek hvíld á milli (8000 rpm).

Lirfur eru svæfðar með svæfingarlyfi (17% hypnodil lausn) og hellt í gegnum dauðhreinsað sigti þar sem þær eru sótthreinsaðar að utanverðu og því næst skolaðar með því að dýfa sigtinu í 3 lausnir af sterílu saltvatni. Lirfur eru því næst taldar, vegnar yfir í dauðhreinsuð ílát, þynnt tífalt í dauðhreinsuðu peptone-sjóvatni og lausn gerð einsleit eins og áður er lýst. Af tífaldri lausn eru tekin sýni í eppendorf glös (2\*1mL) og fryst við -70°C til að nota við greiningu bakteríuflóru með DGGE aðferð. Tífold lausn er síðan þynnt frekar til ákvörðunar á fjölda ræktanlegra baktería.

Fyrir ónæmisfræðirannsóknir í ELISA og Western blot, eru tífaldar lausnir fyrst “sonikeraðar” með 20% styrk í samtals 59 sek með pulse í eina sek og hvíld í eina sek, (Sonics frá Vibra Cell). Sýni eru höfð í ísbaði á meðan til að þau hitni ekki við þessa meðhöndlun. Þetta er gert til að brjóta niður frumur en síðan er sýni sett í skilvindu við 1000rpm í 10 mín til að losna við frumuveggi og aðrar stærri agnir. Flotið er tekið ofan af og það notað við ónæmisfræðirannsóknir.

Ónæmisfræðirannsóknir voru einnig framkvæmdar með litun á vefjum. Þá voru lirfurnar fyrst svæfðar og síðan komið fyrir ásamt frystilími (Tissue-Tek, OCT, Sakura, USA) í sívalningslaga

plastglösum (15 mm í þvermál og 30 mm á lengd) og frystar í fljótandi köfnunarefni í 50 sek. Eftir frystingu voru sýni geymd í frysti við  $-70^{\circ}\text{C}$  þar til þau voru sneidd í frystiskera (“cryosectioned”).

### **2.3.1. Greining próteina í lífvirkum efnum (Experion)**

Gerð var próteingreining með Experion frá BioRad í því markmiði að greina í sundur peptíð í lífvirkum blöndum auk þess að rannsaka hvort hægt væri að finna þessi lífvirku peptíð í fôðurdýrum eða lirfum eftir meðhöndlun. Sýni voru tekin af uppleystum peptíðum (kítósani, kolmunn og ufsa) sem leyst voru í sjó svo og af meðhöndluðum og ómeðhöndluðum fôðurdýrum auk þess sem keyrðar voru mismunandi þynningar sýna. Farið var eftir aðferðalýsingu frá framleiðanda þar sem notað var Experion<sup>TM</sup> Pro260 Analysis Kit (BioRad). Notaðar voru “reducing” aðstæður þar sem mercaptoethanol var blandað saman við sýnisbuffer og það síðan blandað við bæði sýni og staðal sem fylgir með, og það síðan hitað við  $95\text{--}100^{\circ}\text{C}$  í 3–5 mín. Eftir að blandan hefur verið látin kólna er afjónuðu vatni bætt út í og eru sýni þá tilbúin til að hlaða á keyrslukubbinn. Á hverjum kubbi er haft gel sem hefur verið blandað með lit, neikvætt kontról auk sýna en kubbur hlaðinn og keyrður samkvæmt leiðbeiningum frá framleiðanda. Fyrir frekari lýsingar á framkvæmd mælinga er vísað í meistaraþrófsritgerð Rutar Hermannsdóttur, vor 2008.

### **2.3.2. Ræktun og ákvörðun á fjölda ræktanlegra baktería**

Tífoldar þynningar sýna eru þynntar frekar í peptone-sjóvatni og sáð úr þynningum á yfirborð MA (Marine Agar 2216, Difco) og TCBS (Thiosulphate Citrate Bile Sucrose agar, Difco) agarskála. Allar skálar voru ræktaðar við  $15^{\circ}\text{C}$  í 4–7 daga og fjöldi baktería því næst ákvarðaður.

### **2.3.3. Greining og flokkun á ræktanlegri bakteríuflóru**

Úr hverju sýni voru valdar MA skálar með 100-250 kóloníum/skál, tólf stofnar valdir af handahófi og umsáð yfir á nýjar MA skálar og ræktað áfram við  $15^{\circ}\text{C}$  þar til greinilegur vöxtur er kominn á skálar (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 flokkuð í hópa m.t.t. svörunar í mismunandi prófum.

#### 2.3.4. Mynstur heildarflóru greint með sameindafræðilegum aðferðum (PCR – DGGE)

Notaðar voru tífoldar þynningar sýna sem geymdar höfðu verið við  $-70^{\circ}\text{C}$ . Erfðaefni var einangrað úr sýnum með notkun PureGene DNA tissue kit frá Gentra og síðan var hluti af 16S rDNA geni baktería magnað upp með notkun sérhæfðra vísa; 534R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG -3') og 341FGC (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG -3') (TAG Copenhagen). Við mögnun er notað “touchdown” PCR hvarf þar sem annealing hitastig fer frá  $65^{\circ}\text{C}$  í  $55^{\circ}\text{C}$  (í heildina 40 hringir) og verður þá til 196bp erfðaefnisbútur sem hefur mismunandi uppbyggingu eftir tegundum baktería.

Til greiningar var valin aðferðin PCR-DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis) sem orðin er algeng aðferð til að greina samsetningu og breytingar í bakteríuflóru umhverfissýna (Griffiths 2001, Jensen 2004). Aðferðin miðar að því að aðskilja erfðaefnisbúta sem eru af svipaðri stærð en hafa mismunandi uppbyggingu og sem koma fram sem mismunandi bönd við rafdrátt PCR afurða á acrylamide geli sem inniheldur eðlissviptandi gradient. Aðferðin byggist á mismunandi styrk milli basapara þar sem DNA bútar sem innihalda meira hlutfall GC eru mun stöðugri og haldast á tvíþátta formi lengra niður í gelið. Notaður var DCode tækjabúnaður (DCode Mutation Detection frá Bio-Rad) og 1.5 cm þykk gel sem voru af stærðinni 16x16cm. Hægt er að stjórna styrk eðlissviptingar í gelinu og var í þessu tilfelli notaður styrkur á bilinu 30-60% urea-formamide auk þess sem stacking gel var haft efst. Gelið var síðan keyrt við 60V / 20mA í 10 klst við  $60^{\circ}\text{C}$  stöðugan hita. Til að auðvelda samanburð banda á milli mismunandi gela var alltaf keyrður staðall sem útbúinn var á rannsóknstofunni með því að blanda saman hreinræktuðum bakteríustofnum sem reyndust stöðvast á mismunandi stöðum í gelinu. Á myndum með niðurstöðum eru stofnar númeraðir; A: *Staphylococcus aureus*, B: *Moraxella*, C: *Vibrio splendidus*, D: *Pseudoalteromonas elyakovii*, E: *Vibrio* spp, F; *Marinovum algicola* og G: *Actinomycete*. Sem neikvætt viðmið var ávallt haft á gelinu peptone sjóvatn sem einnig var notað fyrir þynningu sýna. Gelið var litað með SYBR Gold kjarnsýrulit (Invitrogen) í 15 mín, síðan myndað á UV ljósi með InGenius LHR tækjabúnaði (GeneSnap frá Syngene) og loks greint með myndgreinignarforriti (Gene tools frá Syngene) þar sem hver bakteríutegund er greind sem eitt band á gelinu.



### 2.3.5. Raðgreining

Valdir stofnar ræktanlegrar flóru voru sendir til tegundagreiningar með 16S rDNA hlutaraðgreiningu (framkvæmt af Prokaria). Þá var erfðaeftni baktería einangrað með “Pure gene tissue kit” frá Gentra eins og lýst var áður. Hjá Prokaria var erfðaeftnið magnað og við það notaðir sérhæfðir vísar sem magna upp næstum allt 16S rDNA genið; F9 (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; staðsetning hjá Escherichia coli við basa 9 til 27) og R1544 (5'-AGAAAGGAGGTGATCCA-3'; staðsetning hjá E. coli við basa 1544 til 1528) (Skirnisdóttir 2000) og það síðan raðgreint með notkun sérhæfs raðgreiningar vísis (R05). Niðurstöður tegundagreiningar eru síðan fengnar með því að bera saman basaraðir við gagnabanka á netinu (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

### 2.3.6. Örvun ósérhæfðrar ónæmissvörunar lúðulirfa

Til rannsókna á ósérhæfðri ónæmissvörun lúðulirfa voru notaðar þrjár mismunandi aðferðir; ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) þar sem gerður var samanburður á magni IgM mótefna í meðhöndluðum og ómeðhöndluðum lirfum, Western blot þar sem notuð voru mótefni gegn IgM og C3, og vefjalítanir þar sem skimað var fyrir IgM, C3 og lysozyme með notkun mótefna. Mótefni sem notuð eru til mælinga voru fengin frá Sjávarútvegsháskólanum í Tromsø (Merete Schröder) og frá Tilraunastöð Háskóla Íslands að Keldum (Bergljót Magnadóttir). Rannsókuð var tjáning ónæmisþátta í lirfum á mismunandi tímavörðum frá kvíðpokastigi til loka startfóðrunar og borið saman mynstur tjáningar í meðhöndluðum og ómeðhöndluðum lirfum. Í skýrslunni fylgir gróf lýsing á aðferðum og helstu niðurstöðum en nánari lýsingu á aðferðum og niðurstöðum mælinga á ónæmisþáttum er að finna í meistaraþrófsritgerð Rutar Hermannsdóttur (áætluð námslok vor 2008).

ELISA: Notuð er sandwich ELISA til að greina magn IgM mótefna í sýnum. Notuð voru primery mótefnin, kanínu  $\alpha$  lúðu IgM og mús  $\alpha$  lúðu IgM og merkt secondary mótefni kanínu  $\alpha$  mús IgG. Primery mótefnið kanín  $\alpha$  lúðu IgM voru þynnt í koplingsbuffer (1:1000) og síðan fest á ELISA-plötturnar (*coding*) yfir nótt í rakaboxi. Eftir endurtekinn þvott með Phosphate Buffered Saline (PBS/0,05% Tween20) og metun bindisæta með Phosphate Buffered Saline Albumin (2% PBSA/0,05% Tween20) er 100 $\mu$ l af sýni sett í hvern brunn í fjórum mismunandi þynningum og hver þynning í þremur endurtekningum. Primer mótefnið, mús  $\alpha$  lúðu IgM, var þynnt í 0,2% PBSA/0,05% Tween20 (1:1000) og látið liggja á í 2 klst. og merkt secondary mótefni (AP

ensímmerkt kanínu  $\alpha$  mús IgG) þynnt 1:1000 í 0,2% PBSA/0,05%Tween20 og látið liggja á yfir nótt í rakaboxi. Næsta dag var substrati fyrir ensímið bætt í hvern brunn (1mg/ml p-nitrophenyl phosphate leyst í substratbuffer) og lesið af eftir  $\frac{1}{2}$  til 1 klst við 405 nm í ELISA mæli (Multiskan EX frá Thermo Electron). Til viðmiðunar var jákvæður kontróll (IgM frá lúðu) hafður í nokkrum þynningum á hverri plötu (frá 1:16.000).

Western Blot: Sýni eru undirbúin eins og lýst var hér að ofan og tilvist IgM og C3 greind með notkun mótefna gegn lúðu IgM og C3. Sýni ásamt stærðarmarker voru keyrð á 12% SDS-PAGE geli við 200V í 4 klst. Til viðmiðunar var jákvæður kontróll (hreinsað C3 og IgM lúðumótefni) hafður á hverju geli. Eftir rafdrátt var gelinu komið fyrir í blottunartæki (Trans-Blot frá Bio-Rad) ásamt nitrocellulosa himnu sem fyrst var vætt í blotting buffer. Filterpappír er lagður báðum megin til að auðvelda flutning próteina frá geli yfir á himnu. Prótein voru rafdreigin yfir á himnu við 2.5 mA /cm<sup>2</sup> af geli í 45 mín. Bindiset á himnunni eru mettuð með 2% BSA í 10% TBS í 2 klst. og himna síðan sett í lausn með primery mótefninu (kanin  $\alpha$  IgM eða mús  $\alpha$  C3 þynnt í 0.2% TBSA lausn) í 16 klst á vöggju við herbergishita. Eftir þvott var himnan lätin liggja í 1-2 klst. í lausn með AP-merktu secondary mótefni (geit  $\alpha$  kanin IgM og kanin  $\alpha$  mús C3 þynnt í 0.2% TBSA lausn) og bönd gerð sýnileg með því að leggja himnuna AP-substratbuffer (NBT og BCIP).

Vefjalitanir: Mótefnalitanir voru gerðar á vefjasneiðum til að skoða tilvist og dreifingu IgM, C3 og lysozyme í mismunandi líffærum og á mismunandi þroskastigum lirfa frá kviðpokastigi til loka startfóðrunar. Lirfur voru frystar í fljótandi köfnunarefni eins og áður var lýst og geymdar við -70°C þar til þau voru unnin frekar. Lirfur voru skornar í 10  $\mu$ m þykkar sneiðar í frystiskera (Leica CM 1800) við -27°C eftir að hafa verið lätin jafna sig í frystiskeranum í um 20 mín. Byrjað var að safna sneiðum á gler þegar komið var aftur fyrir augu og sneiðum safnað þar til komið var aftur fyrir meltingarveg. Sneiðum var raðað á sýnagler (SuperFrost/Plus, 25 x 75 x 1,0 mm frá Menzel-Gläser, Þýskalandi) þar sem sneiðar voru settar til skiptis á 3 gler, eitt fyrir hverja litunaraðferð. Skorin sýni voru geymd á sýnaglerjunum við -70°C þar til þau voru lituð. Mótefnin sem notuð voru við litunina voru kanína  $\alpha$  lúðu IgM, mús  $\alpha$  lúðu C3 og kanína  $\alpha$  þorsk lysozyme. Kanína  $\alpha$  þorsk lysozyme var notað í því markmiði að rannsaka hvort sérhæfð mótefni gegn lysozymi í þorsk gætu bundist lysozyme úr lúðu.

Við mótefnalitun er byrjað á að hamla peroxidasa virkni (*block endogenous peroxidase activity*) með 3% Hydrogen Peroxide lausn (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) í PBS og primery mótefninu síðan bætt yfir sneiðarnar (þynnt í 0,2 % geita sermi) og látið liggja á í 1 klst. Eftir skolun er secondary mótefninu (HRP merkt geit  $\alpha$  kanin og kanin  $\alpha$  mús) bætt yfir sneiðarnar, látið liggja í 1 klst. og litur síðan framkallaður með substrate buffer og AEC lausn en bakgrunnslitur fenginn með hematoxylin. Eftir að sýnin höfðu þornað við stofuhita var þekjugler fest yfir sýnaglerið með MOUNTEX (Histolab, Svíþjóð). Sýnin voru skoðuð í Leica DMRA2 smásjá í 400x og 1000x stækkun, og myndir teknar í gegnum smásjána með Leica DC300F stafrænni myndavél. Við úrvinnslu sjást mótefnin rauð og kjarni fruma blár.

### 3. NIÐURSTÖÐUR

Í þessari skýrslu er gerð grein fyrir helstu niðurstöðum verkefnisins í heild sinni. Niðurstöður einstakra þátta er einnig að finna í ársskýrslu verkefnisins fyrir fyrra verkefnisár (Rf skýrsla # 12-06) svo og í verkefnum Rutar Hermannsdóttur til meistaraþrófs við Viðskipta og Raunvísindadeild Háskólans á Akureyri (áætluð námslok vor 2008) svo og í verkefnum tveggja nemenda til BSc prófs við Auðlindadeild Háskólans á Akureyri; Önnu Maríu Jónsdóttur árið 2005 og Rutar Hermannsdóttur árið 2005. Efniviður úr rannsókninni verður jafnframt nýttur sem hluti af verkefni Rannveigar Björnsdóttur til doktorspróf (áætluð námslok 2008). Yfirlit yfir verkþætti verkefnisins þar sem lífvirk efni voru prófuð á fyrstu stigum lúðueldis er sýnt í töflu 2. Öllum verkþáttum sem lagðir voru fyrir í umsóknum til sjóðsins hefur verið lokið auk þess sem nauðsynlegt þótti að bæta við verkþætti þar sem bakteríuflóra á fyrstu stigum lúðueldis var kortlögð. Þær niðurstöður voru kynntar á veggspjaldi á European Aquaculture – Tyrkland 2007, auk þess sem unnið er að ritun vísindagreinar um þessar niðurstöður (Rannveig Björnsdóttir – óbirt handrit).

**Tafla 2. Yfirlit yfir verkþætti verkefnisins sem lagðir voru fyrir í umsóknum auk viðbóta. Tilraunir voru framkvæmdar á rannsóknastofunni (*in vitro*) og á fyrstu stigum líúðeldis (*in vivo*) á tímabilinu 2005-2007.**

	Verkþættir	Lífvirk efni rannsökuð
2005-2006	Framleiðsla próteindufts sem nota á í rannsóknirnar	Hydrolysat frá þorski
	Meðhöndlun fôðurdýra	Kítósan, hydrolysat frá þorski og kolmunna
	Rannsóknir á næmi ríkjandi flóru	Kítósan, hydrolysat frá þorski og kolmunna
	Meðhöndlun lirfa og fôðurdýra þeirra	Kítósan, hydrolysat frá þorski og kolmunna
2006-2007	Framleiðsla og rannsóknir á lífvirkum peptíðum	Hydrolysat frá ufsa
	Meðhöndlun lirfa og fôðurdýra þeirra	Kítósan, hydrolysat frá ufsa
	Örvun ósérhæfðar ónæmissvörunar líúðulirfa	Kítósan, hydrolysat frá kolmunna og ufsa
	Kortlagning bakteríuflóru á fyrstu stigum líúðeldis	

Lífvirk efni á borð við fiskprótein og kítósan hafa náttúrulega örveruhindrandi/drepandi virkni sem virðist jafnvel enn meiri en þær mjólkursýrubakteríur sem hafa mest verið notaðar í fiskeldi. Í þessu verkefni var sjónum fyrst og fremst beint að efnum sem þekkt er að hafa þá lífvirkni sem m.a. var sóst eftir þ.e.a.s. bakteríuhamlandi/drepandi áhrif, styðja við vöxt æskilegrar flóru á kostnað óæskilegrar (prebiotic áhrif) og/eða efla ónæmissvörun lirfa (ónæmisörvandi áhrif). Einnig var áhugi fyrir að rannsaka áhrif lífvirkra efna sem unnin hafa verið úr fiski og þá sérstaklega vannýttum afurðum sem eru í dag ekki nýtt eða verðlítill.

Við mat á áhrifum efna er fyrst og fremst horft til afkomu og vaxtar lirfa en einnig örveruflóru í lirfum og fôðurdýrum þeirra (bakteríufjöldi, tegundir og mynstu heildarflóru) auk örvunar ónæmissvörunar líúðulirfa.

### 3.1. Greining próteina í lífvirkum efnum

Markmið þessa verkþáttar var að rannsaka hvort unnt væri að greina í sundur peptíð í lífvirkum blöndum auk þess að rannsaka hvort hægt væri að finna þessi lífvirku peptíð í fôðurdýrum eða lirfum eftir meðhöndlun. Markmið próteingreiningarinnar var jafnframt að rannsaka hvort samsetning peptíða í efnunum breyttist við íblöndun í fitublöndu (niðurbrot). Sýni voru tekin af fôðurdýrum og lirfum sem meðhöndluð höfðu verið með lífvirkum efnum auk þess sem lífvirk efni voru leyst upp bæði í sjóvatni og í fitublöndu. Helstu niðurstöður voru þær að með þessari aðferð er ekki hægt að greina á milli peptíða hvorki í lífvirkum efnum né í fôðurdýrum og lirfum. Þetta bendir til að peptíðin séu of lítil til að tækið gæti greint þau, en aðferðin á að geta greint prótein á stærðarbilinu 10-260 kD. Einnig kom í ljós að efnin innihéldu svo mikið af peptíðum á sama stærðarbili að ekki reyndist unnt að greina á milli þeirra.

### 3.2. Áhrif lífvirkra efna á fódurdýr

Markmið þessa verkþátta var að rannsaka hvort og hvernig fódurdýr þola meðhöndlun með lífvirkum efnum, staðla aðferðir við meðhöndlun þeirra og þannig auka stöðugleika og öryggi við framleiðslu fódurdýranna.

Framkvæmdar voru endurteknar tilraunir þar sem rannsökuð voru áhrif kítósans (11 tilraunir), kolmunnapeptíða (3 tilraunir), ufsapeptíða (6 tilraunir) og ýmissa afurða úr þorski s.s. vöðva og afskurði (11 tilraunir). Tilraunir voru gerðar með mismunandi styrk efna við meðhöndlun auk þess sem reyndar voru mismunandi aðferðir við meðhöndlun fódurdýranna þ.e. að bæta efnum beint út í umhverfi þeirra eða blanda efnum í fitublöndu sem notuð er við auðgun fódurdýra. Áhrif meðhöndlunar voru metin m.t.t. afkomu fódurdýra og jafnframt m.t.t. áhrifa á bakteríuflóru. Litur og almennt útlit fódurdýranna var jafnframt skoðað.

Helstu niðurstöður þessa verkþáttar eru þær að fódurdýr virðast þola vel meðhöndlun með öllum þeim lífvirku efnum sem prófuð hafa verið og benda niðurstöður til þess að meðhöndlun með ákveðnum styrk efna hafi góð áhrif á fódurdýrin. Styrkur efna virðist skipta miklu máli og reyndist of hár styrkur frekar gefa útfellingar, vonda lykt og minni afkomu. Lifun fódurdýra getur verið breytileg en 80-85% lifun telst mjög ásættanleg. Lifun fódurdýranna reyndist í flestum tilfellum mjög góð, t.d. var lifun 94-98% þegar meðhöndlað var með ákveðnum styrk kolmunna- og þorskpeptíða (niðurstöður ekki sýndar). Meðhöndluðu fódurdýrin virtust í flestum tilfellum spræk, bústin og falleg á litinn, auk þess sem lifun var góð samanborið við kontróleiningar sem bendir til þess að efnin séu að verka eins og bætiefni/næring fyrir fódurdýrin.

Aðferðir við meðhöndlun fódurdýra hafa verið staðlaðar og ákjósanlegra þykir að blanda efnum í fitublönduna, fyrst og fremst vegna þess að minna magn efna þarf til meðhöndlunar með þessari aðferð en einnig vegna þess að aukið lífrænt álag hlýst af því að bæta efnunum út í eldisvökva fódurdýranna og eykur það líkur á bakteríuvexti og lífrænum úrgangi í ræktunum. Erfitt reyndist að mæla magn efnanna í fódurdýrum og því ekki ljóst að hvaða marki fódurdýrin eru að taka upp lífvirku efnin og hvort efnin breytast í fódurdýrunum. Þessi aðferð er notuð til að koma ýmsum efnum í fódurdýr, þ.e. með því að pakka efnunum í fitubólur sem fódurdýrum er gefin og þykir þessi aðferð reynast mjög vel. Nánari lýsing á aðferðum og niðurstöðum þessara tilrauna er að finna í ársskýrslu verkefnisins fyrir fyrra verkefnisár (Rf skýrsla # 12-06).

### 3.3. Áhrif lífvirkra efna á lúðulirfur

Fyrstu stig lirfueldis hafa reynst mikill flöskuháls við framleiðsla lúðuseiða og benda rannsóknir til að bakteríuflóra geti haft víðtæk áhrif á gæði og afkomu lirfa (Verner-Jeffreys 2003) Markmið þessa verkefnis var að auka lifun og gæði lúðulirfa í startfóðrun með því að meðhöndla lirfur með vistvænum aðferðum (lífvirk efni). Lofandi niðurstöður fengust við meðhöndlun fóðurdýra sem virtust þola vel öll þau sem rannsökuð voru og þótti það gefa góð fyrirheit um notkun efnanna á fyrstu stigum lúðueldis. Tilraunir fóru fram í seiðaeldisstöð Fiskey og sáu starfsmenn þeirra um uppsetningu og sýnatökur auk þess að meta vöxt, afkomu og gæði myndbreytingar (litur og augnfærsla).

Gerðar hafa verið þrjár aðskildar tilraunir í seiðaeldisstöð Fiskeyjar;

- Meðhöndlun með kolmunnaeptíðum (efni bætt í eldisumhverfi lirfa) og þorskpeptíðum (efni bætt í eldisumhverfi lirfa og eldisumhverfi fóðurdýra) (apríl – maí 2006).
- Meðhöndlun með kítósani í gegnum fóðurdýr sem gefin voru efnin í gegnum fitublöndu (nóvember 2006 – janúar 2007).
- Meðhöndlun með ufsapeptíðum í gegnum fóðurdýr sem gefin voru efnin í gegnum fitublöndu (september 2007 – október 2007).

Meðhöndlun lirfa með kolmunna- og þorskpeptíðum: Í samráði við starfsmenn Fiskeyjar var ákveðið að framkvæma fyrstu tilraunir með meðhöndlun lirfa með lífvirkum efnum í litlum tilraunaeyningum í eldisstöð Fiskeyjar í því markmiðið að lágmarka áhættu fyrir framleiðandann. Kolmunna- og þorskpeptíð urðu fyrir valinu vegna niðurstaðna fyrri tilrauna á rannsóknastofunni svo og meðhöndlunar í fóðurdýraræktum. Kolmunnaeptíð þóttu gefa mjög áhugaverðar niðurstöður m.t.t. vaxtarhamlandi áhrifa á bakteríustofna (in vitro) sem reyndust ríkjandi í lirfum í kerjum þar sem afkoma lirfa í startfóðrun var slæm. Þorskpeptíðin sýndu einnig bakteríuhamlandi lífvirkni og þóttu þau mjög áhugaverður kostur þar sem mikið magn fellur til við vinnslu og er nær verðlaus afurð í dag.

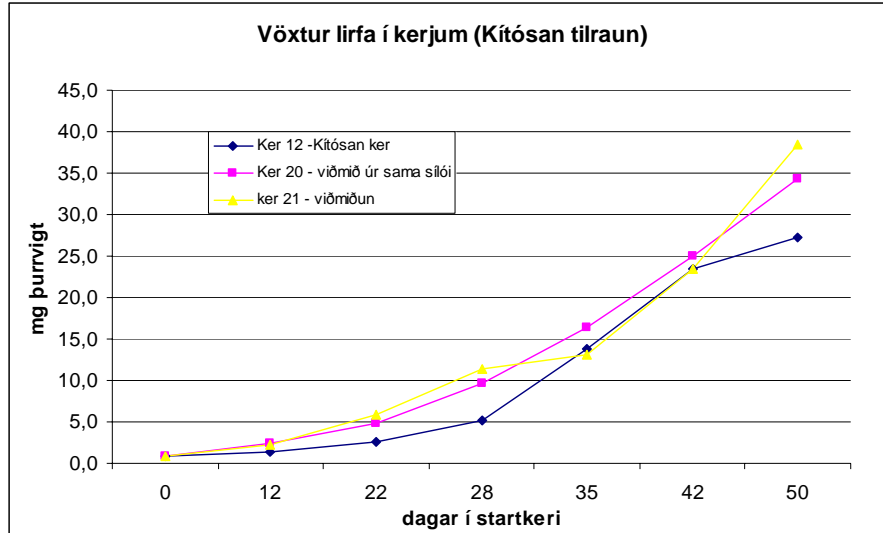
Niðurstöður þessara tilrauna sýndu að sú leið að nota fóðurdýr til að koma lífvirkum efnum í lirfur gefur betri raun en sú að bæta efnunum út í eldisumhverfi lirfa. Líkleg skýring á þessu er að mikil óþrif mynduðust í kerjunum þegar lífvirkum efnum er bætt út í eldisumhverfi lirfa og aukið lífrænt álag hefur án efa neikvæð áhrif á lirfurnar auk þess sem fyrri rannsóknir sýna að

Það stuðlar að auknum bakteríuvexti. Ekki var að sjá mikinn mun á myndbreytingu seiða í ómeðhöndluðum einingum (kontról) samanborið við lirfur sem meðhöndlaðar voru með lífvirkum efnum en lífvirku efnin virtust hafa neikvæð áhrif á vöxt sem gefur vísendingar um að meðhöndlað hafi verið með of miklu magni efna.

Niðurstöður þessarar tilraunar benda því til að hægt sé að framleiða umhverfisvæn efni sem mögulegt sé að nota á fyrstu stigum lúðueldis en þó sé nauðsynlegt að gæta að magni efna við meðhöndlun. Frekari lýsingu á framkvæmd þessara tilrauna og niðurstöður er að finna í ársskýrslu verkefnisins fyrir fyrra verkefnisár (Rf skýrsla # 12-06).

Meðhöndlun lirfa með kítósani: Lífvirk áhrif ýmissa kítósan-afurða á menn eru vel þekkt (Picot 2006) og þótti því áhugavert að skoða áhrif valinnar afurðar á lirfur í startfóðrun. Meðhöndlun var framkvæmd á lirfum í einu startkeri í framleiðslustærð sem gefur marktækari niðurstöður samanborið við tilraunaeyningar. Til viðmiðunar voru tekin sýni úr startkeri með sama upplagi lirfa svo og öðru startkeri með ólíku upplagi lirfa og var meðhöndlað með hefðbundnum hætti í báðum þessum einingum. Kítósan var blandað í fitublöndu fóðurdýra í styrkleikanum 0.2g/L samkvæmt aðferð sem stöðluð var í fyrra verkþætti. Þau fóðurdýr sem gefin voru á tímabilinu voru spræk og virtust þola vel meðhöndlunina og vera vel til þess fallin að nota sem fóðurdýr fyrir lirfur. Lirfur voru til að byrja með fóðraðar tvisvar á hverjum degi með meðhöndluðum fóðurdýrum en eins og tekið var fram í framkvæmdarlýsingu kom í ljós að lirfur hættu að taka til sín næringu á 27. degi sem talið var benda til eitrunaráhrifa vegna of mikils styrks við meðhöndlun. Í framhaldinu var meðhöndlun breytt og gekk allt vel eftir það.

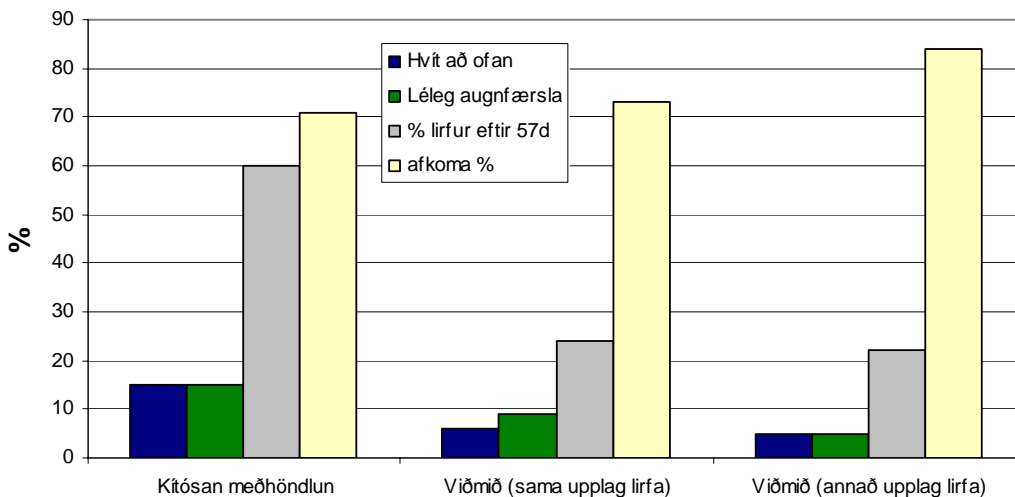
Þegar vöxtur lirfa er skoðaður (mynd 4) sést að lirfur sem meðhöndlaðar voru með kítósani lágu töluvert á eftir í vexti í samanburði við viðmiðunarker fram til dags 35. Eituráhrif koma í ljós á degi 21 og fer þá vöxtur að dala en þær ná að jafna sig og á tímabilinu frá degi 35 til 42 er vöxtur í samræmi við lirfur í öðru viðmiðunarkeri en þó minni en lirfur með sama upplag. Niðurstaða þessarar tilraunar var því sú að meðhöndlun með þessum styrk af kítósani hamlaði vexti lirfa samanborið við lirfur sem fengu hefðbundna meðhöndlun.



Mynd 4. Vöxtur lirfa í startfórðrun. Samanburður á milli kítósanmeðhöndlaðra lirfa og lirfa af sama eða ólíku upplagi sem fengið hafa hefðbundna meðhöndlun.

Afkoma meðhöndlaðra lirfa í lok startfórðunar var svipuð (71%) í samanburði við lirfur af sama upplagi og sem fengu hefðbundna meðhöndlun (73%) en lægri í samanburði við viðmiðunarker með lirfum af ólíkum uppruna (84%). Hlutfall lirfa (ómyndbreyttar lirfur sem ekki verða að seiðum) í lok tilraunar er töluvert hátt í kítósanmeðhöndluðu kerri (60%) í samanburði við bæði viðmiðunarkerin (24% og 22%) (Mynd 5). Jafnframt er hlutfalla lirfa sem eru hvítar að ofan og hafa lélega augnfærslu hátt (15%) í kítósanmeðhöndluðu kerri eftir 57 daga í startkeri, til samanburðar við 5-9% í viðmiðunarkerum (Mynd 5).

Afkoma og myndbreyting lirfa (kítósan tilraun)



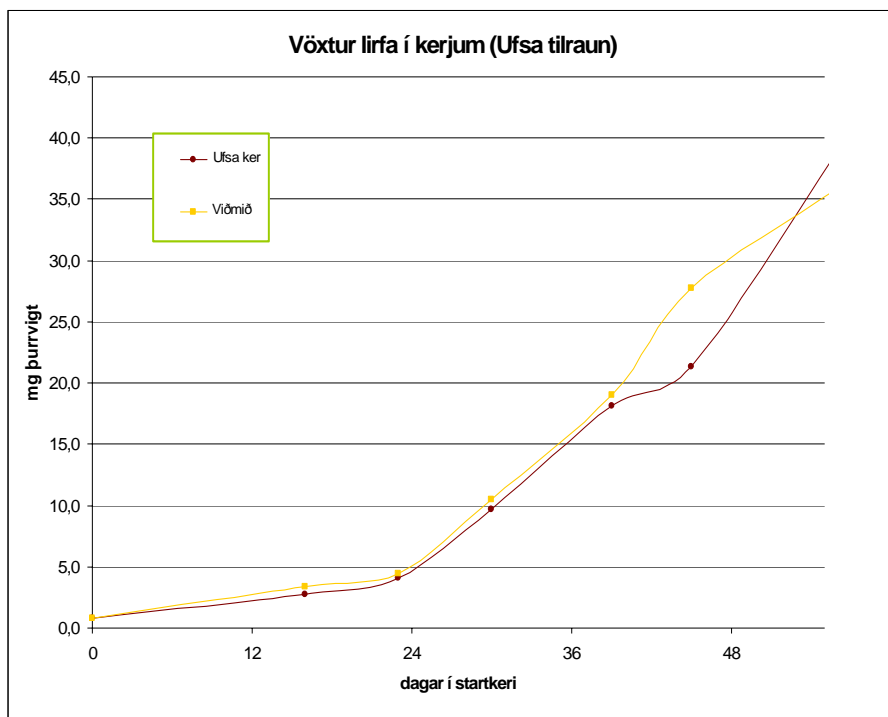
Mynd 5. Afkoma og gæði myndbreytingar lirfa (litur, augnfærsla og hlutfall lirfa). Samanburður milli lirfa sem fá kítósan meðhöndlun og lirfa af sama og ólíku upplagi en fá hefðbundna meðhöndlun á tímabilinu.



Niðurstöður þessarar tilraunar gefa vísbendingar um að kítósan gæti haft góð áhrif á afkomu og vöxt lirfa í startfóðrun ef meðhöndlað er með réttum styrk efna, þar sem ekki var mikill munur á afkomu í kítósanmeðhöndluðu kerri og viðmiðunarkeri með sama upplagi lirfa. Aftur á móti er erfitt að meta áhrif kítósans á myndbreytingu lirfa þar sem niðurstöður benda til að meðhöndlað hafi verið með of háum styrk og gætu eitrunaráhrif seinkað myndbreytingu en ekki er líklegt að lirfur sem ekki hafa myndbreyst svona seint eigi eftir að verða að seiðum.

Meðhöndlun lirfa með ufsapeptíðum: Fyrsta tilraun með notkun kolmunnapeptíða á fyrstu stigum lirfueldis þóttu gefa mjög lofandi niðurstöður sem gáfu tilefni til endurtekningar. Lítil veiði á kolmunna gerði það að verkum að erfitt reyndist að fá efnivið og því ákveðið að vinna samskonar afurð úr ufsa sem einnig er vannýtt hráefni. Fóðurdýr virtust þola vel meðhöndlun með ufsapeptíðum og fóðurdýr því notuð til að koma efnunum í lirfur með aðferð sem þróað var áður, þ.e. blandað í fitublöndu í styrknum 0.02g/L fóðurdýr. Lirfur voru meðhöndlaðar í einu startkeri og systkinaker þess (lifur af sama upplagi) haft til viðmiðunar.

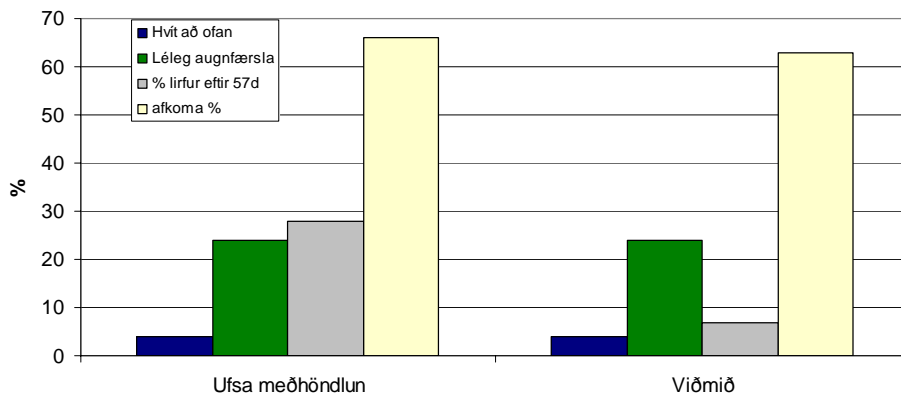
Vöxtur lirfa sést á mynd 6 og er ekki að sjá mikinn mun á vexti lirfa í lokin þó svo virðist sem á tímabili dragi úr vexti ufsameðhöndlaðra lirfa (dagur 39 – 45).



Mynd 6. Vöxtur lirfa í startfóðrun. Samanburður á milli ufsameðhöndlaðra lirfa og viðmiðunarlirfa sem eru af sama upplagi en fá hefðbundna meðhöndlun á tímabilinu.

Ekki var teljanlegur munur á afkomu lirfa eftir meðhöndlun (66% við ufsameðhöndlun og 63% við hefðbundna meðhöndlun) (Mynd 7). Gæði myndbreytingar voru svipuð í báðum kerjum þegar tekið var mið af lit og augnfærslu aftur á móti er hlutfall lirfa sem ekki eru orðin að seiðum mun hærra í ufsameðhöndluðu kerri (28%) í samanburði við viðmið (7%) en ekki er talið líklegt að þessar lirfur eigi möguleika á að komast af þó svo einhver hluti þeirra eigi sennilega eftir að verða að seiðum.

### Afkoma og myndbreyting lirfa (ufsa tilraun)



Mynd 7. Afkoma og gæði myndbreytingar lirfa (litur, augnfærsla og hlutfall lirfa). Samanburður á lirfum meðhöndluðum með ufsapeptíðum og ómeðhöndluðum lirfum (sama upplag lirfa).

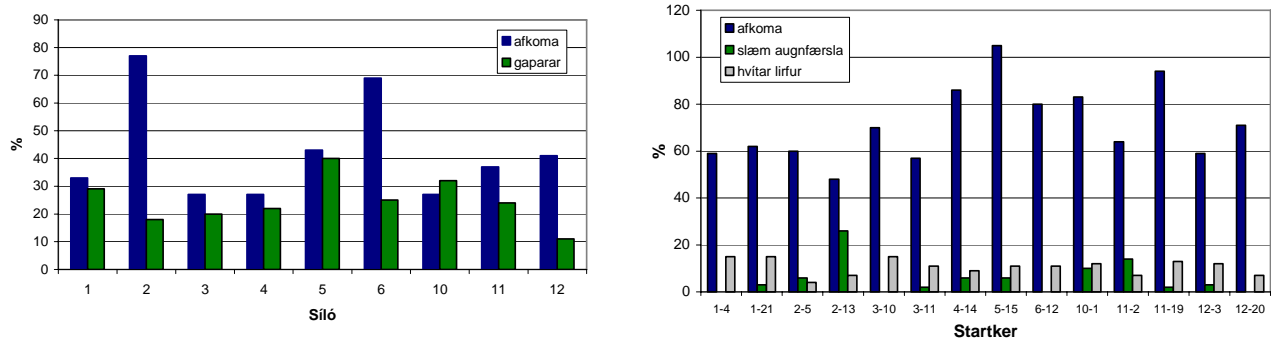
Á heildina litið var ekki mikill munur á vexti, afkomu eða gæðum lirfa í þessari tilraun en aftur á móti virðist sem ufsaduft hafi neikvæð áhrif á myndbreytingu lirfa yfir í seiði. En eins og áður hefur komið í ljós er mjög mikilvægt að meðhöndla með réttum styrk efna og því gæti verið að hér hafi verið notað of mikið af ufsapeptíðum þar sem afurðin sem notuð er mælist sem 98% hreint prótein og þarf því væntanlega að meðhöndla með efninu í litlu magni.

Heildarniðurstöður rannsókna á áhrifum lífrænna efna á afkomu og gæði lirfa í startfóðrun gefa skýrt til kynna að styrkur efna við meðhöndlun skiptir miklu máli og meðhöndlun með of miklum styrk geti haft öfug áhrif m.t.t. vaxtar og myndbreytingar lirfa. Aftur á móti gefa niðurstöður einnig til kynna að lífvirk efni í réttum styrk gætu haft góð áhrif á lirfur á þessu stigi.

### 3.4. Áhrif lífvirkra efna á bakteríuflóru

Talið hefur verið að bakteríuflóra á fyrstu stigum lírfueldis sjávarfiska hafi töluvert um afkomu lírfa að segja og er eitt meginmarkmið þessa verkefnis að bæta afkomu og gæði lírfa í startfóðrun með notkun lífvirkra efna. Í þessum verkþætti var einum hrygningarhópi fylgt eftir frá kviðpokastigi til loka startfóðrunar í því markmiði að kortleggja bakteríuflóru eldisins og tengja samsetningu bakteríuflóru við afkomu og gæði lírfa.

Þegar heildarútkoma eldiseininganna var skoðuð kom í ljós að afkoma og gæði lírfa eru mjög mismunandi og ekki er augljóst sambengi á milli afkomu á kviðpokastigi og afkomu og gæða lírfa í lok startfóðrunar (mynd 8).

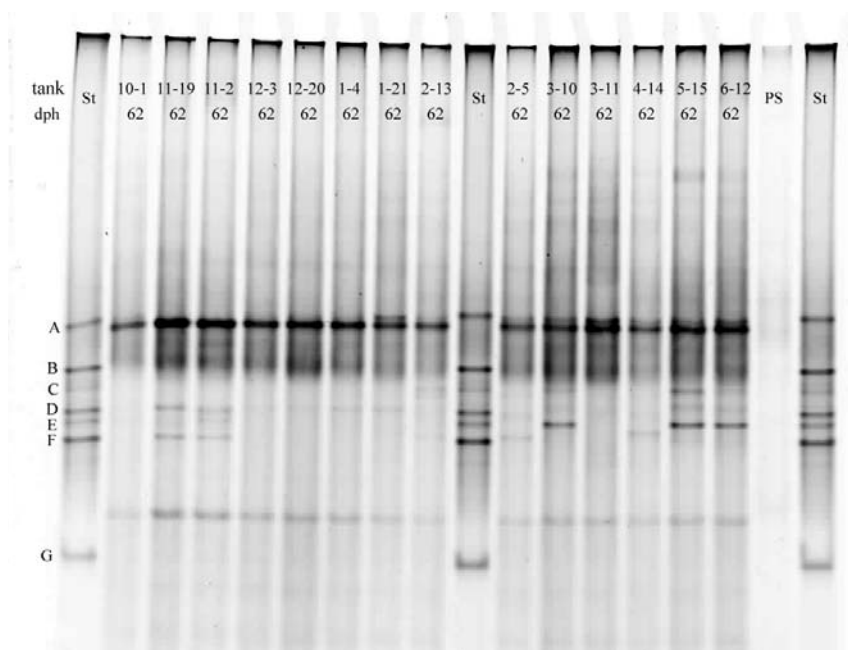


Mynd 8. Afkoma og gæði kviðpokalírfa (siló) og lírfa í lok startfóðrunar (Siló – startker). Númer startkerja á við númer silós sem lírfur koma úr auk númera startkers (siló-startker).

Niðurstöður talninga á fjölda ræktanlegra baktería sýna að töluverður munur er á fjölda baktería í mismunandi eldiseiningum á kviðpokastigi m.t.t. heildarfjölda ræktanlegra baktería (TVC) svo og fjölda hugsanlegra *Vibrio* baktería ( $10^2$  –  $10^6$  bakteríur/g votvigt). Þessi munur er minna sýnilegur þegar komið er í startker (mynd 9). Niðurstöður benda ekki til neinna tengsla á milli afkomu lírfa á þessu stigi og fjöldi ræktanlegra baktería.



var með sameindafræðilegum aðferðum (niðurstöður ekki sýndar). Þó virðast óræktanlegar tegundir ríkjandi í lirfum í startfóðrun og því hugsanlegt að þessi flóra sé svo ríkjandi og ræktanlegar tegundir í svo hlutfallslega miklu minna magni að þær komi einfaldlega ekki fram við greiningu á mynstri heildarflóru. Eins og sést á mynd 10 virðist bakteríuflóra í meltingarvegi lirfa einkennast af frekar fáum tegundum ef litið er til niðurstaðna DGGE.



Mynd 10. Mynstur heildarflóru bakteríua greint með DGGE rafdrætti. Myndin sýnir mynstur flóru í lirfum úr mismunandi eldiseiningum (tank) eftir viku í startfóðrun eða 62 dögum eftir klak (dph). Á gelinu eru einnig þynningarvökvi (PS) og staðall (St) sem inniheldur bakteríustofna A: *Staphylococcus aureus*, B: *Moraxella*, C: *Vibrio splendidus*, D: *Pseudoalteromonas elyakovii*, E: *Vibrio* spp, F: *Marinovum algicola* og G: *Actinomycete*.

Ekki var unnt að koma auga á tengsl á milli bakteríuflóru og heildarútkomu úr einstaka kerjum aftur á móti er ákveðin tegund *Vibrio* greinilega ríkjandi í einingum sem koma best út m.t.t. afkomu og gæða lirfa. Þessi sama tegund er ekki eins ríkjandi í lirfum þar sem afkoma var slakari og finnst ekki í einingum sem ganga verst (niðurstöður ekki sýndar).

Fjallað er frekar um niðurstöður þessara rannsókna í vísindagrein sem unnið er að (Rannveig Björnsdóttir, áætluð birting 2008).

Þó svo ekki hafi verið sýnt fram á bakteríuhamlandi áhrif þeirra lífvirku efna sem hér eru rannsökuð þótti mjög áhugavert að kanna áhrif þeirra á bakteríuflóru eldisins. Rannsökuð voru vaxtarhamlandi áhrif lífvirkra efna á stofna úr eldisumhverfi lirfa svo og áhrif þeirra á samsetningu bakteríuflórunnar.

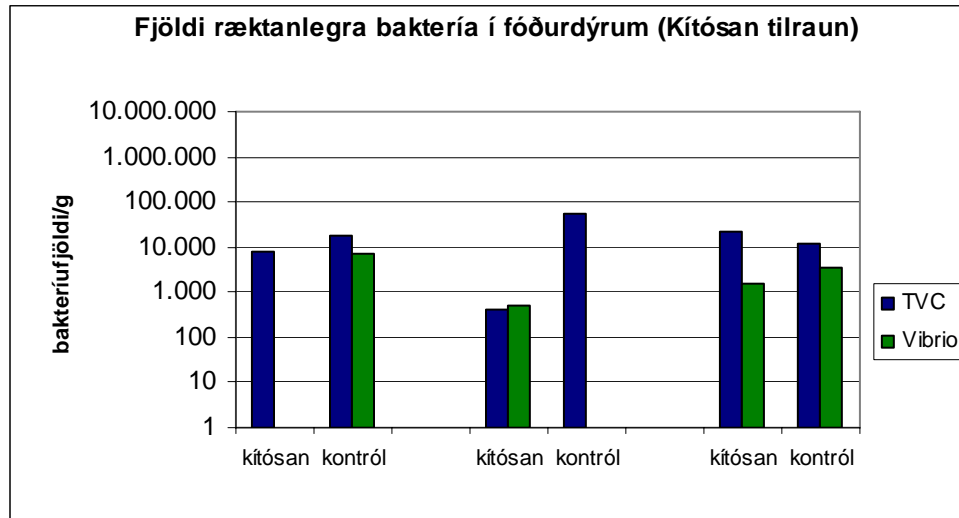
### Áhrif lífvirkra efna á valda bakteríustofna *in vitro* - rannsóknir:

Rannsókuð voru bakteríudrepani/-hamlandi áhrif lífvirkra efna á þekktar sýkingarvaldandi bakteríur sem algengt er að finna í sjó og sjávarfangi (*Vibrio fluvialis*, *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida achromogene*. og *Aeromonas salmonicida*) svo og ríkjandi stofna í fôðurdýrum og eldiseiningum lúðueldis Fiskey. Einnig var rannsókuð virkni efnanna eftir gerildehyðingu í autoclava og reyndist það ekki hafa áhrif á virkni þeirra en í sumum tilfellum reyndist gerildehyðing þó ekki möguleg því efnin brunnu við.

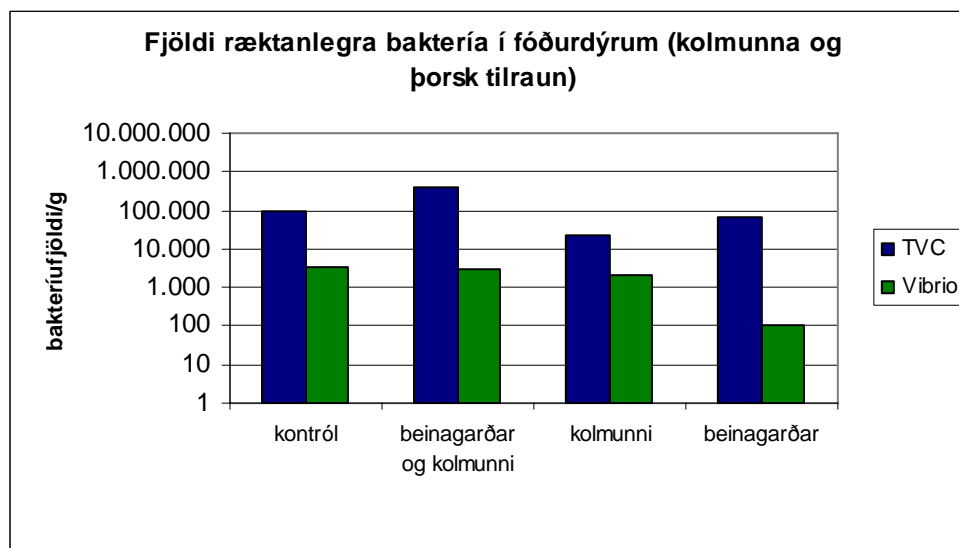
Rannsakað var næmi bakteríanna gegn 10 lífvirkum efnum eða efnablöndum í mismunandi þynningum; kítósani (3 mismunandi afurðir), kolmunnapeptíðum, ufsapeptíðum og þorskeptíðum (unnin úr vöðva, marningi, milta, augum og afskurði). Helstu niðurstöður þessara rannsókna leiddu í ljós að kítósan afurðir og ufsapeptíð höfðu ekki hamlandi áhrif á vöxt þeirra baktería sem rannsakaðar voru. Ríkjandi stofnar úr kviðpokalirfum annars vegar og his vegar lirfum í startfóðrun sýndu næmi gegn mismunandi efnum og gefa þessar niðurstöður vísbendingar um að önnur bakteríuflóra sé ríkjandi í kviðpokalirfum heldur en í lirfum í startfóðrun. Kolmunnapeptíð hömluðu vexti 6 mismunandi stofna sem voru ríkjandi í kerri þar sem afkoma lirfa úr startfóðrun reyndist slæm en þorskeptíð (úr vöðva, augum og milta) voru þau efni sem höfðu hvað mest áhrif á vöxt ríkjandi bakteríustofna úr fôðurdýrum.

Niðurstöður þessara tilrauna sýna einnig að styrkur efnanna hefur mikið að segja m.t.t. virkni þeirra skilar aukinn styrkur efna eðlilega meiri árangri. Einnig kom í ljós að meiri bakteríuhamlandi virkni var til staðar í lausnum efnanna áður en þau voru frostþurrkuð og jafnframt var hluta-virkni algeng, en hlutavirkni var það kallað þegar bakteríuvöxtur var þynnri næst holunum á agarskálunum en efnið hamlaði þó ekki fullkomlega vexti bakteríanna. Svo virðist því sem peptíðin missi lífvirkni að hluta við frostþurrkun en nauðsynlegt er þó að geyma efnin á froskþurrkuðu formi sökum mikillar fyrirferðar lausna (fryst við -20°C). Frekari niðurstöður þessara rannsókna er að finna í ársskýrslu verkefnisins (Rf skýrsla # 12-06).

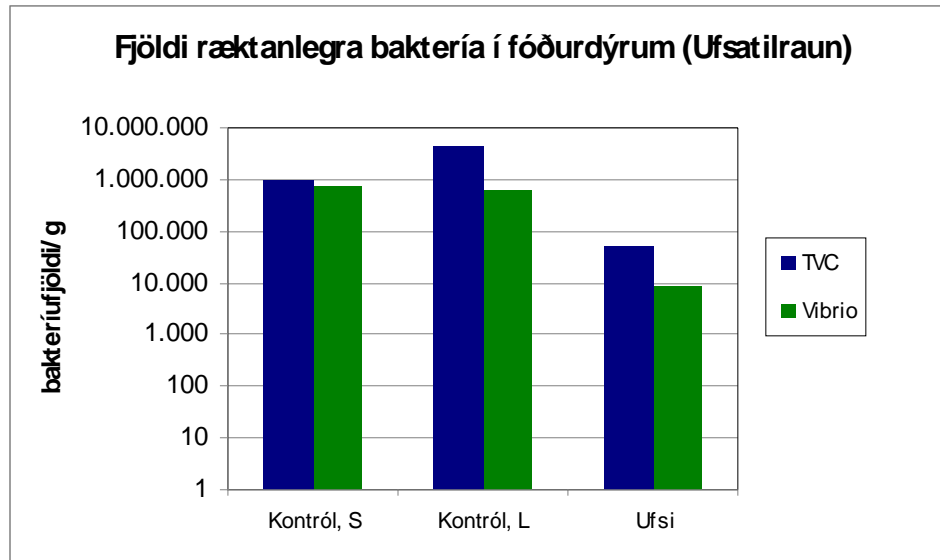
Ræktanleg bakteríuflóra: Niðurstöður sýndu að ræktanleg bakteríuflóra fôðurdýra er fremur einhæf þar sem *Vibrio* bakteríur eru ríkjandi en einnig er eitthvað um *Pleisiomonas* (Björnsdóttir 2003). Þetta er þekkt normalflóra í sjó og sjávarlífverum en einnig þekktir tækifærissýklar og sjúkdómsvaldar í fiski. Dæmi um talningar á ræktanlegri bakteríuflóru úr fôðurdýraræktunum meðhöndluðum með lífvirkum efnum má sjá á myndum 11 – 13.



Mynd 11. Þrjár aðskildar tilraunir þar sem fódurdýr voru meðhöndluð með kítósan í fitublöndu í styrknum 0.2g/L fódurdýr. Áhrif meðhöndlunar á heildarfjölda ræktanlegra baktería (TVC) og fjölda hugsanlegra Vibrio baktería.



Mynd 12. Tilraun þar sem fódurdýr voru meðhöndluð með peptíðum unnum úr kolmunna og þorskafurðum í 0.1% styrk, auk þess sem samlegðaráhrif þessarra efna eru könnuð. Áhrif meðhöndlunar á fjölda ræktanlegra baktería (TVC) og fjölda hugsanlegra Vibrio baktería.

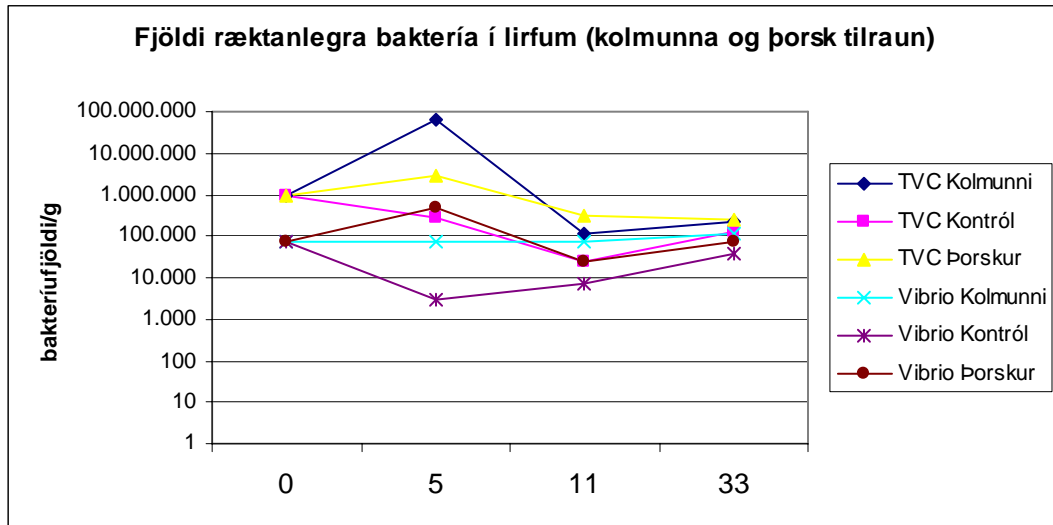


Mynd 13. Tilraun þar sem fódurdýr voru meðhöndluð með ufsapeptíðum í styrknum 0.75g/L fódurdýr. Til viðmiðunar voru tekin sýni úr stórum (S) og litlum (L) einingum þar sem meðhöndlað var með hefðbundnum hætti (Kontról). Áhrif meðhöndlunar á heildarfjölda baktería (TVC) og fjölda hugsanlegra Vibrio baktería.

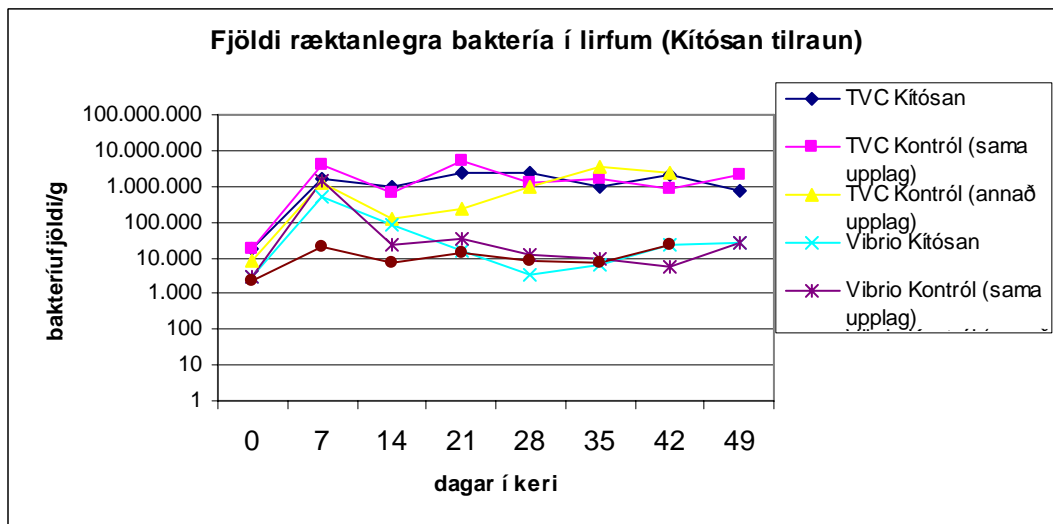
Niðurstöður sýna að gæði fódurdýra eru mjög mismunandi m.t.t. fjölda baktería. Ekkert af lífvirkum efnum sem prófuð voru hafði afgerandi áhrif á bakteríufjölda í fódurdýrunum, þó svo að þær niðurstöður hafi fengist í hluta tilraunanna (sjá mynd 13). Ef horft er á niðurstöður tilrauna sem sýndu bestu afkomu fódurdýra gæti hins vegar verið að lífvirk efni geti breytt samsetningu bakteríuflórunnar og gert hana hagkvæmari fyrir fódurdýrin þótt efnin hafi ekki áhrif í þá veru að fækka heildarfjölda baktería.

Lirfum var fylgt eftir frá kviðpokastigi til loka startfóðrunar með sýnatökum á ákveðnum dögum þar sem bakteríuflóra var rannsökuð. Niðurstöður talninga á ræktanlegri bakteríuflóru við mismunandi tilraunauppsetningar má sjá á myndum 14 - 16.

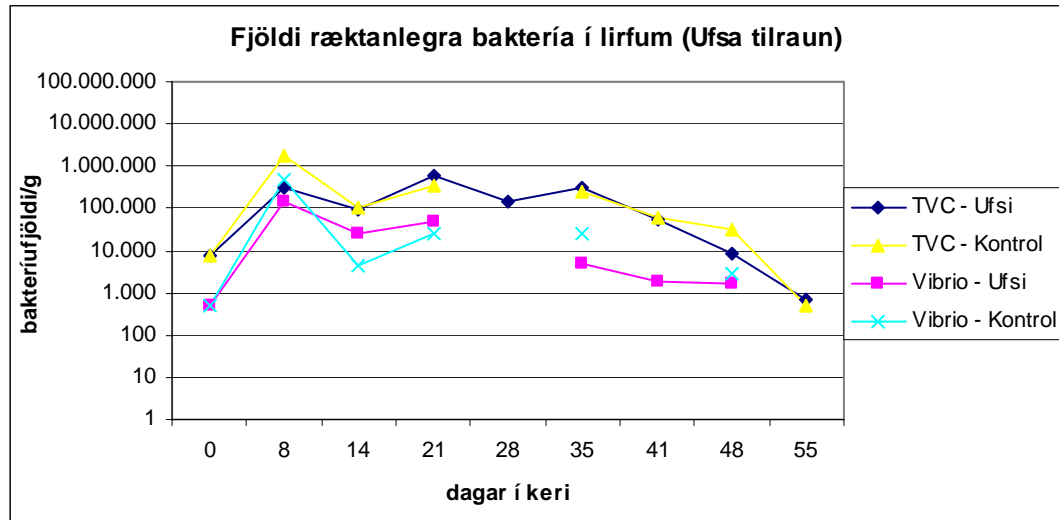




Mynd 14. Fjöldi ræktanlegra baktería í meltingarvegi lúðulirfa sem meðhöndlaðar voru með kolmunna eða þorskpeptíðum. Til samanburðar eru eldiseiningar þar sem meðhöndlað var með hefðbundnum hætti (kontról). Áhrif meðhöndlunar á heildarfjölda baktería (TVC) og fjölda hugsanlegra Vibrio baktería.



Mynd 15. Fjöldi ræktanlegra baktería í meltingarvegi lúðulirfa sem meðhöndlaðar voru með kítósan. Til samanburðar eru eldiseiningar með lifrum af sama upplagi eða öðru upplagi þar sem meðhöndlað var með hefðbundnum hætti (kontról). Áhrif meðhöndlunar á heildarfjölda baktería (TVC) og fjölda hugsanlegra Vibrio baktería.



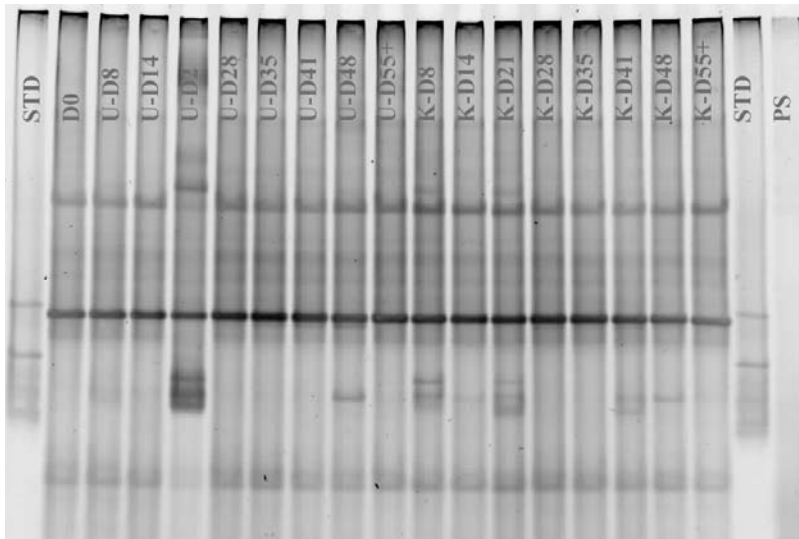
Mynd 16. Fjöldi ræktanlegra baktería í meltingarvegi lúðulirfa sem meðhöndlaðar voru með ufsapeptíðum. Til samanburðar eru eldiseiningar þar sem meðhöndlað var með hefðbundnum hætti (kontrol). Áhrif meðhöndlunar á heildarfjölda baktería (TVC) og fjölda hugsanlegra Vibrio baktería.

Niðurstöður talninga á ræktanlegum hluta bakteríuflóru gefa til kynna að lífvirk efni hafi ekki afgerandi áhrif á fjölda ræktanlegra baktería í meltingarvegi lirfa. Helst má sjá einhvern mun í tilraun 1 þar sem lirfur voru meðhöndlaðar með kolmunna og þorskpeptíðum. Þar má sjá að fjöldi *Vibrio* baktería helst stöðugur þrátt fyrir nokkrar sveiflur í heildarfjölda. Kolmunnapeptíð gætu því verið að styðja við vöxt einhverra bakteríutegunda annarra en *Vibrio* (mynd 14).

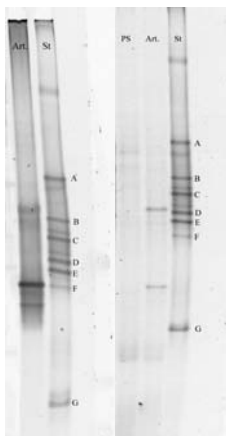
Ræktanleg bakteríuflóra var á rannsóknastofunni greind og flokkuð m.t.t. lífefnafræðilegra eiginleika (svörun í mismunandi prófum). Tólf bakteríustofnar voru valdir af handahófi úr hverju sýni og þeir flokkaðir í hópa. Þegar litið er á greiningu bakteríuflóru sem fyrirfinnst í fôðurdýrum má draga þá ályktun að fôðurdýr séu mjög misjöfn að gæðum með tilliti til samsetningar bakteríuflóru. Svo virðist sem meðhöndlun með lífvirkum efnum breyti samsetningu bakteríuflórunnar þar sem fjölbreytni er svipuð en aðrar bakteríutegundir verði ríkjandi. Í eldiseiningum þar sem meðhöndlað hafði verið með kolmunna- eða þorskpeptíðum (tilraun 1) er bakteríuflóra einnig mjög mismunandi. Við flutning lirfa yfir í startfôðrunarker virðist bakteríuflóran verða frekar einhæf og við hefðbundna meðhöndlun virðist sem bakteríuflóran haldist frekar einhæf framan af en verði fjölbreyttari þegar líður á tímabilið. Bakteríuflóra í eldiseiningum þar sem meðhöndlað var með kolmunnapeptíðum virðist vera einhæfa út allt tímabilið en aftur á móti fjölbreyttari þegar þorskpeptíðum er bætt beint út í

eldisumhverfi lirfa. Í eldiseiningum þar sem meðhöndlað var með lífvirkum efnum virðist samsetning bakteríuflóru vera önnur en er til staðar í kontróleiningum sem meðhöndluð höfðu verið með hefðbundnum aðferðum.

Mynstur heildarflóru: var kannað með sameindafræðilegum aðferðum, og niðurstöður skoðaðar á geli þar sem hver baktería kemur fram sem eitt band á myndinni (sjá mynd 17).



Mynd 17. Mynstur heildarflóru baktería í meltingarvegi lúðulirfa eftir rafdrátt á DGGE geli. Myndin sýnir mynstur flóru í sýnum sem tekin voru á mismunandi dögum í startíðrun (D0-D55+). Samsetning baktería í eldiseiningum þar sem meðhöndlað er með ufsapetríðum (U) samanborið við hefðbundna meðhöndlun (K), staðal (STD) og þynningarvökva (PS).



Mynd 18. Mynstur bakteríuflóru í fódurdýrum lúðulirfa eftir rafdrátt á DGGE geli. Sýni voru tekin af fódurdýrum á tveimur mismunandi dögum. Samsetning baktería í fódurdýrum þar sem meðhöndlað er með hefðbundnum aðferðum samanborið við staðal (ST) og þynningarvökva (PS).

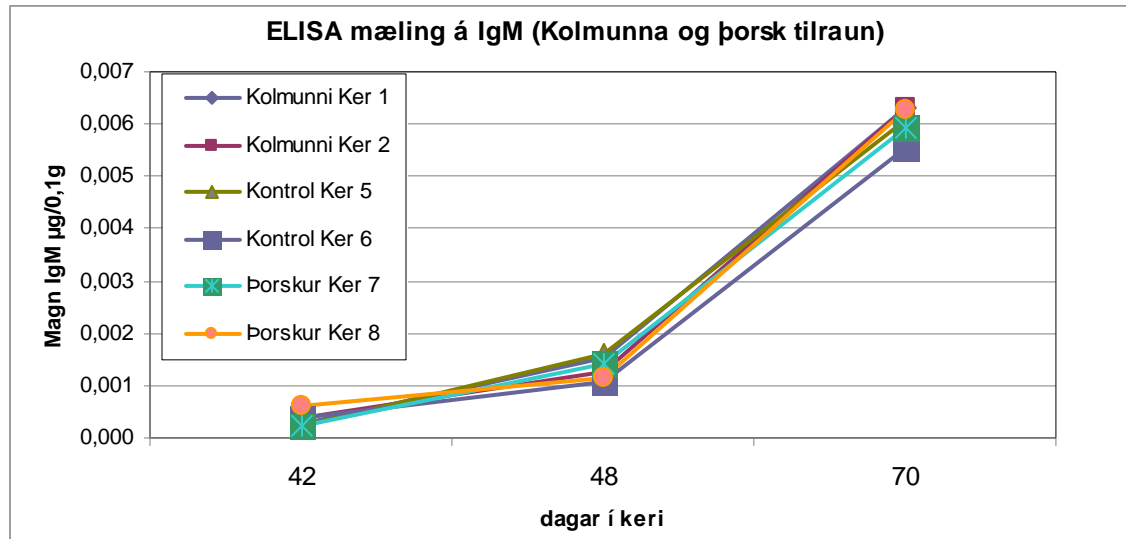
Þegar samsetning heildarflóru baktería er skoðuð sést að þrjár tegundir baktería eru til staðar allt frá byrjun til loka kviðpokastigs en þegar lirfur byrja að borða fôðurdýr verður bakteríuflóran aðeins fjölbreyttari. Athygli vekur að mynstur bakteríuflóru sem er til staðar í fôðurdýrum er mismunandi (mynd 18) og styður það fyrri niðurstöður sem gáfu vísbendingar um mismunandi gæði fôðurdýra m.t.t. heildarfjölda baktería og samsetningar ræktanlegrar flóru. Eins og sést á mynd 17 þá er enginn greinanlegur munur á samsetningu bakteríuflóru í meltingarvegi lirfa úr mismunandi eldiseiningum og má því áætla að meðhöndlun með ufsapeptíðum sé ekki að hafa áhrif á samsetningu bakteríuflóru eldiseininga á fyrstu stigum lúðueldis.

Niðurstöður þessara rannsókna benda til þess að bakteríuflóra bæði fôðurdýra og lirfa sé afar breytileg í mismunandi eldiseiningum. Kolmunnapeptíð og þorskpeptíð í ákveðnum styrk gáfu lofandi niðurstöður m.t.t. bakteríuhamlandi virkni á stofna sem einangraðir höfðu verið úr eldinu (in vitro) auk þess sem niðurstöður tilrauna í eldinu (in vivo) gáfu vísbendingar um að við meðhöndlun verði breyting á bakteríuflórunni þar sem önnur flóra virðist vera til staðar við meðhöndlun. Aftur á móti er ekki hægt að sjá að kítósan né ufsaprótein hafi áhrif á samsetningu bakteríuflóru í meltingarvegi lúðulirfa.

### **3.5. Áhrif lífvirkra efna á ósérhæfða ónæmissvörun lúðulirfa**

Rannsóknir voru gerðar á ónæmisörvandi áhrifum lífvirkra efna á lirfur í startfóðrun. Í verkefninu voru þróaðar og settar upp aðferðir til að mæla valda þætti ósérhæfðrar ónæmissvörunar lúðulirfa og var það í höndum nemanda í rannsóknatengdu meistaranámi við Viðskipta og Raunvísindadeild HA (Rutar Hermannsdóttur). Nemandinn dvaldi m.a. um hríð við rannsóknastofu í Noregi til að læra og tileinka sér aðferðir. Hér verður gerð grein fyrir helstu niðurstöðum þessara rannsókna en um frekari niðurstöður og umfjöllun þeirra er vísað til meistararitgerðar Rutar (áætluð námslok vor 2008).

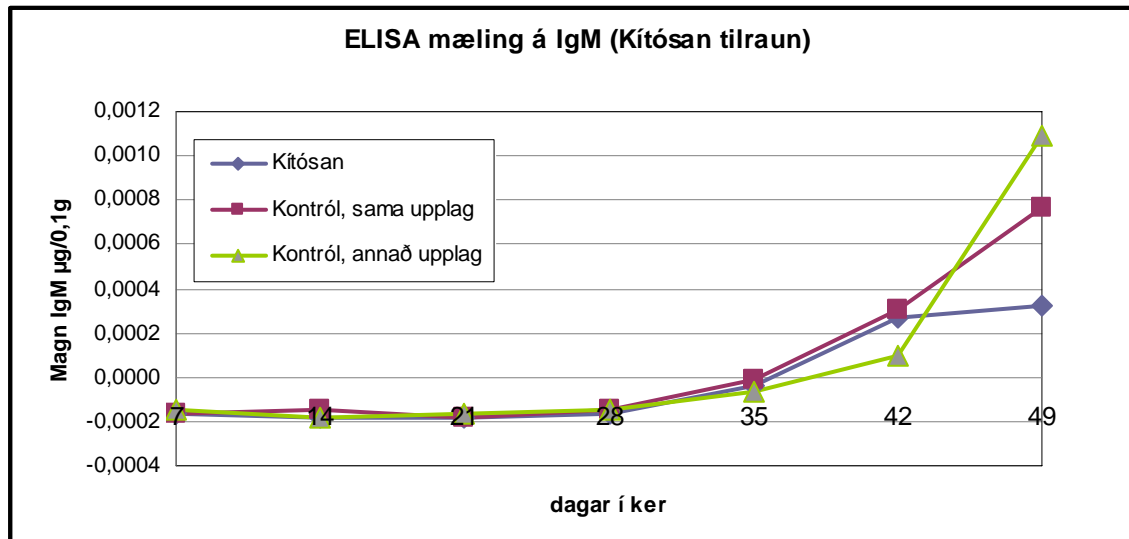
ELISA: Mælingar á magni IgM voru framkvæmdar með ELISA aðferð. Sýni voru tekin í öllum þremur tilraunauppsetningum sem framkvæmdar voru á lirfum í startfóðrun. Helstu niðurstöður á mælingum á magni IgM með ELISA aðferð eru sýndar á myndum 19 – 21.



Mynd 19. Niðurstöður IgM mælinga með ELISA aðferð. Tilraun þar sem lirfur voru meðhöndlaðar með kolmunna- og þorskpeptíðum borið saman við lirfur sem meðhöndlaðar eru á hefðbundinn hátt. Fylgst með þróun IgM framleiðslu í lirfum með sýnatökum á ákveðnum dögum (41, 48 og 70 daga í ker). Magn IgM er sett fram sem µg IgM sameinda fyrir hver 0,1g lirfa.

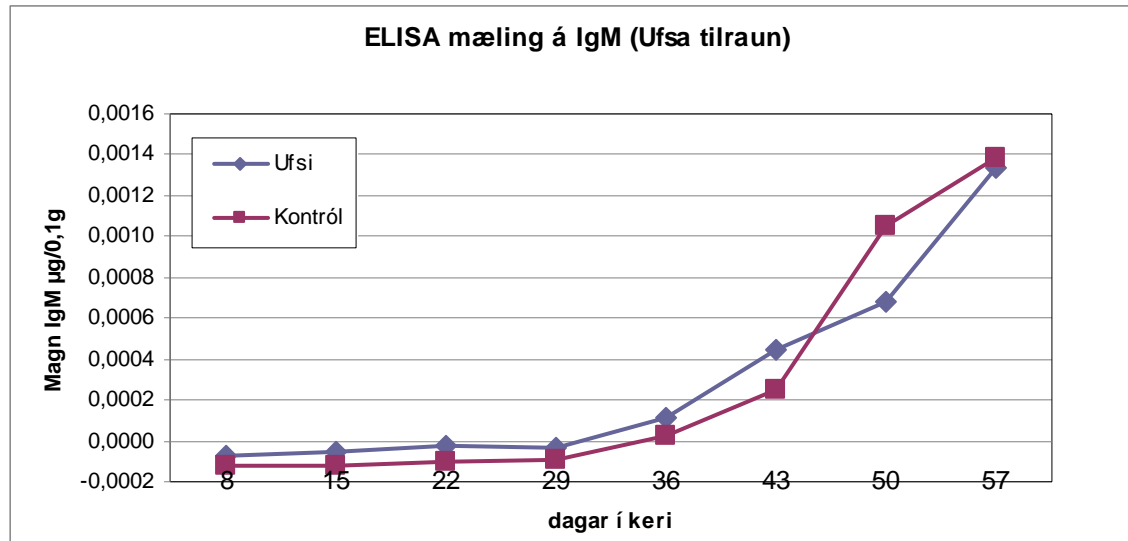
Ekki var hægt að fylgjast með IgM framleiðslu frá fyrsta degi í startfóðrun því meðhöndlun lirfa hófst ekki fyrr en á degi 38 og fyrsta sýnataka var á degi 42. Töluverð aukning var á magni IgM frá degi 42 til 48, meiri en helming aukning í öllum kerjum nema í ker 8 þar sem meðhöndlað var með þorskpeptíðum. Niðurstöður sýna að mjög mikil aukning verði á framleiðslu á IgM frá degi 48 til 70, en meðhöndlun lauk á degi 60.

Ekki sést munur á magni IgM í meðhöndluðum lirfum og ómeðhöndluðum en hæst magn IgM mældist þó í öllum tilvikum í lirfum sem meðhöndlaðar voru með kolmunnapeptíðum (mynd 19).



Mynd 20. Niðurstöður IgM mælinga með ELISA aðferð. Tilraun þar sem lirfur voru meðhöndlaðar með kítósan borð saman við lirfur af sama eða öðru upplagi sem meðhöndlaðar eru á hefðbundnum hátt. Fylgst er með þróun IgM framleiðsla með sýnatökum á ákveðnum dögum (7, 14, 21, 28, 35, 42 og 49 dagar í ker). Magn IgM er sett fram sem µg IgM sameinda fyrir hver 0,1g lirfa.

Niðurstöður benda til að framleiðsla á IgM hefjist ekki fyrr en eftir um 28 daga í startfóðrun (mynd 20). Svipað magn IgM mælist í meðhöndluðum lirfum og ómeðhöndluðum lirfum af sama upplagi (systkinaker, kontrol) fram að degi 42 en í hinum viðmiðunarhópnum þar sem um annað upplag lirfa er að ræða (kontrol) mælist töluvert minna magn IgM á degi 42. Eftir dag 42 dalar framleiðsla IgM hjá meðhöndluðu lirfunum en systkinakerið heldur sínu striki og framleiðslan hjá kontrol hópnum rýkur upp og magn IgM í þessum lirfum er við lok tímabilsins þó nokkuð hærra en í hinum hópnum. Þegar tilraun lýkur lítur út fyrir að kítósan meðhöndluðu lirfurnar standi verst að vígi hvað varðar magn IgM, eða 0,003µg/0,1g lirfa miðað við 0,0015µg/0,1g lirfa hjá lirfum með annað upplag og eru meðhöndlaðar með hefðbundnum aðferðum. Svo virðist því sem kítósan meðhöndlun, allavega í þessum styrk, hafi ekki ónæmisörvandi áhrif m.t.t. framleiðslu á IgM.



Mynd 21. Niðurstöður IgM mælinga með ELISA aðferð. Tilraun þar sem lirfur voru meðhöndlaðar með ufsapeptíðum borið saman við lirfur af sama upplagi sem fá hefðbundna meðhöndlun. Fylgst með þróun IgM framleiðsla með sýnatökum á ákveðnum dögum (8, 15, 22, 29, 36, 43, 50 og 57 dagar í kerri). Magn IgM er sett fram sem µg IgM sameinda fyrir hver 0,1g lirfa.

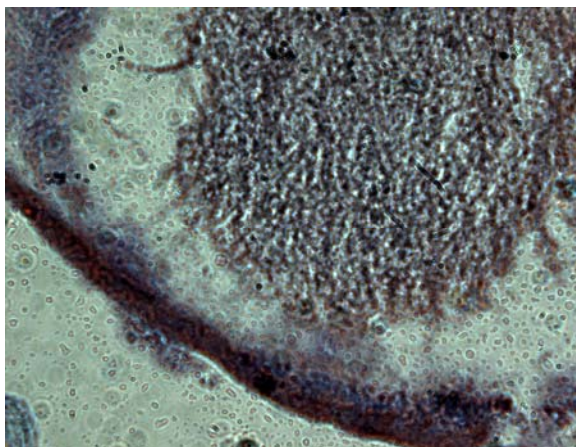
Niðurstöður sýna, eins og í fyrri tilraun, að framleiðsla IgM hefst ekki fyrr en eftir um 29 daga í startfóðrun (sjá mynd 21). Lirfur sem meðhöndlaðar voru með ufsapeptíðum virtust framleiða meira magn IgM í upphafi en á degi 50 virðist sem ómeðhöndlaðar lirfur framleiði meira magn á tímabili en í lokin er ekki merkjanlegur munur á magni IgM í meðhöndluðum og ómeðhöndluðum lirfum.

Í samantekt má segja að IgM mælist ekki í lúðulirfum fyrr en eftir um 28 daga í startfóðrun (ELISA aðferð). Lítilsháttar mældist þó í kviðpokalirfum við flutning í ker og talið sennilegt að það séu svokölluð “maternal” mótefnasameindir sem fylgja lirfunum við klak (niðurstöður ekki sýndar). Ufsapeptíð gætu mögulega verið að hafa ónæmisörvandi áhrif á lirfur þar sem fyrstu vikurnar mælist hærra magn IgM mótefna í meðhöndluðum lirfum samanborið við ómeðhöndlaðar lirfur. Enn og aftur er bent á mikilvægi þess að velja “réttan” styrk til meðhöndlunar og hugsanlega er betra að meðhöndla einungis í ákveðinn tíma t.d. fyrstu 4 vikurnar í startfóðrun.

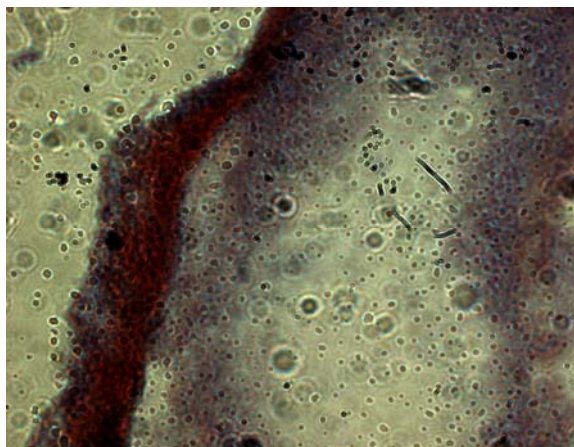
Vefjalitanir: Tilvist IgM, C3 og lysozyme í lirfum voru rannsökuð með mótefnalitunum á vefjasneiðum og má sjá dæmi um niðurstöður á myndum 22 - 31. Með þessari aðferð er ekki

hægt að greina magn mótefna og verður því samanburður mjög erfiður þar sem ekki er hægt að greina mun nema hann sé mjög mikill á milli mynda.

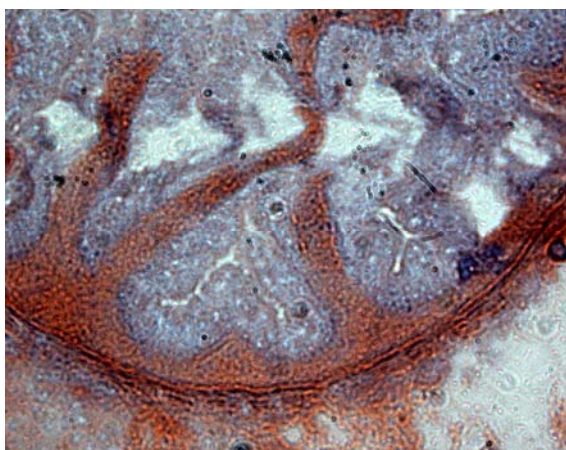
Í kviðpokalirfurum og á fyrstu dögum í startfóðrun mátti greina dauða sérhæfða bindingu C3 mótefna, einungis í slímhúð og meltingarvegi kviðpokalirfa (mynd 22 og 23). Seinna í startfóðrun mátti greina tilvist C3 í fleiri líffærum svo sem nýru, milta, lifur og brisi (mynd 24 og 25). Auk þes sem greina mátti veika tjáningu C3 í opnum hluta brisins í meðhöndluðu lirfunum sem ekki greindist hjá þeim ómeðhöndluðu (niðurstöður ekki sýndar).



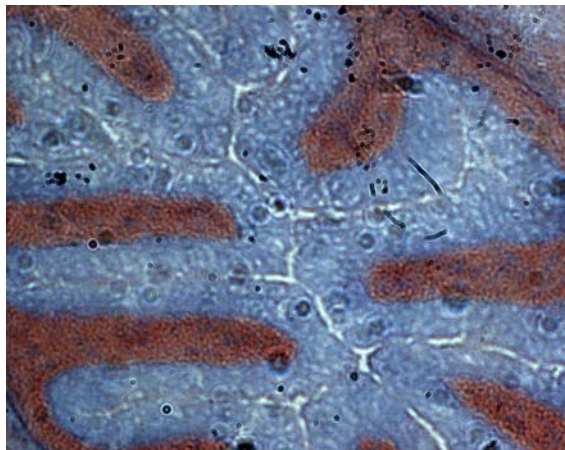
Mynd 22. Mótefnalitun með C3 mótefnum. 400x stækkun. Slímhúð og meltingarvegur kviðpokalirfa.



Mynd 23. Mótefnalitun með C3 mótefnum. 400x stækkun. Slímhúð og meltingarvegur ufsameðhöndlaðra lirfa eftir 7 daga í startfóðrun.



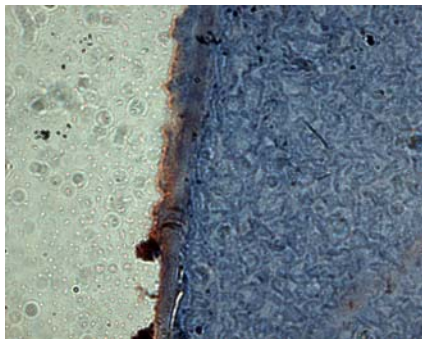
Mynd 24. Mótefnalitun með C3 mótefnum. 400x stækkun. Briskirtill ufsameðhöndlaðra lirfa eftir 49 daga í startfóðrun.



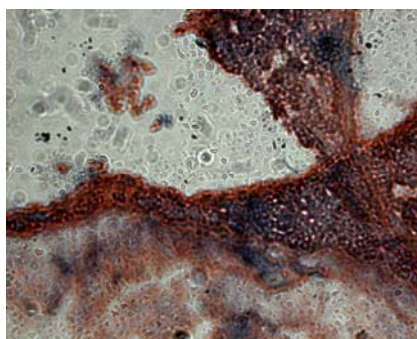
Mynd 25. Mótefnalitun með C3 mótefnum. 400x stækkun. Briskirtill lirfa sem meðhöndluð var með hefðbundnum aðferðum eftir 49 daga í startfóðrun.



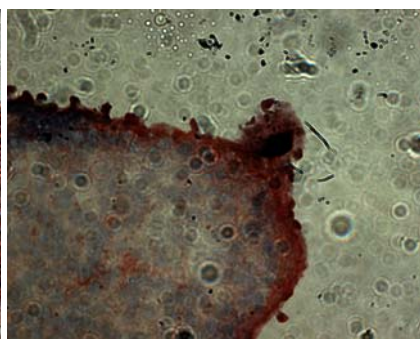
IgM greinist ekki fyrr en á 28 degi í startfóðrun og er þá í mjög litlu magni í meltingavegi og slímhúð og eykst framleiðslan jafnt og þétt eftir því sem lirfurnar stækka, greinileg aukning er á framleiðslu frá degi 28 til 49 í slímhúð (myndir 26 og 27).



Mynd 26. Mótefnalitun með IgM mótefnum. 400x stækkun. Slímhúð lirfa sem fengið hafa hefðbundna meðhöndlun eftir 28 daga í startfóðrun.



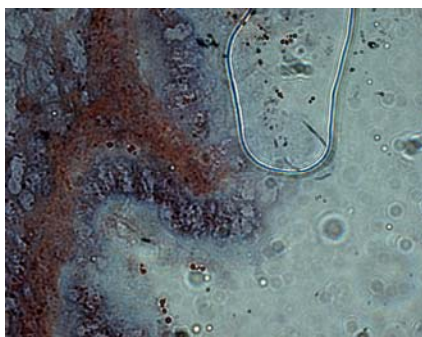
Mynd 27. Mótefnalitun með IgM mótefnum. 400x stækkun. Slímhúð lirfa sem fengið hafa hefðbundna meðhöndlun eftir 49 daga í startfóðrun.



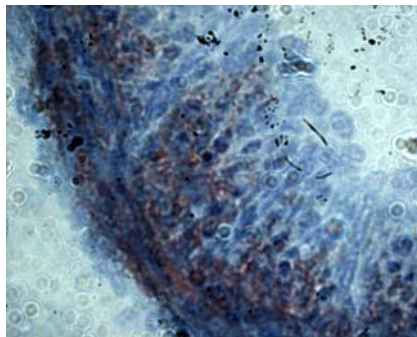
Mynd 28. Mótefnalitun með IgM mótefnum. 400x stækkun. Slímhúð ufsameðhöndlaðra lirfa eftir 49 daga í startfóðrun.

Ekki sést munur á magni IgM hjá meðhöndluðum lirfum samanborið við ómeðhöndlaðar lirfur (myndir 27 og 28).

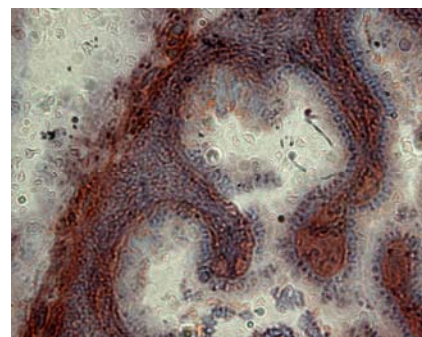
Lysozyme greinist í meltingarvegi lirfa og mest framleiðsla eftir 49 daga (myndir 29, 30 og 31). Ekki er greinanlegur munur milli meðhöndlaðra lirfa og ómeðhöndlaðra (niðurstöður ekki sýndar).



Mynd 29. Mótefnalitun með Lysozyme mótefnum. 1000x stækkun. Meltingarvegur ufsameðhöndlaðra lirfa eftir 7 daga í startfóðrun.



Mynd 30. Mótefnalitun með Lysozyme mótefnum. 1000x stækkun. Meltingarvegur ufsameðhöndlaðra lirfa eftir 28 daga í startfóðrun.



Mynd 31. Mótefnalitun með Lysozyme mótefnum. 1000x stækkun. Meltingarvegur ufsameðhöndlaðra lirfa eftir 49 daga í startfóðrun.

Heildarniðustöður mótefnalitunar á vefjasneiðum benda til að liffur fari að framleiða IgM mótefni á 28. degi í startfóðrun hins vegar virðist sem C3 og lysozyme sé til staðar allt frá kviðpokastigi til loka startfóðrunar. Ekki sést marktækur munur á magni þessara sameinda í liffum sem meðhöndlaðar voru með lífvirkum efnum samanborið við hefðbundna meðhöndlun.

Endanlegri úrvinnslu rannsókna á örvun ónæmisþátta lifra er ekki að fullu lokið en frekari niðurstöður verða kynntar í meistaraþrófsritgerð Rutar Hermannsdóttur við Viðskipta og Raunvísindadeild HA, vorið 2008.

#### **4. UMRÆÐA OG ÁLYKTANIR**

Efnin sem rannsöku voru í verkefninu voru fengin hjá framleiðendum auk þess sem gerðar voru tilraunir á framleiðslu lífvirkra efna úr vannýttum hráefnum fiskvinnslu í samvinnu við nemanda í doktorsnámi hjá Mátis ohf. (Margrét Geirsdóttir). Lofandi niðurstöður fengust við rannsóknir á kolmunnapeptíðum en vegna þess hve erfitt var að verða sér út um gott hráefni var nauðsynlegt að skipta yfir í rannsóknir á ufsapeptíðum sem sýna á sömu ef ekki meiri lífvirkni heldur en kolmunni (munnlegar heimildir frá Sigurði Haukssyni hjá Iceprotein). Í verkefninu var miðað við að rannsaka efni sem auðvelt er að verða sér út um auk þess að hafa þau áhrif sem óskað er eftir, þ.e. bakteríuhamlandi áhrif, stuðningur við æskilega bakteríuflóru eða örvun ónæmissvörunar lúðulirfa. Kítósan er vel þekkt fyrir lífvirkni sína í mönnum og eru einnig vísbendingar um að efnið geti örvað ónæmissvörun í fiskum (Soltanian 2007, Cuesta 2003). Nýlegar rannsóknir á fiskipeptíðum hafa leitt í ljós ýmiskonar lífvirkni m.a. hefur kolmunnapeptíð gefið lofandi niðurstöður m.t.t. vaxtarhamlandi áhrifa á krabbameinsfrumur (Picot 2006). Þó svo ekki hafi verið sérstaklega sýnt fram á bakteríuhamlandi virkni efnanna þá þótti áhugavert að skoða áhrif þeirra á bakteríuflóru á fyrstu stigum eldisins þar sem áhrif bakteríuflóru er vel þekkt í fiskeldi.

Viðamiklar rannsóknir hafa verið framkvæmdar á verkefnistímanum, á áhrifum þessara efna á bakteríuflóru eldisins bæði á rannsóknastofunni og í eldiseiningum lúðulirfa. Rannsóknir leiddu í ljós að kítósan og ufsapeptíð höfðu ekki bakteríuhamlandi áhrif á vöxt ríkjandi bakteríuflóru úr fóðurdyrum eða liffum. Aftur á móti virtust kolmunna- og þorskpeptíða geta hamlað vexti

sýkingarvaldandi baktería og baktería sem ríkjandi eru í eldinu, þegar efni voru prófuð í miklum styrk.

Við meðhöndlun fóðurdýra og lirfa með lífvirkum efnum var ekki hægt að sjá bakteríuhamlandi áhrif. Hins vegar virtist sem meðhöndlun með kolmunna- og þorskpeptíðum leiddi til breytinga á samsetningu ræktanlegrar bakteríuflóru og er það vísbending um að lífvirk efni geti einnig verkað “prebiotic”.

Þessar breytingar á samsetningu bakteríuflóru komu ekki fram sem breyting á mynstri heildarflóru greint með DGGE aðferð. Ljóst er hins vegar að þegar notuð er DGGE aðferð við greiningu á mynstri heildarflóru þá eru greinilegastar þær tegundir sem eru mest ríkjandi og einungis mjög fáar ræktanlegar tegundir eru sýnilegar á gelinu. Þetta gæti bent til að ræktanleg flóra sé einungis mjög lítið hlutfall heildarflóru baktería.

Þegar lítið er á eldiseiningar í framleiðslustöð lúðuseiða hjá Fiskey hf. þá er ljóst að tekist hefur að staðla allar aðferðir og meðhöndlun lirfa og fóðurdýra þannig að lífrænt álag (bakteríufjöldi) er í mjög miklu lágmarki. Því er e.t.v. ekki þörf fyrir mikla bakteríuhamlandi virkni lífvirkra efna við eldi lúðu. Aftur á móti hafa lúðulirfur á þessum tíma ekki þróað með sér sérhæft ónæmissvar og þurfa því að reiða sig á ósérhæfða ónæmissvörun sér til varnar. Niðurstöður ónæmisrannsókna gefa til kynna að e.t.v. geti lífvirku efnin örvað ónæmissvörun lúðulirfa. Niðurstöður ELISA mælinga á IgM mótefnum gefa til kynna að lúðulirfur byrji ekki að framleiða IgM í nokkrum mæli fyrr en eftir um 28 daga í startfóðrun. Ekki er hægt að fullyrða um áhrif kolmunna- og þorskpeptíða því ekki var byrjað að meðhöndla fyrr en 38 dögum eftir að startfóðrun hófst og sama með áhrif kítósans því þar var að öllum líkindum meðhöndlað með of miklum styrk efna. Aftur á móti virðist sem meðhöndlun með ufsapeptíðum auki IgM framleiðslu lirfa. Myndgreining vefjasýna benda einnig til þess að meðhöndlun lirfa með lífvirkum efnum hafi jákvæð áhrif á magn IgM sameinda í lirlifum.

ELISA er mjög næm aðferð við magnmælingar sameinda og má reikna með að sá munur sem mældist á magni IgM milli meðhöndlaðra lirfa og ómeðhöndlaðra gæti þýtt mikið magn í fjölda IgM sameinda og það haft mikla þýðingu fyrir lirlifur á þessum viðkvæmu stigum eldisins. Aftur á móti gefa niðurstöður skírt til kynna að nauðsynlegt sé að staðla betur aðferðir við meðhöndlun t.d. meðhöndla lirlifur strax í byrjun startfóðrunar og í stuttan tíma til að myndbreyting gangi betur. Jafnframt er nauðsynlegt að finna hæfilegan styrk efna við meðhöndlun.

Tilraunir í eldiseiningum fódurdýra leiddu í ljós jákvæð áhrif allra lífvirku efnanna á afkomu og gæði þegar meðhöndlað var í ákveðnum styrk og ætla má að fódurdýr nýti sér lífvirk peptíð til vaxtar þar sem aukið magn próteina sé gott fyrir afkomu og gæði fódurdýranna. Sú aðferð að nota fitublöndu fódurdýra til að koma fæðubótarefnum í lirfur í startfóðrun er þekkt og notuð í eldi lúðuseiða hjá Fiskey. Niðurstöður þessa verkefnis sýna að þessi aðferð sé best til að koma lífvirkum efnum í lirfur og koma þannig í veg fyrir óþrif sem annars mynduðust í eldiskerjum auk þess sem þá er hægt að nota minna magn efna við meðhöndlun.

Ljóst er að mikill munur er á milli eldiseininga í sjávarfiskaeldi m.t.t. afkomu og gæða lirfa í lok startfóðrunar og ber að hafa það í huga við túlkun niðurstaðna þar sem aðeins fáar eldiseiningar liggja að baki tilraunum. Þrjár aðskildar tilraunauppsetningar voru framkvæmdar í seiðaeldisstöð Fiskeyjar og af niðurstöðum þeirra má draga þá ályktun að of mikill skammtur efna getur hægt á vexti og seinkað myndbreytingu lirfa auk þess sem litur og augnfærsla getur misfarist. Kolmunna- og ufsapeptíð þóttu gefa bestu niðurstöður, þar var afkoma lirfa heldur betri og ekki marktækur munur á vexti og myndbreytingu þó svo meira hlutfall lirfa hafi ekki orðið að seiðum í samanburði við viðmiðunareiningar. Greinileg merki eituráhrifa komu í ljós í kítósan tilraun þar sem lirfur hættu að taka til sín fæðu og voru lirfur því minni í lok tímabils í samanburði við viðmiðunareiningar og ekki ljóst hvaða áhrif kítósan hefur ef meðhöndlað væri með réttum styrk efna.

Ef til vill má segja að áhugaverðustu niðurstöður þessa verkefnis séu þær að með notkun lífvirkra efna sé komin leið til þess að örva ónæmissvörun lúðulirfa og gera þær hæfari til að takast á við það álag sem er í eldisumhverfi þeirra á þessum viðkvæmu stigum eldisins. En sú þekking gæti skipt miklu máli við að auka afkomu og gæði lirfa í startfóðrun og jafnframt skapað Íslendingum og íslensku sjávarfiskaeldi ákveðið forskot í samkeppni við nágrannaþjóðir og aðrar samkeppnisþjóðir okkar.

Framvinda verkefnisins hefur í stórum dráttum verið eins og ráð var fyrir gert í verkefnaumsóknnum til sjóðsins þó svo skipta þurfti út kolmunnapeptíðum fyrir ufsapeptíð á miðju tímabili. Í tengslum við verkefnið hafa verið settar upp nýjar aðferðir við ónæmisrannsóknir í rannsóknaraðstöðu Matís/HA að Borgum í samvinnu við erlenda sérfræðinga og hefur það skapað aðstæður fyrir ný verkefni í framtíðinni. Niðurstöður þessa verkefnis hafa orðið til þess að settar hafa verið af stað rannsóknir á áhrifum lífvirkra efna á fyrstu stigum þorskeldis þar sem e.t.v. má búast við enn meiri árangri þar sem ekki hefur tekist

eins vel að minnka lífrænt álag í eldiseiningum eins og í lúðueldinu. Vafalítið verða einnig gerðar endurtekningar á áhrifum lífvirkra efna á fyrstu stigum lúðueldis þar sem niðurstöður þessara tilrauna voru lofandi og ljóst er að hægt er að nota lífvirk efni með góðum árangri á fyrstu stigum lúðueldis ef meðhöndlað er með réttum styrk efna.

## **5. KOSTNAÐUR**

Heildarkostnaður verkefnisins var í umsókn áætlaður kr. 24,9 M króna og var stór hluti kostnaðar framlag Fiskey hf. Á verkefnistímanum var jafnframt tekin ákvörðun um að bæta við rannsóknum þar sem bakteríuflóra eldiseininga lúðulirfa var kortlögð og var kostnaður við þann verkþátt að hluta til greiddur af verkefninu. Auk veglegrar viðbótarfjármögnunar annarra þátttakenda í verkefninu, var verkefnið styrkt með 10,1 M króna úr Líftæknineti HA og um 500 þús. króna frá Háskólasjóði KEA.

## **6. ÞAKKARORÐ**

Þetta verkefni er styrkt af Líftæknineti HA og er þeim þakkað fyrir stuðninginn. Auk þess sem þakkað er fyrir veittan styrk frá Háskólasjóði KEA sem nýttur var af nemanda í meistaranámi, Rut Hermannsdóttur m.a. til námsdvalar í Noregi til að læra nýjar rannsóknaraðferðir sem notaðar voru til ónæmisfræðirannsókna í verkefninu.

Starfsmönnum Náttúrufræðistofnunar, Akureyrarseturs er þakkað gott samstarf við sameindafræðilegar greiningar á bakteríusýnum, auk þess sem Oddi Vilhelmssyni Dósent við HA er þakkað fyrir góð ráð við próteinrannsóknir. Starfsmönnum Prokaria er þakkað fyrir samstarfið.

Fyrirtæki sem er þátttakandi í verkefninu, Fiskey hf. leggur til aðstöðuna og hefði ekki verið hægt að framkvæma þessar tilraunir án þeirra. Starfsmenn Fiskey fá kærar þakkir fyrir ómetanlega aðstoð og velvilja. Auk þessa eru önnu fyrirtæki sem hafa komið að þessu verkefni m.a. með því að leggja til efnivið til framleiðslu lífvirkra efna. Þetta eru BRIM hf., Genís hf. og Iceprotein ehf. og viljum við þakka þeim kærlega fyrir. Mótefni sem notuð voru til rannsókna voru fengin frá Sjávarútvegsháskólanum í Tromsø og frá Tilraunastöð Háskóla Íslands að Keldum og er þeim þakkað fyrir sitt framlag.

## 7. HEIMILDIR

- Beyer, RE. 1983. A rapið BIURET assey for protein of whole fatty tissues. *Analytical Biochemistry*. 129: 483-485.
- Boshra, H. J. Li1 and J.O. Sunyer. 2006. Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*. 20: 239-262
- Björnsdóttir, R og H. Smáradóttir. 2003. Stýring örveruflóru í startfóðrunarkerjum lúðulirfa (Rannís ver.#010 840 001) Lokaskýrsla. #21-03
- Couso, N. R. Castro, B. Magarinos, A. Obach and J. Lamas. 2003. Effect of oral administration of glucans on the resistance of gilthead seabream to pasteurellosis. *Aquaculture*. 219: 99-109
- Cuesta, A., M.A. Esteban and J. Meseguer. 2003. In vitro effect of chitin particles on the innate cellular immune system of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & shellfish immunology*. 15: 1-11
- Dalmo, R.A., K. Ingebrigsten, B. Sveinbjornsson and R. Seljelid. 1996. Accumulation of immunomodulatory laminaran (beta (1,3)-D-glucan) in the heart, spleen and kidney of Atlantic cod, *Gadus morhua*. *J Fish Dis*. 19: 129-36
- Dixon, B and R.J.M. Stet. 2001. The relationship between major histocompatibility receptors and innate immunity in teleost fish. *Dev Comp Immunol*. 25: 683-700
- Elward, K and P. Gasque. 2003. “Eat me” and “don’t eat me” signals govern the innate immune response and tissue repair in the CNS: emphasis on the critical role of the complement system. *Mol Immunol*. 40: 85-94
- Evans, P.S. P.J. Enders, C. Yin, T.J. Ruckwardt, M. Malkovsky and C.D. Pauza. 2001. In vitro stimulation with a non-peptidic alkylphosphate expands cells expressing V gamma 2-J gamma 1.2/V delta 2 T-cell receptors *Immunology*. 104:19-27
- Fearon, DT. 1997. Seeking wisdom in innate immunity. *Nature* 4: 388:323
- Griffiths, S., K. Melville, M. Cook, S. Vincent, M. St Pierre 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: 355-363
- Jensen, S., L. Ovreas, O. Bergh and V. Torsvik. 2004. Phylogenetic analysis of bacterial communities associated with larvae of the Atlantic halibut propose succession from a uniform normal flora. *Systematic and applied microbiology*. 27: 728-736
- Kristinsson, H.G. and B.A. Rasco. 2000. Fish protein hydrolysates: Production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.40: 43-81
- Kim, I.H., D.G. Lee, S.H. Lee, J.M. Ha, B.J. Ha, S.K. Kim and J.H. Lee. 2007. Antibacterial activity of *Ulva lactuca* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Biotechnology and bioprocess engineering* 12: 579-582
- Lange, S. S. Bambir, A.W. Dodds and B. Magnadóttir. 2004a. An immunohistochemical study on complement component C3 in juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Developmental & Comparative Immunology*. 28: 593-601
- Lange S. S. Bambir, A.W. Dodds and B. Magnadóttir. 2004b. The ontogeny of complement component C3 in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) e an immunohistochemical study. *Fish Shellfish Immunol*, 16: 359-67
- Lo, D., L. Feng, M.J. Carson, M. Crowley, M. Pauza, A. Nguyen and C.R. Reilly. 1999. Integrating innate and adaptive immunity in the whole animal. *Immunol Rev*. 169:225e39.

- Magnadottir, B. 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish immunology*, 20: 137-151
- Magnadottir, B. S. Lange, S. Gudmundsdottir, J. Bøggwald. and R.A. Dalmo. 2005. Ontogeny of humoral immune parameters in fish. *Fish & Shellfish Immunology* 19: 429-439.
- Makridis, P., A.J. Fjellheim, J. Skjermo and O. Vadstein. 2000. Colonization of the gut in first feeding turbot by bacterial strains added to the water or bioencapsulated in rotifers *Aquaculture Int.*, 8: 367-380
- Medzhitov, R and C.A. Janeway. 2002. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*; 296: 298-300
- Nakao, M. and T. Yano. 1998. Structural and functional identification of complement components of the bony fish, carp (*Cyprinus carpio*). *Immunological reviews*. 166: 27-38
- Neumann, N.F. J.L. Stafford, D. Barreda, A.J. Ainsworth and M. Belosevic. 2001. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Dev Comp Immunol*. 25: 807-25
- Olafsen, J.A. 2001. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture*, 200: 223-247
- Picot, L., S. Bordenave, S. Didelot, I. Fruitier-Arnaudin, F. Sannier, G. Thorkelsson, J.P. Berge', F. Gue'ard, A. Chabeaud and J.M. Piot. 2006. Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. *Process Biochemistry* 41: 1217-1222
- Press, McL, B.H. Dannevig and T. Landsverk. 1994. Immune and enzyme histochemical phenotypes of lymphoid and nonlymphoid cells within the spleen and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Shellfish Immunol*. 4: 79-93
- Skirnisdottir, S., G.O. Hreggvidsson, S. Hjörleifsdottir, V.T. Marteinson, S.K. Petursdottir, O. Holst and J.K. Kristjansson. 2000. Influence of sulfide and temperature on species composition and community structure of hot spring microbial mats. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 2835-2841
- Soltanian S, TQ Thai, J Dhont, J Dhonta, P Sorgeloosa and P Bossiera. 2007. The protective effect against *Vibrio campbellii* in *Artemia nauplii* by pure beta-glucan and isogenic yeast cells differing in beta-glucan and chitin content operated with a source-dependent time lag. *Fish and shellfish immunology*. 23: 1003-1014
- Verner-Jeffreys, DW, RJ Shields, IR Bricknell and TH. 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