



**OPPDRETT AV MARINE LARVER
2004-2006**

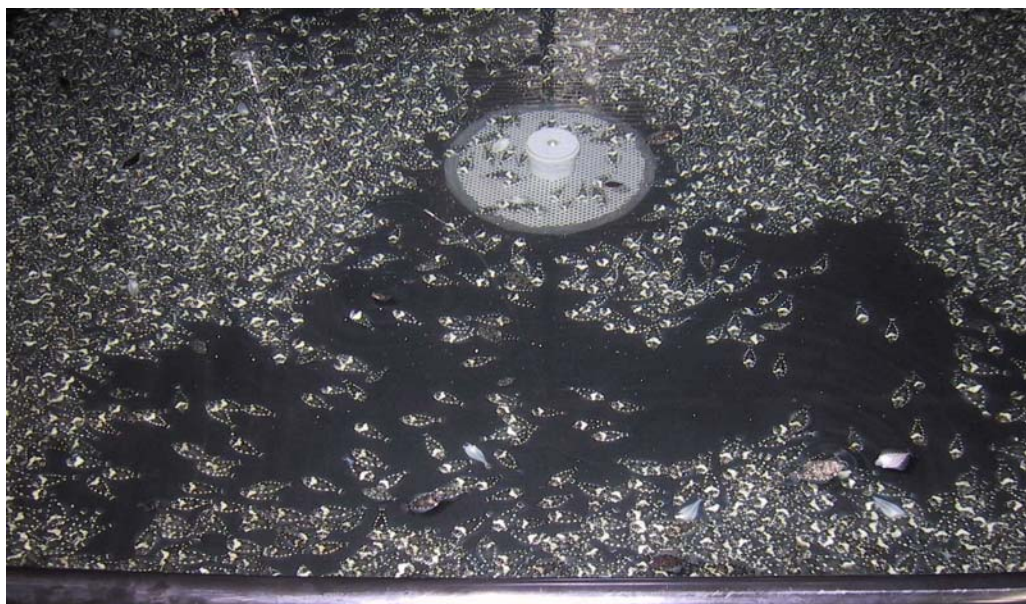


Photo: Fiskey Ltd.

Rannveig Björnsdóttir
Icelandic fisheries laboratories / University of Akureyri

Sluttrapport til NORDISK ATLANTSAMARBEID
Mars 2006



Innholdsfortegnelse:

1	Forord	3
2	Prosjekt deltagere	4
3	Bakgrunn.	5
4	Målsetning.....	7
5	Metoder.	8
5.1	Behandling med probiotiske bakterier	8
5.2	Karakterisering av mikroflora	8
5.3	Effekt av probiotiske bakterier på dominerende bakterieflora (in vitro forsøk)	9
6	Resultater og diskusjon	9
6.1	Behandling i kveiteoppdrett	9
6.1.1	Behandling av larver	9
6.1.2	Behandling av Artemia.....	12
6.2	Behandling i torskeoppdrett	16
7	Kort sammenfatning.....	17
8	Referanser.....	18



NORDISK ATLANTSAMARBEJDE

1 Forord

Dette er sluttrapport for prosjektet “Oppdrett av marine larver” som er et samarbeidsprosjekt mellom Icelandic fisheries laboratories/University of Akureyri, Fiskey Ltd. og Holar Agricultural University i Island, Bodø Regional University i Norge og Fiskaaling P/f i Færøyene.

Prosjektet startet i januar 2004 og avsluttes med denne rapporten i mars 2006. Prosjektet hadde en økonomisk ramme på tilsammen 789.646 NOK og ble tildelt NOK 300.000 av Nora.

Prosjektet ble gjennomført parallelt med et større nasjonal prosjekt på Island (Preventive measures in marine aquaculture, 2004-2006). Prosjektet har igjennom prosjektiden vært presentert på deletagernes hjemmesider og resultater fra begge prosjektene har vært presentert på møter, seminarer og workshops i Island.

Vi vil takke Nora for den økonomiske støtten, som har ført til et produktivt samarbeide mellom partnere. Dette samarbeidet vil fortsette videre i nye prosjekt innenfor samme og nye forskningsområder.

13. mars 2006

På vegne av prosjektdeltakerne,

Rannveig Björnsdóttir, prosjektleder



2 Projekt deltagere

Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins (Icelandic fisheries laboratories) / Universitetet i Akureyri

Kontaktperson: Rannveig Björnsdóttir, leder Avdeling for akvakultur

Glerargata 36, IS-600 Akureyri, ISLAND

e-mail: rannveig@rf.is (rannveig@unak.is)

Tel: +354 895 2176 (+354 463 0900)

Fax: +354 462 5216

Hjemmside: <http://www.rf.is>



Fiskey Ltd.

Kontaktperson: Heiddis Smaradóttir, forskningsjef

e-mail: heiddis@fiskey.is

Glerargata 34, IS-600 Akureyri, ISLAND

Tel: +354 462 7489

Fax: +354 462 7171

Hjemmside: <http://www.fiskey.is>



Bodø Regional Universitet

Kontaktperson: Prof. Christel Solberg

e-mail: christel.solberg@hibo.no

N-8049 Bodø, NORGE

Tel: +47 75 51 73 52

Fax: +47 75 51 73 49

Hjemmside: <http://www.bodo.no>



Fiskaaling A/S - Aquaculture Research Station of the Faroe Islands.

Kontaktperson: Ingolf Johansen, direktør

e-mail: ingolf@fiskaaling.fo

Við Áir, FO-430 Hvalvík, FÆROYENE

Tel: +298 47 47 47

Fax: +298 47 47 48

Hjemmside: <http://fiskaaling.fo>



Holar Agricultural College (HAC)

Kontaktperson: Helgi Thorarensen, leder avdeling for akvakultur

e-mail: helgi@holar.is

Holar í Hjaltadal, IS-551 Saudarkrokur, ISLAND

Tel: +354 455 6300

Fax: +354 455 6301

Hjemmside: <http://www.holar.is>





NORDISK ATLANTSAMARBEJDE

3 Bakgrunn.

Voksende interesse for oppdrett av torsk skyldes blandt annet redusert fangst av vill torsk samtidig som etterspørsel øker (økt human konsum) (FAO 2004). De siste 30 årene har fangst av vill torsk blitt redusert fra rundt fire million tonn til under en million tonn og økning i fangst av vill torsk er ikke foresatt (FAO 2006). Økt etterspørsel (konsum) vil derfor kun bli møtt med økning i oppdrett og torskeoppdrett anses som et viktig satsingsområde i bl.a. de Nordiske land. På konferansen "Sats på torsk" som holdes i Norge hvert år, blir det klart framstilt hvor viktig torskeoppdrett er for de Nordiske landene. Torskeoppdrett vurderes ikke som lønnsom pr. i dag og en del av årsaken til dette er stor dødelighet i de første stadiene av produksjonen (egg – yngel).

Kveite er den største av flatfiskartene og er et verdifullt produkt i akvakultur. Akvakultur av kveite er praktisert i en rekke land, bl.a. Island, Norge, UK og Canada. Til sammen produserte disse landene rundt 1,000 tonn av kveite i 2002 (www.growfish.com.au). Yngeldødelighet er et omfattende problem i oppdrett av kveite og andre marine larver, og kun en liten prosentdel rekker å bli fullstendig utviklet (www.growfish.com.au).

Resultater fra forrige forsøk på kveite gir en indikasjon på at denne dødeligheten i stor grad skyldes bakterievekst, både stor tetthet bakterier og "feil" sammensetning av bakterieflora på egg, yngel og i oppdrettsmiljøet (Verner-Jeffreys *et al.* 2003, Björnsdóttir & Smáradóttir 2003, Lauzon & Björnsdóttir 2006). Resultater fra disse og andre forsøk viser videre at både antall og sammensetning av bakteriearter bestemmes til en stor grad av miljøforhold og fôrkvalitet (levende dyreplankton, *Artemia*) (Olafsen 2001). Kvalitet av egg og plommesekeyngel vil igjen påvirke kvalitet, og overlevelse av larver etter at første fôring starter.

Torskeyngel må også ha levende fôr i startfôringsfasen (Rotifers, *Artemia*), og de samme problemene har vist seg at oppså her. Vekst af opportunistiske og patogene mikroorganismer i intensiv oppdrett af marine larver er generelt sett et stort problem som fører til dårlig vekst og stor dødelighet. Det er derfor viktig at fokusere på denne perioden i oppdrett av marine yngel.

Tarmflora etablers kort tid etter klekking av marine larver, blandt annet på grunn av larvenes trang til å "drikke" for å kunne osmoregulere (Olafsen 2001, Lillehaug *et al.* 2003). Det kunne derfor være nødvendig med probiotisk eller mikrobiologisk modning av miljøet (sjøvannet) ved hjelp av non-opportunistiske bakterier i denne kritiske fasen (Makridis *et al.* 2000a, Gatesoupe 1999, Skjermo & Vadstein 1999). Bruk av mikrobiologisk modent vann ved startfôring av marine larver har vist seg at påvirke tettheten av tarmsystemets mikroflora, som igjen kan føre til økt fôrinntak og vekst (Paniagua *et al.* 2001). Introduisering av probiotiske bakterier gjennom levende fôr i startfôringsfasen er også interessant og har vist seg at føre til økt overlevelse av larver samt økt resistens mot sykdom (Macey & Coyne 2005, Makridis *et al.* 2000b).

Behandling med positive bakterier (probiotika) og immunstimulanter burde derfor undersøkes nærmere i forsøk ved at forbedre helse og kvalitet av marine larver i oppdrett (Macey & Coyne 2005).



NORDISK ATLANTSAMARBEJDE

Fiskey Ltd. har mange års erfaring av produksjon av kveitelarver, med over halvparten av verdensproduksjonen de siste årene. Intensiv oppdrett av torsk er derimot en relativt ung industri i begge ansøkningslandene. Torsken har lenge vært den mest verdifulle fiskearten i de Nordiske land som har lang erfaring i salg av torsk og produkter laget av torsk. I 005 ble r Rundt 200 tusen torskelarver produsert i Island og hele 9 millioner i Norge. Stor dødelighet under de første utviklingsstadiene har hittil vær møtt med økt produksjonsmengde, noe som ikke er en akseptabel løsning for fremtiden.

Det er derfor særdeles viktig at forbedre metoder ved intensive produksjon av larver, og utvikle metoder for at kontrollere bakterievekst i de første stadiene av produksjonen. Dette har hittil vært gjort igjennom behandling med forskjellige kjemikalier i diverse stadier av produksjonen. Behandling med kjemikalier er ikke ønskelig, spesielt mht. utvikling av immunitet blant dominerende bakterieflora (Olafsen 2001, Keller & Zengler 2004, Bergh & Evensen 2002). Bruk av "positiv" bakterieflora (probiotik bakterier) for at øke vekst og forbedre immunitet overfor sykdomsfremkallende og mindre ønskelige bakterie arter er derfor ønskelig (Olafsen 2001, Gatesoupe 1999).

Probiotik bakterier har vært definert som levende bakterier som utøver positive effect ved at øke mikrobiologisk likevekt i individets fordøyelseskanaal" (Skjermo & Vadstein 1999, Halami *et al.* 1999, Olafsen 2001). Ved fremstilling av probiotiske bakterier for fisk har en relatert til forskning på probiotiske bakterier for mennesker og andre dyr. De første probiotik løsningene for fisk på markedet bestod i hovedsak av melkesyrebakterier men i neste omgang også av arter som viste seg at ha f.eks hamlende effekt på vekst av uønskelige bakterier in vitro i tillegg til arter som er naturlig forekommende i havets miljø (*Vibrio spp*, *Bacillus*, *Pseudomonas* ofl.) (Makridis *et al.* 2000a, Paniagua *et al.* 2001, Wong *et al.* 2004, Halami *et al.* 1999). Probiotik bakterier har i mange tilfeller vist seg å ha positiv effekt på vekst og kvalitet av marine larve ved at hindre at sykdomsfremkallende bakterier får overtaket eller ved at stimulere larvenes immunforsvar (Macey & Coyne 2005, Gullian *et al.* 2004). Probiotik bakterier har først og fremst vært utviklet for bruk i oppdrett av varmtvannsararter. En rekke av de produktene som kan fås kjøpt på markedet, har vært testet hos Fiskey Ltd. Disse forsøkene viser bl.a. at bakterier i produktene ikke kunne påvises i larvenes fordøyelseskanaal eller oppdrettsmiljø ved dyrkning i laboratoriet. Dette er sannsynligvis en indikasjon på at disse artene ikke overlever eller er i stand til at etablere seg og vokse ved f.eks de temperaturforhold som brukes (4-11°C) (Lillehaug *et al.* 2003, Bernard *et al.* 2000). Dessuten påpekes at mange bakteriearter i kalde og næringsfattige miljø vokser som regel dårlig i næringmedia i laboratoriet ("viable but non-culturable") (Giuliano *et al.* 1999, Bergh & Evensen 2002, Björnsdóttir & Smáradóttir 2003).

Erfaringer fra oppdrett av kveite i Island gir en indikasjon på at dødeligheten i de første stadiene av produksjonen til en stor grad skyldes bakterievekst, dvs. både antall og oppblomstring av arter som påvirker vekst og utvikling av yngel på en negativ måte uten at være sykdomsfremkallende.

Prosjektets målsetning var å undersøke om behandling med en blanding av probiotik bakterier kunne brukes for å påvirke og styre sammensetning av bakterieflora i larvenes oppdrettsmiljø



NORDISK ATLANTSAMARBEJDE

eller fordøyelseskana (kveite, torsk). Resultater fra et pre-forsøk i kveiteanlegg på Island, viste at vekst og overlevelse av larver ble tydelig forbedret ved behandling av larver med denne blandingen i plommesekkstadiet. Effekt av behandling med denne blandingen ble også undersøkt i andre utviklingsstadier i perioden fra klekking av rogn til slutt av startføring, dvs. i forskjellige tidspunkt av en ca. 100 dagers periode. Videre var det interesse for å undersøke om behandling med denne probiotik-blanding gav lignende resultat i oppdrett av samme art i et annet land (produksjon av kveiteyngel i Norge) samt i oppdrett av en annen marin art (produksjon av torskeyngel i Island).

4 Målsetning.

Prosjektets hoved målsetning var at bidra til økt stabilitet og overlevelse ved produksjon av marine larver, noe som i tillegg danner grunnlag for redusert bruk av kjemikalier. Dette ville føre til en økt konkurransedyktighet og mulighet for produksjon av marine larver i oppdrett, i samarbeide mellom Island, Færøyene og Norge.

Forsøk ble gjennomført hvor sammensetning av bakterieflora i de første utviklingsstadiene av kveite og torsk ble forandret ved behandling med probiotik bakterier. Bakteriene ble tilsatt larvenes oppdrettsmiljø i de første stadiene av utviklingen. Effekt av behandling ble evaluert mhp. vekst og overlevelse av larver. Bakteriefloa ble også undersøkt og antall bakterier samt sammensetning av bakterieflora relatert til vekst og overlevelse av larver.

Hoved målsetningen var at øke stabilitet i produksjonen. Forrige undersøkelser gav en indikasjon på at økt stabilitet vil gi økt overlevelse av larver i dette sensitive stadiet av produksjonen, noe som bidrar til økt effektivitet ved produksjon av kveitelarver. Det var også av interesse at undersøke om dette gjelder også ved oppdrett av andre marine arter ss. torsk, noe som kan bidra til økt effektivitet i oppdrett av marine larver i ansøkningslandene generelt.

Prosjektet har på den måten bidratt til økt effektivitet i oppdrett av marine arter i ansøkningslandene, hvor stor dødelighet oppstår generelt i de første stadiene.

Igjennom prosjektet er det etablert kontakt, samarbeid og utveksling av erfaring og løsning av oppgaver i fellesskap, mellom deltagerlandene. Resultater fra forsøkene viser at behandling med probiotik bakterier i de første stadiene av produksjonen, kan påvirke vekst og utvikling av marine larver i oppdrett (kveite, torsk). Prosjektet har derfor ført til innovasjon som bidrar til at torskeoppdrett kan bli en økonomisk attraktiv industri i disse to landene hvor bebyggelse er til en stor grad avhengig av torsk. Prosjektet har videre fungert som inspirasjon til ytterligere samarbeid innenfor oppdrett av marine larver og innenfor nye forskningsområder i et større nettverk og samarbeide mellom de Nordiske land. Samarbeid mellom de Nordiske land er av meget viktig, ikke minst for å tjene på hverandres mangeårige erfaring innenfor oppdrett av laks og andre fiskearter.



5 Metoder.

5.1 *Behandling med probiotiske bakterier*

Effekt av behandling med selekterte probiotiske bakterier (PRO) ble undersøkt i en rekke atskilte forsøk i perioden febr 2004 til des 2005. Bakteriene ble introdusert via eggene/larvenes miljø i tillegg til behandling i gjennom fôret (*Artemia*, Rotifes) og effekt på vekst og overlevelse av egg og larver ble undersøkt. Effekt av behandling ble også evaluert mht. bakterieflora og forandringer i antall og sammensetning av bakterier i larvenes oppdrettsmiljø, fordøyelseskanal og fôr. I tillegg ble det undersøkt om tradisjonell behandling med kjemikalier kan bli redusert ved behandling med PRO i diverse stadier av produksjonen. Resultater fra forrige forsk viser at redusert behandling med kjemikalier vil føre til stor økning i antall bakterier samt økt dødelighet og dårlig vekst av larver. I prosjektet ble hoved vekt lagt på utvikling av praktiske metoder og teknikker som kan anvendes for at øke produktivitet innenfor marin akvakultur. Forsøkene ble planlagt mht. resultater fra mange års forskningssamarbeide mellom Fiskey Ltd. og IFL/UnAk i Island, finansiert av bl.a. the National Research Council i Island (*Mikroflora og kontroll av mikroflora ved startforing av kveitelarver*).

Kveitelarver er tilgjengelige i over syv måneder av året hvor kjønnsmodning av foreldrefisk er kontrollert med lysregime, men torskelarver er kun produsert en gang i året. Produksjon av marin yngel er en lang og sensitiv prosess. Forsøk må derfor planlegges nøye mht. larvenes kvalitet og suksess i produksjonen generelt.

Forsøk med mikrobiologisk modning av egg og larver ble gjennomført i kveiteoppdrett i Island og Norge. Egg ble behandlet direkte etter befruktning, like før klekking og i midten av den ca. 14 d perioden fra befruktning til klekking. Larver ble behandlet med PRO fem ganger plommesekkstadiet (ca. 60 dager) og gjennomsnittlig fem ganger de første 50 dagene i startforing, dvs. igjennom den perioden av produksjonen hvor larvedød vanligvis forekommer. Hvert forsøksoppsett består av 4-5 rognkar, 1 silo med plommesekkkyngel og 1-3 kar med yngel i startforing (kveite). Ett ubehandlet forsøksoppsett ble kjørt samtidig hver gang (kontroll).

I torskeoppdrett (Island) ble det behandlet med PRO tre ganger i løpet av rognestadiet (ca. 12 dager) og 11 ganger i løpet av de tre første ukene etter klekking av rogn. I tillegg ble det gjennomført forsøk med behandling av fôr hvor PRO-behandlet larver ble foret med behandlet *Artemia* og Rotifers.

5.2 *Karakterisering av mikroflora*

Larvenes tarmflora ble karakterisert (dyrkbare flora) for å undersøke om og i hvor stor grad introduserte bakterier fikk etablert seg i larvenes fordøyelseskanal (Makridis *et al.* 2000, Cunningham 2002). Totalt 150 prøver ble samlet fra behandlet (PRO) og ikke-behandlet oppdrettsenheter (kontroll). Total antall dyrkbare bakterier (TVC) ble bestemt ved dyrkning



NORDISK ATLANTSAMARBEJDE

på MA (Marine Agar 2216, Difco) og antall *Vibrio* bakterier ved dyrkning på TCBS agar (Thiosulphate Citrate Bile Sucrose Agar, Difco).

Tolv isolater fra hver prøve ble videre karakterisert og gruppert til genus, familie og/eller art mht. biokjemiske egenskaper (8-10 forskjellige test). Rundt 5 % av isolatene fra hver gruppe ble dessuten karakterisert vha. API 20E (Difco). De samme metodene ble brukt for karakterisering av probiotiske bakterieisolater, for at kunne finne disse igjen og undersøke deres evne til at overleve i larvenes oppdrettsmiljø og fordøyelseskanal.

Prøver ble videre samlet for karakterisering av den totale bakterieflora vha. PCR og T-RFLP metoden (Liu *et al.* 1997, Yu *et al.* 2005, Verner-Jeffreys *et al.* 2003). En rekke problem oppstod ved finstilling og anvendelse av denne metoden til karakterisering av miljøflora (samarbeidspartner i Island) og analyse av disse prøvene ble derfor forsinket. Bearbeiding av resultater og sammenligning av total bakterieflora og dyrkbar bakterieflora vil av den grunn ikke bli presentert her, men vil bli presentert i sluttrapport til den islandske AVS-fondet (juni 2006) hvor stønad fra Nora vil bli presentert.

5.3 Effekt av probiotiske bakterier på dominerende bakterieflora (in vitro forsøk)

Effekt av PRO på vekst av dominerende bakterieflora isolert fra larvenes fordøyelseskanal og oppdrettsmiljø ble undersøkt *in vitro*. Dominerende bakterieflora ble isolert fra oppdrettsenheter hvor vekst og overlevelse av larver var a) bedre og b) dårligere enn i gjennomsnittet. Bakterieisolater ble dyrket på næringsmedier i laboratoriet og sensitivitet overfor PRO-bakterier testet vha. agar-diffusion metoden hvor PRO-bakterier i forskjellige fortyninger ble tilsatt brønner i agarmediet (diameter 5 mm). Agarskålene ble dyrket ved romtemperatur i opp til 7 dager og vekstfri sone rundt brønnene deretter målt (mm).

6 Resultater og diskusjon

Prosjektets hoved målsetning var at undersøke effekt av behandling med probiotiske bakterier (PRO) i de første utviklingsstadiene ved produksjon av kveite og torsk. I forrige studier ble det observert en positiv sammenheng mellom overlevelse av kveitelarver og antall bakterier i larver i plommesekkstadiet. Første forsøk med PRO-behandling gav videre en indikasjon på at denne probiotik blandingen muligens påvirket utvikling av larver i plommesekkstadiet. Det var derfor av stor interesse at undersøke dette nærmere, også i andre stadier av utviklingen (egg, startfôring) samt i produksjon av andre marine arter (torsk).

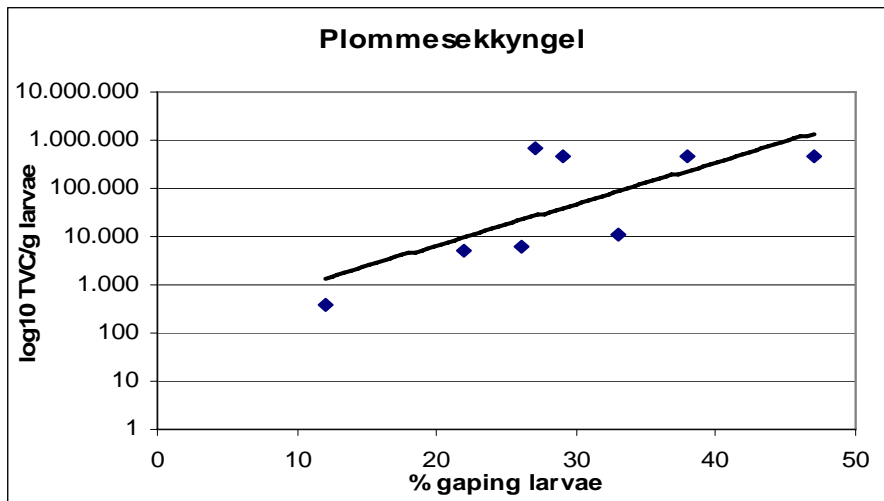
6.1 Behandling i kveiteoppdrett

6.1.1 Behandling av larver

Tre forsøksoppsett ble gjennomført i kveiteoppdrett i Island og ett forsøksoppsett i Norge. Tilsammens ble det behandlet med PRO i 17 rognkar (+ 4 i Norge), 4 silo (+ 4 i Norge) med plommesekkklarver og 4 startfôringskar mot minst like mange kontrol-enheter uten



behandling. Tidligere forsøk gav en indikasjon på en positiv sammenheng mellom TVC i larvenes fordøyelseskanal og % gapende larver i plommesekkstadiet (Figur 1).



Figur 1. Gapende larver (%) sammenlignet med TVC i larvenes fordøyelseskanal i slutten av plommesekkstadiet (2003).

Gapende larver (gaping) er en form for misdannelse som observeres i plommesekkstadiet. Her låses kjeven i åpen stilling og yngelen kan av den grunn ikke ernære seg og dør derfor de første dagene i startfôring. Videre er observert en positiv sammenheng mellom % gapere og overlevelse av larver i plommesekkstadiet. Det bemerkes likevel at helt de motsatte resultatene har også vært observert, dvs. økt overlevelse av larver i grupper med stor andel gapere.

I en silo er det hos Fiskey Ltd. rundt 200.000 plommesekkklarver og hvert prosent gapende larver vil derfor representere et ganske stort antall larver. Det er ikke klart hvorfor denne misdannelsen oppstår men resultater fra en rekke forsøk gir en indikasjon på at en av årsakene kan være antall og sammensetning av bakterier i larvenes oppdrettsmiljø under denne sensitive fasen av produksjonen (Figur 1). Det var derfor av stor interesse at undersøke eventuelle effekt ved behandling med PRO i dette stadiet eller tidligere i produksjonen (rogn og plommesekkklarver).

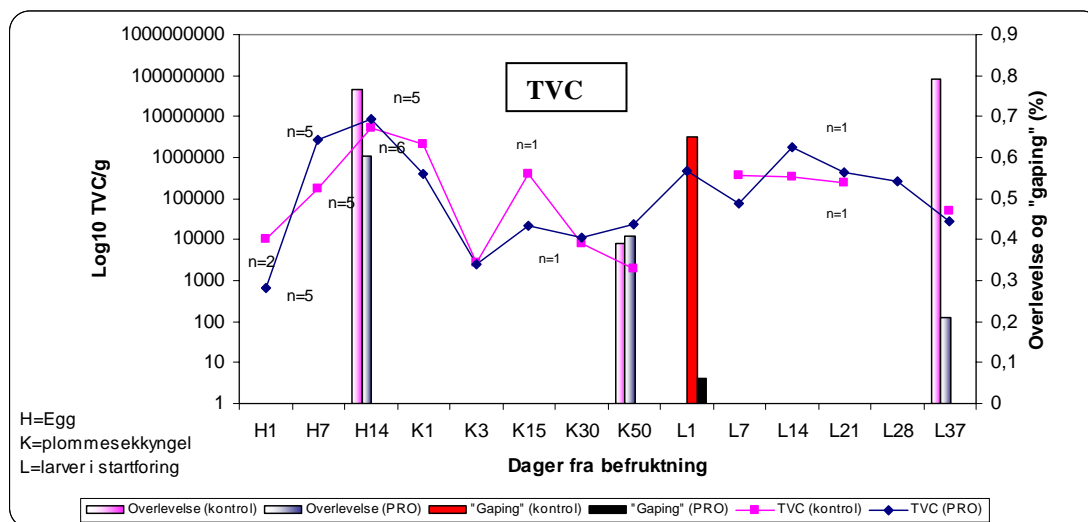
Resultatene viste at behandling med PRO gav noenlunde lik overlevelse av rogn og plommeseckkyngel, samtydig som opptil 60 % reduksjon i antall gapende larver ble observert (Figur 2). Det bemerkes likevel at reduksjon i antall gapende larver er mye lavere hvis en ser på gjennomsnittlig antall gapere i alle oppdrettsenheter i den perioden hvor forsøkene ble gjennomført.

Pre-forsøk med behandling med PRO i plommesekkstadiet viste at % gapende larver var betydelig lavere sammenlignet med kontrol (rundt 15% reduksjon i antall gapere).

Bakteriologisk kvalitet og stabilitet i plommesekkstadiet er blitt betydelig forbedret hos Fiskey de siste årene og gjennomsnittlig antall gapende larver er blitt redusert til under 20%.



Det er derfor lite sannsynlig at antall gapende larver kan bli redusert til større grad. På den andre siden vil behandling med probiotiske bakterier bidra til et meir stabilt oppdrettsmiljø som igjen vil kunne bidra til bedre vekst og overlevelse av larver i dette stadiet.



Figur 2. Antall bakterier i larvenes fordøyelseskanal, % gapere og overlevelse fra befruktning av rogn.

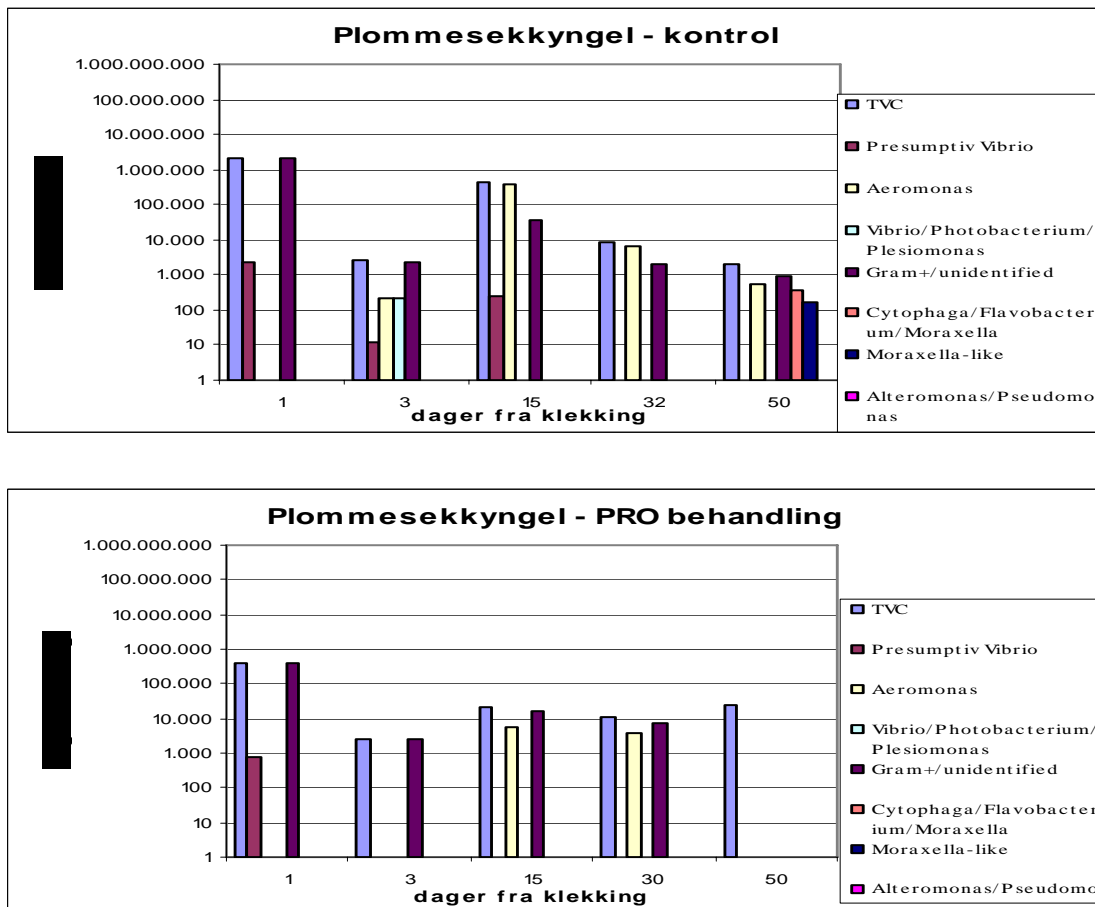
Figur 2 viser resultater fra ett av de tre forsøkene som ble gjennomført på kveitelarver i Island. Figuren viser gjennomsnittlig antall bakterier, både total antall dyrkbare bakterier (TVC) og antall *Vibrio* bakterier. Figurene viser videre antall og overlevelse av larver i kontrolkar sammenlignet med oppdrettsenheter hvor det ble behandlet med PRO. Antall bakterier (TVC) øker gradvis fra befruktning av rogn og ganske store variasjoner i antall bakterier ble observert i plommesekkstadiet. En gradvis økning i antall bakterier ble observert de første ukene i startfôring. Dette gjelder både for kontrol og oppdrettskar hvor det ble behandlet med PRO.

Resultatene viser at behandling med PRO gav rundt 60 % reduksjon i antall gapere i dette forsøket. Det bemerkes imidlertid at en stor variasjon i antall gapere ble observert når alle kontrolkar i denne perioden ble sammenlignet.

En økning i overlevelse av plommesekkkyngel betyr økt antall larver til startfôring og en mulighet for betydelig økning av produksjonskapasitet i anlegget. Resultatene gir derfor en indikasjon på at antall og/eller sammensetning av bakterieflora påvirker larvenes vekst og utvikling i dette stadiet av produksjonen.

Dominerende bakterieflora i egg etter befruktning ble karakterisert og gruppert til genus, familie og/eller art mht. biokjemiske egenskaper. Resultatene viste at det ikke er store forskjeller i sammensetning av bakterieflora i PRO-behandlede sammenlignet med ubehandlet egg, men Gram positive og ikke-identifiserte bakteriearter ble observert i større andel i egg som var behandlet med PRO (resultater ikke vist).

Karakterisering av dominerende bakterieflora i plommesekkkyngel er vist i Figur 3.

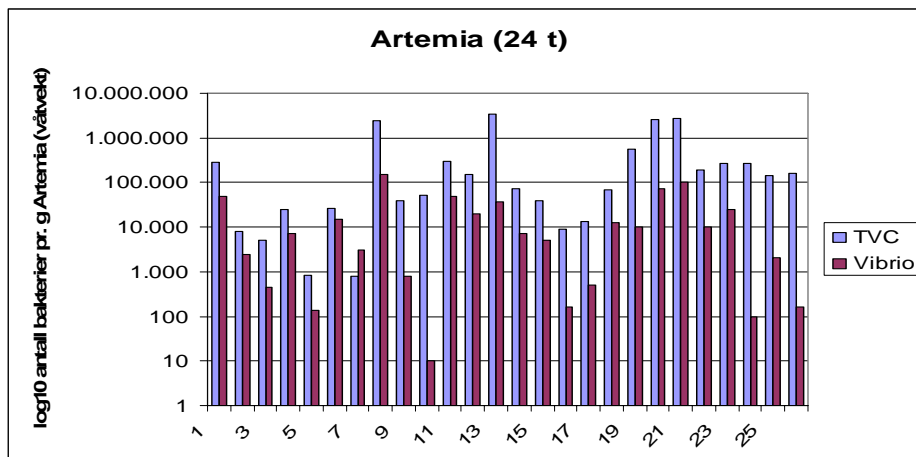


Figur 3. Gruppering av dominerende bakterier isolert fra larvenes fordøyelseskanal i plommesekkstadiet.

Figuren viser at noe høyere antall bakteriearter ble observert i kontrol sammenlignet med PRO-behandlet yngel. Overlevelse var rundt 80% i kontrol, men kun 20% i PRO-behandlet yngel i dette forsøket (Figur 2). Antall bakterier (TVC) økte gradvis fra rogn ble befruktet, gjennom plommesekkstadiet og videre i startfôringsstadiet hvor larvene får levende fôr som kan inneholde store mengder bakterier og stor variasjon i bakteriologisk kvalitet er blitt observert. Det var derfor av interesse at undersøke om Artemia kunne brukes for at overføre de probiotiske bakteriene på en effektiv måte til larver i startfôring.

6.1.2 Behandling av Artemia

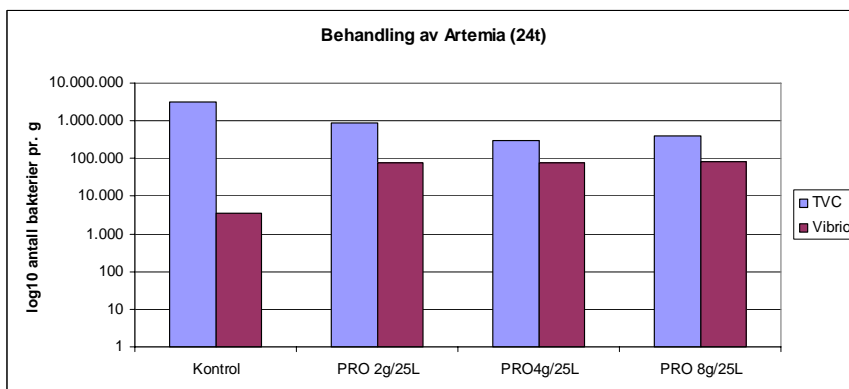
Saltvannsreke (Artemia) blir brukt ved første foring av kveitelarver. Artemia blir innkjøpt som dehydrerte egg høstet i Salt Lake i USA. Eggene blir klekket og deretter dyrket i 24t under anriking med fettsyrer. Figur 4 viser antall dyrkbare bakterier (TVC) og *Vibrio* bakterier i ukentlige prøver av Artemia hos Fiskey Ltd. over noen måneders periode høsten 2005.



Figur 4. Antall bakterier (TVC) og *Vibrio* bakterier i ukentlige prøver av Artemia (24t) hos Fiskey Ltd.

En stor variasjon i bakteriologisk kvalitet av Artemia er blitt observert, også i samme “batch” av Artemia som blir behandlet på lik måte fra dag til dag. Erfaring og resultater fra forrige forsøk viser at stort antall bakterier påvirker larvenes vekst og kvalitet til en stor grad. Det var derfor av interesse at kunne påvirke antall og sammensetning av bakterier i Artemia uten ved behandling med diverse kjemikalier.

Gjentatte forsøk ble gjennomført med PRO-behandling av Artemia under dyrkning, samt under både klekking og dyrkning. Artemia (24t) ble dessuten behandlet med varierende mengde (antall) probiotiske bakterier. Gjennomsnittlig antall bakterier fra to parallelle forsøk hver gang, er vist i Figurer 5-8.

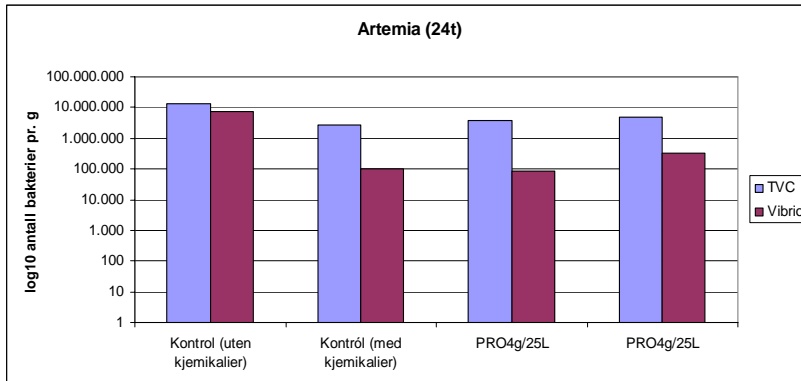


Figur 5. Artemia (24t) behandlet med varierende mengde probiotiske bakterier (PRO).

Figuren viser at antall dyrkbare bakterier (TVC) er noe lavere i kontrol, men antall *Vibrio* bakterier noe høyere i PRO-behandlet Artemia. Behandling med 8g/25 L PRO ser ikke ut til å gi forsterket effekt sammenlignet med behandling med 4g/L.



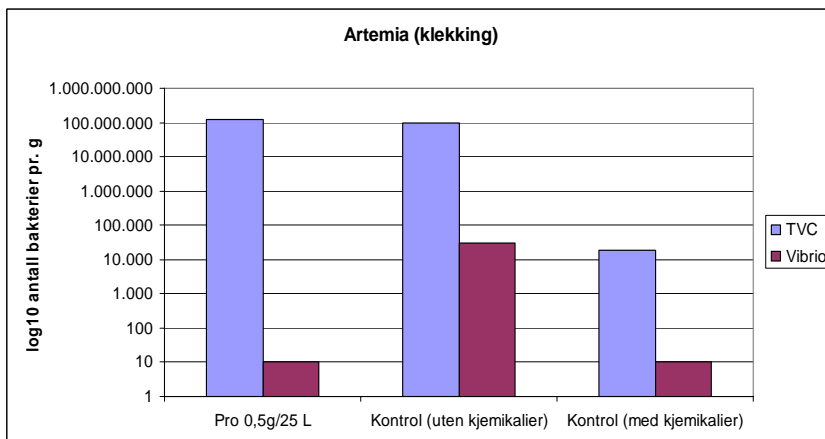
NORDISK ATLANTSAMARBEJDE



Figur 6. Artemia (24 t) behandlet med PRO (4g/L) sammenlignet med kontrol

Figuren viser at behandling med PRO gir samme resultat som tradisjonell behandling av *Artemia* (kontrol med kjemikalier). Størst antall bakterier og *Vibrio* bakterier ble isolert fra ubehandlet Artemia (kontrol uten kjemikalier).

Artemia ble også behandlet under klekking og antall bakterier deretter bestemt etter 24 timers dyrkning (Figur 7).

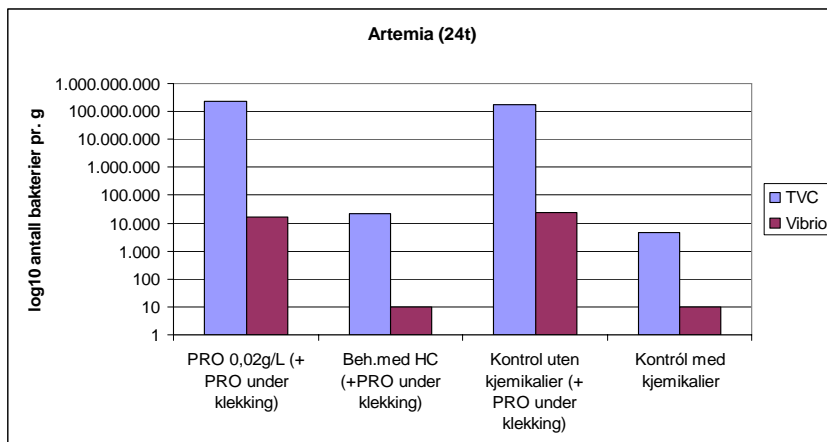


Figur 7. PRO-behandling av Artemia under klekking og bestemmelse av antall bakterier etter 24 timers dyrkning (24t Artemia).

Figuren viser at behandling med 0,02g/L av PRO under klekking, resulterer i like høye TVC, men et mye lavere antall *Vibrio* bakterier sammenlignet med ubehandlet Artemia.

Karakterisering av den dominerende bakterieflora viser også noe lavere antall *Vibrio/Aeromonas* bakterier i behandlet Artemia sammenlignet med kontrol (resultater ikke vist her).

Artemia behandlet med PRO (0,02g/L) under klekking ble også behandlet med PRO under dyrkning (24 timer) og resultatene er vist i Figur 8.



Figur 8. PRO-behandling av Artemia under både klekking og dyrkning. Antall bakterier ble bestemt etter 24 timers dyrkning (24 t Artemia).

Figuren viser at behandling med PRO under både klekking og dyrkning av Artemia gir like høye TVC og i ubehandlet Artemia, men PRO-behandling under klekking og behandling med "Hatch controller" (HC, Inve Belgium) under dyrkning gir like gode resultat som tradisjonell behandling av Artemia (kontroll med kjemikalier).

Karakterisering av den dominerende bakteriefloran viser at behandling med PRO under både klekking og dyrkning av Artemia ser ikke ut til at påvirke sammensetning av bakteriefloran i noen særlig grad, dvs. 90-100% av den dominerende floran er *Vibrio* og nært beslektede arter (*Aeromonas*). Et noe lavere antall *Vibrio* og beslektede bakterier ble observert i Artemia behandlet med PRO under klekking og HC under dyrkning, sammenlignet med kontroll (kontroll med kjemikalier).

Behandling med PRO ser derfor ut til at gi Artemia av lik kvalitet og Artemia behandlet på tradisjonell måte hos Fiskey Ltd. (behandling med kjemikalier under både klekking og dyrkning). Dette vil bli undersøkt nærmere i et nytt prosjekt (søknad sendt til National Research Council i Island i februar 2006).

Til slutt er aktuelt at nevne at både Artemia og marine fiskelarver er levende organismer som varierer av opplegg og kvalitet. Presisjon og mange gjentakelser av forsøk under standard omgivelser er derfor nødvendig for at få representative resultat.

Resultater fra behandling i kveiteoppdrett gir en indikasjon på at behandling med PRO muligens påvirker larvenes utvikling. Gjennomsnittlig andel gapende plommeseckkyngel viste seg at være lavere i oppdrettsenheter hvor det ble behandlet med PRO (9,7%) sammenlignet med kontroll (33,3%) i disse forsøkene (fire adskilte forsøk), men kun hvis en ser på kontrollkar i selve forsøkene. Det samme er ikke tilfellet hvis en ser på gjennomsnittlige resultat fra alle kontroller i denne perioden. Hver enkel oppdrettsenhet inneholder rundt 200 tusend plommeseckkyngel og derfor klart at en liten økning i overlevelse i dette stadiet av produksjonen, representerer et stort antall larver som derfor har større mulighet for at overleve.



NORDISK ATLANTSAMARBEJDE

Behandling av larver i startfôring gav på den andre siden noe dårligere overlevelse av larver sammenlignet med kontrol, noe som muligens kan skyldes for stor belastning med bakterier generelt. Resultater viste videre at normal utvikling av larver (metamorfose) var merkbart dårligere i PRO-behandlet oppdrettskar sammenlignet med kontrol. Feil plassering av øyne var i denne sammenhengen meir synlig i PRO-behandlet yngel (23,7%) sammenlignet med kontrol (6,3%). Behandling med denne probiotik blandingen ser derfor ut til at gi positiv effekt i egg og plommesekkstadiet, men ikke ved startfôring av kveitelarver.

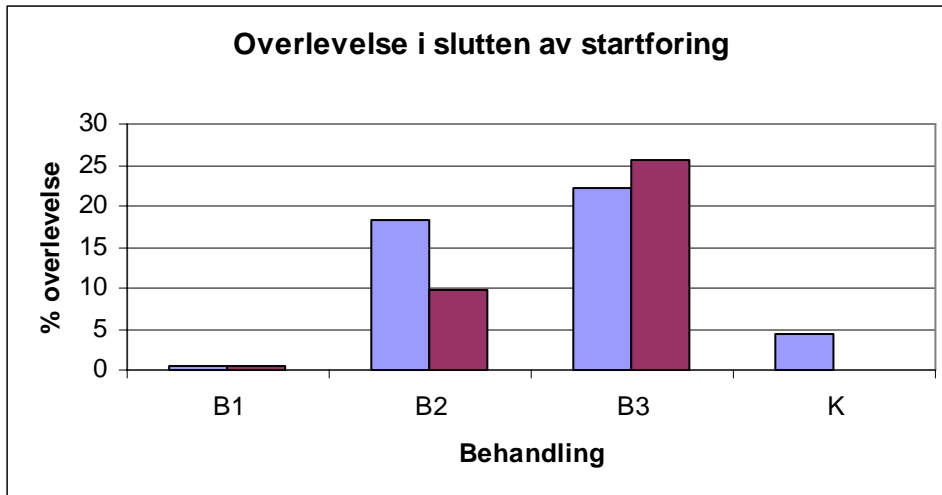
I forsøk gjennomført på kveitelarver i Norge ble det undersøkt om behandling med PRO i eggstadiet påvirket %-befruktning av egg, noe som har vist set at være noe dårligere når frossen sperm ble brukt (rundt 65%) sammenlignet med bruk av fersk sperm ved befruktning (rundt 92%). Resultatene viste at behandling med PRO ikke påvirket % befruktning. Behandling med PRO så heller ikke ut til at påvirke %-andel gapende larver i plommesekkstadiet, men en stor andel gapere ble observert i denne perioden, uavhengig av behandling med PRO. Dette er antall at skyldes ugunstig temperatur i egg og larvefase (høy miljøtemperatur i 2005).

In vitro undersøkelser av effekt av PRO på vekst av dominerende bakterieflora isolert i kveiteoppdrett i Island viste at de probiotiske bakteriene hemmet vekst av en del av de bakteriene som ble isolert fra både plommesekkkyngel og larver i startfôring. Resultatene viste videre at de probiotiske bakteriene påvirket vekst av dominerende bakterieflora isolert fra enkelte oppdrettskar hvor overlevelse av larver var dårlig, men i ingen av tilfellene påvirket disse bakteriene vekst av bakterier isolert fra oppdrettsenheter med høy overlevelse av larver (overlevelse høyere enn i gjennomsnittet).

6.2 Behandling i torskoppdrett

Torskerogn ble samlet ved stryking av vill torsk ved Islandsysten. Rognene ble befruktet *in situ* og deretter transportert til Havforskningsinstituttet sin forskningsstasjon i Grindavík i sør Island. Rognene ble delt i sex oppdrettsenheter (silo) og selekterte probiotiske bakterier (PRO) ble tilsatt sjøvannet på a) dag 0, 7 og 11 etter befruktning av egg (B1) og b) eller hver annen dag fra dag 2 til dag 22 etter klekking av rogn (B2 og B3). PRO-behandlet torskelarver ble dessuten fôret med PRO-behandlede Rotifers fra dag 5 til dag 23 etter klekking (B3).

Hver enkel behandling bestod av to oppdrettsenheter (silo) og resultater er vist i Figur 9. Antall dyrkbare bakterier (TVC) var ganske stort sammenlignet med TVC i de første stadiene ved oppdrett av kveite, dvs, rundt 10^7 bakterier/g våtvekt yngel allerede de første dagene etter befruktning (resultater ikke vist). Det samme gjelder antall *Vibrio* bakterier som var i gjennomsnittet 10^4 /g larver, men kunne bli helt opp til 10^6 /g. En stor variasjon i antall bakterier ble dessuten observert de første dagene når forskjellige oppdrettsenheter ble sammenlignet. Behandling med probiotiske bakterier (PRO) viste seg at gi noe likt antall bakterier i larvenes fordøyelseskanal (TVC/g larver), men noe høyere antall *Vibrio* bakterier. Stort antall melkesyrebakterier ble isolert fra ubehandlede larver sammenlignet med larver behandlet med PRO. Stor variasjon i overlevelse av larver ble dessuten observert (Figur 9).



Figur 9. Overlevelse av torskelarver i slutten av forsøket (24 dager etter klekking av rogn). B1 = behandling av torskeegg, B2= behandling av plommeseekkyngel, B3= behandling av både egg og plommeseekkyngel, K= kontroll.

Larver behandlet med PRO (B2 og B3) hadde en tydelig bedre overlevelse sammenlignet med kontroll (K) og larver som kun ble behandlet på eggstadiet (B1). Foring av yngel med PRO-behandlet rotifers (B3) viste seg dessuten at gi en noe bedre overlevelse sammenlignet med behandling av yngel alene (B2). Størst antall bakterier (TVC) ble observert i larver behandlet med PRO og føret med PRO-behandlet Rotifers eller Artemia.

Behandling av plommeseekkyngel ser derfor ut til at føre til økt overlevelse av yngel i denne perioden av produksjonen hvor stor dødelig oppstår som regel, dvs. de første dagene etter klekking. Disse resultatene gir derfor en indikasjon på at det er mulig at påvirke overlevelse av torskelarver ved anrikning med positiv bakterieflora, på samme måte som ved produksjon av kveitelarver.

7 Kort sammenfatning.

Oppdrett av marine fiskearter anses som et viktig satsingsområde innenfor de nordiske land, ikke minst torsk som er et svært viktig eksportprodukt i disse land. Fangst av fill torsk er blitt dramatisk redusert i de siste tiårene, men etterspørsel øker stadig og vil kun bli møtt med oppdrett av torsk og andre marie arter. Torskeoppdrett vurderes ikke som lønnsom pr. i dag og en del av årsaken til dette er stor dødelighet i de første stadiene av produksjonen. Dette prosjektet har bidratt til etablering av metoder for behandling av yngel for at kontrollere bakterievekst ved produksjon av marine larver. Resultatene gir videre en indikasjon på at vekst av ønskelig/positiv bakterieflora muligens kan bli etablert på bekostnad av uønskelig



NORDISK ATLANTSAMARBEJDE

flora. Dette kan betyde et vigtigt skritt i den retning at kunne kontrollere antall og sammensetning av bakteriflora og øke suksess ved produksjon av marine larver generelt.

Prosjektet anses som en viktig start på et videre samarbeid innenfor dette feltet i de Nordiske land. I prosjektet er ett lite nettverk blitt dannet hvor samarbeidspartnere har utnyttet hverandres styrke og erfaring i forsøk på å løse i fellesskap et stort problem innenfor marin akvakultur. Dette prosjektet vurderes som ett pre-prosjekt og viktig grunnlag for etablering av et utvidet nettverk og flere samarbeidspartnere innenfor de Nordiske land hvor oppdrett av marine arter, spesielt torsken, anses som et svært viktig satsingsområde. Prosjektet gir dessuten en indikasjon på at resultater og erfaring fra forsøk på en marin art (kveite), kan i større eller mindre grad overføres til oppdrett av en annen art (torsk) innenfor et lignende område (bl.a. temperaturforhold).

Prosjektet har også vært et viktig tillegg til nasjonal finansiering av forskningsprosjekt innenfor dette feltet i Island (Preventive measures in marine aquaculture: 2004-2007). Støtte fra Nora gir dessuten mulighet for dannelse av et større nettverk og samarbeidsprosjekt

8 Referanser

- Bergh, OE & OE Evensen**, 2002. ICES Council Meeting Documents (ICES CM 2002/R:07)
- Bernard, L, H Schaefer, F Joux, C Courties, G Muyzer & P Lebaron**. 2000. Genetic diversity of total, active and culturable marine bacteria in coastal seawater. *Aquat. Microb. Ecol*, 23(1):1-11.
- Björnsdóttir, R og H Smáradóttir**. 2003. Stýring örveruflóru í startfóðrunarkerjum lúðulirfa Final project report to the National Research Council in Iceland - Icelandic Fisheries Laboratories, report #21-03.
- Cunningham, CO**. 2002. Molecular diagnosis of fish and shellfish diseases: present status and potential use in disease control. *Aquaculture*, 202(1-2); 19-55.
- FAO** 2004. The State of World Fisheries and Aquaculture. FAO, Rome.
- FAO** 2006. <http://faostat.fao.org>.
- Gatesoupe, J**. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180(1-2): 147-165.
- Giuliano, L. M DeDomenico, E De Domenico, MG Hoefle, MM Yakimov**. 1999. Identification of culturable oligotrophic bacteria within naturally occurring bacterioplankton communities of the Ligurian sea by 16S rRNA sequencing and probing. *Microb. Ecol*. 37(2):77-85.
- Gullian, M., F. Thompson, & J. Rodriguez**. 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 233(1-4):1-14
- Halami, PM, A Chandrashekar & R Joseph**. 1999. Characterization of bacteriocinogenic strains of lactic acid bacteria in fowl and fish intestines and mushroom. *Food Biotechnol*, 13(2):121-136.
- Keller, M & K Zengler**. 2004. Tapping into microbial diversity. *Nat.Rev Microbiol*, 2(2), 141-150.



NORDISK ATLANTSAMARBEJDE

- Lauzon, H, L, & R, Björnsdóttir.** 2006. Forvarnir í fiskeldi. Annual project report to the Icelandic AVS fond – Icelandic Fisheries Laboratories, report #01-06.
- Lillehaug, A, BT Lunestad & K Grave.** 2003. Epidemiology of bacterial diseases in Norwegian aquaculture - a description based on antibiotic prescription data for the ten-year period 1991 to 2000. *Dis. Aquat. Org*, 53:115-125
- Liu, W.T., T.L. Marsh, H. Cheng & L.J. Forney.** 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.*, 63(11): 4516-22.
- Macey B.M. & V.E. Coyne.** 2005. Improved growth rate and disease resistance in farmed *Haliotis midae* through probiotic treatment *Aquaculture*, 245(1-4); 249-261.
- Makridis, P, AJ Fjellheim, J Skjermo et al.** 2000a. Colonization of the gut in first feeding turbot by bacterial strains added to the water or bioencapsulated in rotifers. *Aquaculture International* 8(5): 367-380.
- Makridis, P, AJ Fjellheim, J Skjermo & O Vadstein.** 2000b. Control of the bacterial flora of *Brachionus plicatilis* and *Artemia franciscana* by incubation in bacterial suspensions. *Aquaculture*, 185(3-4): 207-218
- Olafsen, JA.** 2001. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture *Aquaculture*, 200(1-2); 223-247
- Paniagua, E, A Paramá, R Iglesias, ML Sanmartín & J Leiro.** 2001. Effects of bacteria on the growth of an amoeba infecting the gills of turbot. *Dis Aquat. Org*, 45(1):73-76.
- Skjermo, J & O Vadstein.** 1999. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture*, 177 (1-4):333-343.
- Verner-Jeffreys, DW, RJ Shields, IR Bricknell & 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(1-4); 21-42.
- Wong, H, P Wang, S-Y Chen & S-W Chiu.** 2004. Resuscitation of viable but non-culturable *Vibrio parahaemolyticus* in a minimum salt medium. *FEMS Microbiol. Letters*, 233 (2): 269-275.
- Yu, C.P., R. Ahuja, G. Sayler & K.H. Chu.** 2005. Quantitative molecular assay for fingerprinting microbial communities of wastewater and estrogen-degrading consortia. *Appl Environ Microbiol.* 71(3):1433-44.
- www.growfish.com.au