

Pro- og prebiotika for torskelarver

Kristine Flesche

Bioteknologi

Oppgaven levert: Mai 2011

Hovedveileder: Olav Vadstein, IBT

Biveileder(e): Inga Marie Aasen, SINTEF Bioteknologi

Forord

Denne oppgaven ble utført ved Institutt for Bioteknologi ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU), Trondheim, i samarbeid med SINTEF Materialer og kjemi, avdeling bioteknologi. Oppgaven er en del av EU-prosjektet PROMICROBE "*Microbes as positive actors for more sustainable aquaculture*", som er et samarbeid mellom NTNU, SINTEF Fiskeri og havbruk, SINTEF Materialer og kjemi og partnere i Belgia, Nederland og Frankrike. Prosjektet omhandler blant annet kartlegging av naturlig flora i larver, studier av betydningen av mikroorganismer i "gnotobiotiske" larver, og effekt av pro- og prebiotika. NTNU og SINTEF har fokus rettet mot torsk, mens de andre samarbeidspartnere arbeider med andre arter.

Først vil jeg gjerne rette en stor takk til mine to veiledere; Professor Olav Vadstein (NTNU) og Forsker Inga Marie Aasen (SINTEF Materialer og kjemi). Jeg vil gjerne takke dere begge for god veiledning og nyttige råd underveis i oppgaven.

Jeg vil også få takket Ingeniør Kathinka Qvenild Lystad (SINTEF Materialer og kjemi) for god hjelp til analysering ved HPLC og generelt nyttige råd på lab.

En stor takk vil jeg gjerne rette mot Stine Wiborg Dahle, Master of Science, ved SINTEF Fiskeri og havbruk for god hjelp til gjennomføring av forsøk med torske-larver.

Forsker Ingrid Bakke (NTNU) vil jeg gjerne takke for god hjelp til den molekylære delen av oppgaven, både praktisk og teoretisk.

Jeg vil gjerne takke alle på SINTEF Materialer og Kjemi, avdeling Bioteknologi, for at det ble en hyggelig opplevelse å arbeide på lab sammen med dere.

Jeg vil også rette en stor takk til familien min som har støttet meg og oppmuntret meg gjennom hele studietiden min.

Ellers vil jeg gjerne takke venner og medstudenter som har gjort studietiden min i Trondheim til en opplevelse for livet. Det hadde aldri vært det samme uten dere. Særlig vil jeg takke Ida Maria Evensen for at vi hjalp hverandre med både praktiske ting på lab og teoretiske ting i skriveprosessen, og Eli Bjørnø Sjulstad som tok seg tid til å lese gjennom innledningen.

Sammendrag

Dårlig overlevelse av fiskelarver grunnet sykdomsutbrudd er et stort problem innen akvakultur. Dette er i stor grad forårsaket av opportunistiske bakterier som blomstrer opp når fôr tilsettes i store mengder. Et forsøk på å bekjempe sykdommene har vært bruk av antimikrobielle midler, men dette har ført til at bakterier har utviklet resistens mot slike midler. Det er derfor ønskelig å redusere bruken av disse midlene, og flere alternative metoder har blitt prøvd ut. Deriblant har bruk av både vaksiner og immunstimulerende agenter vist seg å være vellykket innen akvakultur. En annen metode, med stort potensial for å kunne kontrollere potensielle patogene stammer, er bruken av gunstige eller probiotiske bakterier. Probiotika virker ved å gi en helsefremmende effekt på vertsorganismen, og kan i tillegg utkonkurrere patogene bakterier. Tilsats av prebiotika, som er ufordøyelige komponenter, favoriserer vekst av probiotiske stammer og danner ugunstige miljø for patogene stammer.

I denne oppgaven ble potensielle probiotiske bakterier for bruk til torskelarver karakterisert. Bakteriene som ble benyttet var isolert fra torskeyngel gjennom et prosjekt i SINTEF, og var karakterisert ved klassiske, mikrobiologiske metoder, i tillegg til sekvensering av deler av 16S rRNA-genet. Isolatene ble i oppgaven videre karakterisert med hensyn på probiotiske egenskaper under ulike vekstvilkår, både i renkultur, ko-kultur og blandingskultur. Denaturerende gradient gelelektroforese (DGGE), som er en metode for å analysere genetisk diversitet innen mikrobielle samfunn, ble benyttet for å karakterisere vekst i blandingskulturer. For å påvise eventuelle degraderings- og fermenteringsprodukt ble høytrykksvæskekromatografi (HPLC) benyttet. To patogene stammer ble inkludert i oppgaven; *Vibrio anguillarum* (*V. anguillarum*) HI 610 (også kalt *Listonella anguillarum*) og *Marinomonas sp.*

Det ble påvist probiotiske egenskaper hos stammene som ble undersøkt i denne oppgaven, *in vitro*. Egenskapene inkluderte evne til vekst på prebiotiske substrat, evne til å utkonkurrere eller hemme patogene stammer, evne til adhesjon til mukus og vekst under anaerobe forhold. Ingen av stammene ble vist å være patogene for torskelarver. Kandidatene som ble vist å ha flest av de probiotiske egenskapene var av slektene *Photobacterium*, *Pseudoalteromonas*, *Marinomonas*, *Vibrio* og *Shewanella*. Det er ikke alltid at *in vitro* studier gjengis *in vivo*, og motsatt. Det bør derfor utføres *in vivo* forsøk på de beste kandidatene for å bekrefte at de virkelig er probiotiske.

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	II
1 Innledning.....	1
1.1 Bakgrunn for oppgaven	1
1.2 Probiotika.....	3
1.2.1 Generelt om probiotika.....	3
1.2.2 Probiotika til bruk innen akvakultur.....	3
1.2.3 Probiotika til fiskelarver	4
1.2.4 Virkemåter for probiotika i oppdrett	4
1.3 Prebiotika.....	7
1.4 Hva er gjort av tidligere forskning?.....	9
1.4.1 Forskning på probiotika innen akvakultur	9
1.4.2 Forskning på probiotika til torskelarver	10
1.5 Mål for oppgaven.....	10
2 Materialer og metoder	12
2.1 Bakteriekultur og oppbevaring	12
2.1.1 Bakterieisolater.....	12
2.1.2 Oppbevaring av isolatene	15
2.1.3 Forkultur.....	15
2.2 Medium til vekstforsøk.....	16
2.3 Vekstforsøk under aerobe betingelser	18
2.3.1 Vekstforsøk i sentrifugerør.....	18
2.3.2 Vekstforsøk i brønnplate	19
2.3.3 Vekstforsøk i brønnplate med filterinnsatser og felles reservoar for vekstmedium	19
2.3.4 Vekstforsøk i brønnplate med filterinnsatser og separate reservoar for vekstmedium	20

2.3.5	Dyrkning på agarplater	21
2.4	Vekstforsøk under anaerobe betingelser.....	22
2.4.1	Vekstforsøk av renkultur i Hungate glassrør.....	22
2.4.2	Vekstforsøk i brønnplate med filterinnsats og separate reservoar for vekstmedium	22
2.4.3	Vekstforsøk av blandingskultur i Hungate glassrør	23
2.5	Målemetoder.....	23
2.5.1	pH-måling.....	23
2.5.2	OD-måling.....	24
2.5.3	Bestemmelse av kimtall	25
2.5.4	Analysering av syrer og sukker ved HPLC	26
2.5.5	Analysering av aminosyrer ved HPLC.....	27
2.5.6	Hemolysetesting av bakteriestammene	28
2.6	In vivo testing av bakteriestammer med torskelarver.....	29
2.7	Identifisering av stammer ved PCR amplifisering og sekvensering av 16S rDNA... 31	
2.7.1	Ekstrahering av DNA	31
2.7.2	PCR amplifisering	31
2.7.3	Agarosegelelektroforese	32
2.8	Karakterisering av mikrobefund med PCR/DGGE.....	33
2.8.1	Amplifisering av bakteriekulturer med PCR.....	33
2.8.2	Analysering med DGGE	33
3	Resultater.....	37
3.1	Flytskjema	37
3.2	Testing for renhet av stammene.....	38
3.3	Vekst med glukose og aminosyrer som karbonkilde.....	39
3.4	Vekst på prebiotiske substrater	48
3.5	Hemolysetesting	51

3.6	In vivo testing av bakteriestammer med torskelarver.....	51
3.7	Dyrkning av Pseudoalteromonas RA 7-14 med patogene stammer	54
3.8	Vekstforsøk i brønnplater med filterinnsats og felles reservoar.....	57
3.9	Hemmeforsøk av enkeltstammer mot <i>V. anguillarum</i> HI 610	59
3.9.1	Aerobe dyrkningsforhold	60
3.9.2	Anaerobe dyrkningsforhold.....	64
3.9.3	Analysering av fermenteringsprodukt og sukker ved HPLC	67
3.10	Undersøkelser av blandingskultur med DGGE-analyse	68
3.10.1	Testforsøk med DGGE for valg av stammer.....	68
3.10.2	Hovedforsøk med DGGE	69
3.10.3	Oppsummering av DGGE-analysen.....	79
3.11	Sekvenseringsresultater.....	79
4	Diskusjon.....	82
4.1	Vurdering av forsøkene	82
4.2	Undersøkelser av enkeltstammer	84
4.2.1	Vekst på karbonkilder	85
4.2.2	Vekst på prebiotiske substrat.....	86
4.2.3	Undersøkelser for negative egenskaper.....	87
4.2.4	Hemmeforsøk	88
4.3	Undersøkelse av blandingskulturer	93
4.4	Forslag til videre arbeid	95
5	Oppsummering og konklusjon	97
6	Referanser.....	99
	Vedlegg	a

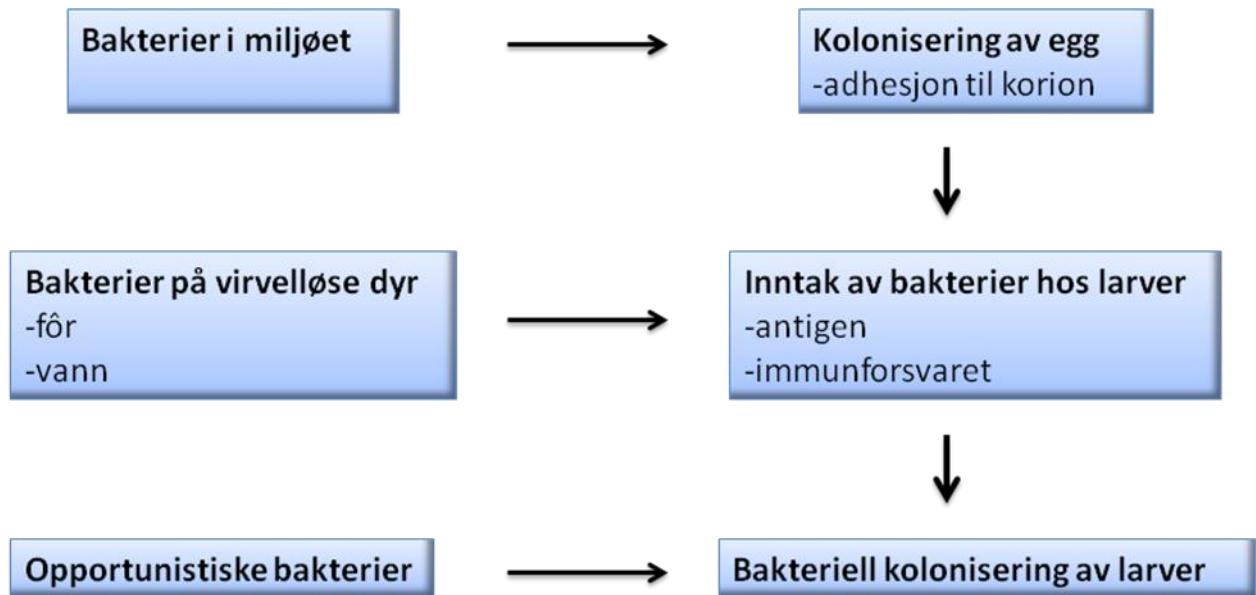
1 Innledning

1.1 Bakgrunn for oppgaven

Innen akvakultur er problemer relatert til dårlig overlevelse spesielt under larvestadiet en stor utfordring. Årsaken til dette er i stor grad forårsaket av sykdomsutbrudd, og dette legger videre en stor begrensning både på produksjonen og den økonomiske utviklingen innen denne sektoren (Verschuere et al. 2000).

I akvakultursystemer lever organismene mye nærmere i kontakt med hverandre enn hva dyr på land gjør, og dermed har nærmiljøet en stor påvirkning på helsestatusen til akvatiske dyr. Bakterier som lever i samme omgivelsene som egg under kultivering vil derfor kunne kolonisere overflaten av eggene kort tid etter befruktning, og videre kolonisere i fordøyelsessystemet til larvene når eggene klekkes. Larver fra nylig klekkede egg har et ufullstendig utviklet immunsystem og et sterilt fordøyelsessystem. Bakterier i omgivelsene vil derfor utgjøre den mikrobielle floraen i larvene etter klekking (Verschuere et al. 2000).

Ved oppdrett av fisk tilsettes fôr i store mengder, noe som gir gode vekstforhold for bakterier som vanligvis har begrensede vilkår. Dette skaper en forstyrrelse i den naturlige floraen som finnes, og vekst av opportunistiske bakterier øker. Mikroorganismer som lever i vannet sammen med akvatiske dyr blir hele tiden inntatt i dyrene gjennom vannet og fôr, og når opportunistiske bakterier overføres til en organisme hvor immunsystemet ikke er velfungerende, kan dette føre til sykdom. Opportunistiske bakterier er dermed årsak til mange sykdommer blant oppdrettsfisk (Olafsen 2001). Steg for bakteriell kolonisering av fiskeegg og larver er gitt i Figur 1.



Figur 1: Steg og interaksjoner i bakteriell kolonisering av fiskeegg og larver, gjentegnet fra Olafsen 2001. Bakterier i vannet koloniserer på eggene, noe som muligens kan skyldes adhesjon til den ytre membranen som omgir et embryo (korion). Etter klekking blir bakterier inntatt av larvene gjennom fôr og vannet i oppdrettsanlegget. Inntaket av bakterier fører til at larvene blir fylt med bakterielle antigen før aktiv føring begynner, noe som kan påvirke immunforsvaret. Mikrofloraen i det marine miljøet kan bestå av opportunistiske bakterier som koloniserer larvene (Olafsen 2001).

Et forsøk på å bekjempe disse sykdommene har vært bruk av kjemiske tilsetninger og medisiner, slik som antimikrobielle midler. Bruken av disse midlene har imidlertid ikke klart å fjerne årsaken til sykdommene, men har heller bare fungert til behandling av symptomene (Verschuere et al. 2000). Bruken av antimikrobielle midler har i tillegg skapt stor bekymring da det har oppstått en økning av resistens for slike midler blant patogene bakterier. Patogene bakterier kan ved gjentatt eksponering for antimikrobielle midler utvikle resistens mot det aktuelle middelet. Disse genene kan videre overføres gjennom plasmidoverføring til bakterier som aldri har blitt utsatt for middelet, slik at de også utvikler resistens (Balcazar et al. 2006).

Ønsket om å øke produksjonen av friske akvatiske oppdrettsdyr uten rutinemessig bruk av antimikrobielle midler, har skapt stor interesse for å utvikle nye metoder for å oppnå et sunt kultiveringsmiljø (Sahu et al. 2008). Flere alternative metoder har blitt prøvd ut, deriblant bruk av vaksiner og bruken av immunstimulerende agenter, som begge har vist seg å være vellykket. En annen metode, med stort potensial for å kunne kontrollere potensielle patogene stammer, er bruken av gunstige eller probiotiske bakterier (Gómez et al. 2007).

1.2 Probiotika

1.2.1 Generelt om probiotika

Begrepet probiotika benyttes om såkalte ”gunstige” mikrober, som gir en helsefremmende effekt på vertsorganismen. Ordet ”probiotisk” stammer fra de greske ordene ”pro” og ”bios”, som ganske enkelt betyr ”for liv” (Gismondo et al. 1999). Probiotika ble definert av Fuller som ”et levende mikrobielt fôr-supplement som fordelaktig påvirker vertsdyret ved å forbedre dens tarmbalanse”, oversatt fra: *a live microbial feed supplement which beneficially affects the host animal by improving its intestinal microbial balance* (Fuller 1989). Probiotika gir beskyttelse mot patogene mikroorganismer ved å innvirke på patogene sine cellulære funksjoner. Probiotiske organismer kan også produsere ulike metabolitter som hemmer vekst av skadelige bakterier, og på denne måten beskytte mot sykdom. Den gunstige virkningen probiotika har, kan også komme av at de eksempelvis har evne til å produsere gunstige stoffer som vitaminer, og har evne til avgiftning av skadelige stoffer. I tillegg vil de kunne konkurrere sammen med patogene bakterier om plass og næring, og på den måten kunne hindre patogene bakterier i å vokse normalt (Vine et al. 2006).

1.2.2 Probiotika til bruk innen akvakultur

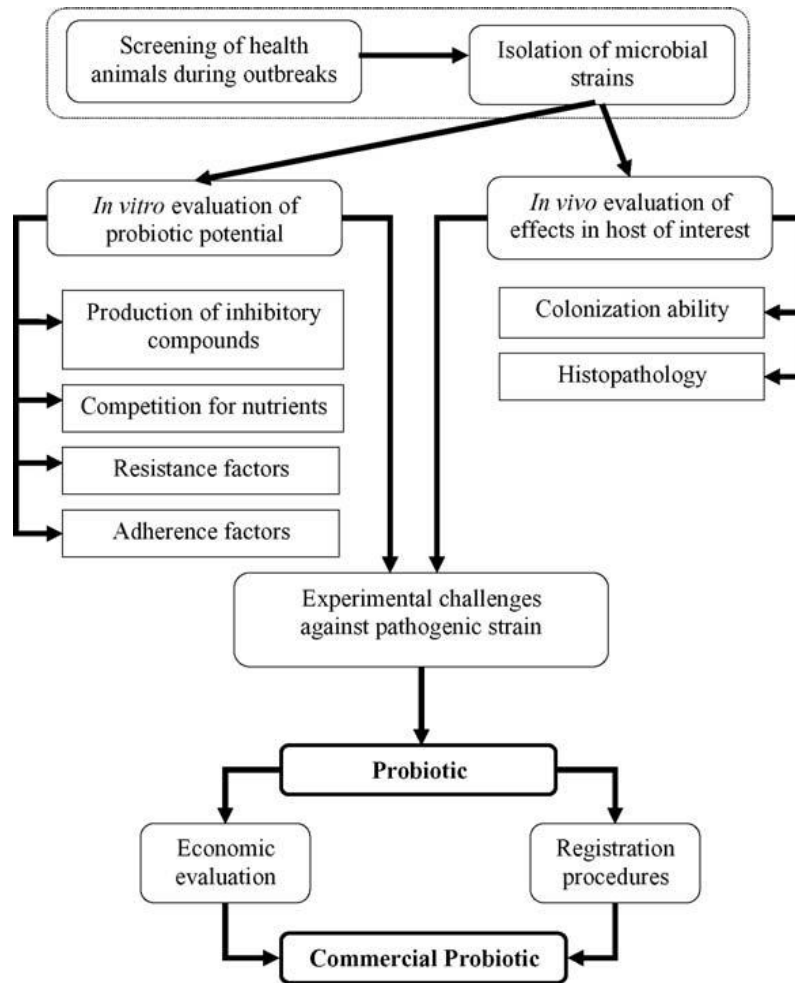
Ved bruk av probiotika innen akvakultur, er det viktig å ta med i betraktningen at akvatiske dyr har et mye tettere forhold til sitt nærmiljø, i forhold til dyr på land. Dette fører til at det omkringliggende miljøet har stor innflytelse på helsen til organismer som lever i et slikt miljø. Tilførsel av probiotiske bakterier kan virke på både gjeller eller skinn til verten, i tillegg til å ha en positiv effekt på nærmiljøet. Denne store påvirkningen fra probiotiske bakterier antyder at definisjonen til Fuller ikke blir fullstendig innen akvakultur, da probiotiske bakterier også kan oppnås fra miljøet, og ikke bare gjennom fôr, som angitt i definisjonen. Derfor er en videreutviklet definisjon angitt som ”et levende mikrobielt supplement som har en fordelaktig effekt på verten ved å modifisere det verts-assosierte eller omkringliggende mikrobielle fellesskapet, ved å forsikre forbedret bruk av fôr eller forbedre dens næringsverdi, ved å forbedre vertsresponsen mot sykdom, eller ved å forbedre kvaliteten av dens omkringliggende miljø”, oversatt fra: *a live microbial adjunct which has a beneficial effect on the host by modifying the host-associated or ambient microbial community, by ensuring improved use of the feed or enhancing its nutritional value, by enhancing the host response towards disease, or by improving the quality of its ambient environment* (Verschuere et al. 2000).

1.2.3 Probiotika til fiskelarver

Den første tiden etter klekking livnærer fiskelarver seg på plommesekken, som befinner seg under buken. Når plommesekken er brukt opp blir levende fôr benyttet, som for eksempel rotatorier, *Brachionus sp.* (hjuldyr) og artemia, *Artemia sp.* (saltvannsreke), og videre blir neste stadium tilførsel av formulert fôr. Koloniseringen av bakterier i fiskelarver øker som regel ved overgangen fra plommesekk til fôr, og mikrobiota i larvene gjengir da floraen i det tilførte levende fôret, fremfor mikrobiota som finnes i miljøet. Det kan derfor tenkes at om man erstatter den mikrobielle floraen i miljøet med probiotiske bakteriestammer, kan en kontrollert kolonisering i fiskelarvene oppnås. Dette vil kunne bidra til å bekjempe noen av problemene innen oppdrett. Det har eksempelvis tidligere blitt vist at når *Lactobacillus plantarum* ble tilført kultiveringsvannet til torskelarver, ble 70 % av mikrofloraen i fordøyelsessystemet vist å bestå av denne bakterien, i motsetning til 1 % i ueksponerte torskelarver (Vine et al. 2006).

1.2.4 Virkemåter for probiotika i oppdrett

Flere egenskaper er nødvendig å karakterisere for potensielle probiotiske stammer, og et diagram for seleksjonskriterier for valg av potensielle probiotiske stammer til bruk innen akvakultur er gitt i Figur 2. Figuren gir en oversikt over virkemåter som er ønskelig for at en stamme skal ha potensiale som probiotika. Noen av virkemåtene er beskrevet nærmere i dette avsnittet.



Figur 2: Diagram for mulige seleksjonskriterier for probiotiske bakterier til bruk innen akvakultur. (Balcazar et al. 2006). Figuren gir en samlet oversikt over ulike kriterier som er ønskelig for at en stamme kan være probiotisk. En viktig ting som ikke illustreres av figuren er evne til å gi en positiv vekst/overlevelse for akvatiske dyr. Nærmere beskrivelse for noen av virkemåtene er gitt under.

Adhesjon og vekst i mukus

En av de viktigste egenskapene for å fungere godt som probiotika til fiskelarver er evne til å kolonisere tarmkanalen, og dermed er adhesjon til mukus (slim) en viktig egenskap. Probiotiske organismer konkurrerer med patogener for adhesjonssteder og næring i tarmen, og hindrer på denne måten at patogener stammer kan kolonisere (Sahu et al. 2008). Patogene bakteriers evne til å kolonisere i tarmkanalen er relatert til dens virulens. Å få probiotiske organismer til å oppholde seg i tarmsystemet over en lang periode, vil kunne gi lang fordelaktig virkning mot patogener stammer. Konkurransen for festesteder fungerer som første steg i forsvaret mot invaderende patogener stammer, og adhesjon til mukus og at organismen ikke ødelegges av fordøyelsesprosessen er dermed viktige virkemåter for probiotiske stammer (Tinh et al. 2007).

Antagonisme

Videre er produksjon av substanser som virker inhiberende på patogene stammer, en viktig virkemåte for probiotiske organismer. Ulike mikroorganismer kan produsere og skille ut komponenter som har en antagonistisk effekt på andre mikrobielle populasjoner, og skaper dermed en konkurranse for næring eller energi. En motvirkning for vekst av patogene stammer kan oppnås ved tilstedeværelsen av organismer i tarmen til verten, eller i kulturmediet, som produserer substanser med inhiberende effekt mot patogene organismer. Flere faktorer har antibakteriell effekt, og kan fungere enten alene eller i kombinasjon med hverandre. Disse kan blant annet være produksjon av antibiotika, bakteriosiner, sideroforer, lysozymer, proteaser og/eller hydrogen peroxid, og forandring i pH-verdier ved produksjon av organiske syrer. Det finnes flere studier hvor slike hemninger av vekst er påvist *in vitro* (Austin et al. 1995; Bergh 1995; Ruiz et al. 1996), men disse fungerer nødvendigvis ikke *in vivo* (Verschuere et al. 2000).

Konkurranse om næringsstoffer

Konkurranse om næringsstoffer eller tilgjengelig energi, kan utgjøre en viktig rolle for sammensetningen av mikrofloraen i miljøet eller i fordøyelsessystemet til akvatiske oppdrettsdyr. Denne konkurransen mellom mikroorganismer vil videre avgjøre hvor ulike mikrobielle populasjoner som vil eksistere side om side i ett og samme økosystem. Probiotiske bakterier som tilføres miljøer hvor patogene mikrober lever, vil være med å utnytte næring som ellers ville forbrukes av de patogene mikrobenes. På denne måten vil de være med på å skape konkurranse for anskaffelse av næring, og dermed påvirke vekst for patogene stammer (Verschuere et al. 2000).

Forsterkning av immunrespons

Immunsystemet kan aktiveres av immunostimulanter, som er kjemiske komponenter som gjør dyr mer resistente mot infeksjoner forårsaket av virus, bakterier, sopp og parasitter (Verschuere et al. 2000). Probiotiske organismer kan ha evne til å stimulere det uspesifikke immunsystemet (Sahu et al. 2008), og det har blitt vist at tilførsel av *Clostridium butyricum* forsterket resistensen mot vibrose hos fisk ved at leukocytene sin fagocytiske aktivitet ble økt (Sakai et al. 1995). Det har også blitt vist at en *Bacillus sp.* ga beskyttelse mot sykdom hos reker ved at både det cellulære og humorale immunforsvaret ble aktivert (Rengpipat et al. 2000).

Antiviral aktivitet

Noen probiotiske kandidatbakterier har vist å ha antivirale aktiviteter (Direkbusarakom et al. 1998), men eksakt mekanisme for dette er ikke kjent. Laboratorietester har imidlertid vist at bruk av kjemiske og biologiske substanser, for eksempel ekstrakter fra marine alger og ekstracellulære komponenter fra bakterier kan inaktivere virus (Balcazar et al. 2006).

1.3 Prebiotika

Prebiotika er ingredienser i mat eller fôr som stimulerer vekst av gunstige bakterier i tarmsystemet, og har dermed en indirekte positiv virkning ved å gi fordelaktige egenskaper til vertsorganismen. Disse ingrediensene er ufordøyelige komponenter som metaboliseres av helsefordelaktige bakterier, slik som probiotiske bakterier. Komponenter som brukes som prebiotika har tradisjonelt vært karbohydrater. Karbohydrater kan klassifiseres som monosakkarider, oligosakkarider eller polysakkarider, avhengig av deres molekylære størrelse eller antall enheter av monosakkarider. Prebiotika er vanligvis ufordøyelige oligosakkarider, og årsaken til at de er ufordøyelige kommer av at det anomeriske C-atomet (C1 eller C2) av monosakkarid-enheten har en konfigurasjon som gjør deres glykosid-bindinger ufordøyelig for den hydrolytiske aktiviteten til vertens fordøyelsesenzymer. Glukose, galaktose, fruktose og xylose, er alle eksempler på komponenter av monosakkarider til ufordøyelige oligosakkarider (Ringø et al. 2010). Tabell 1 gir en oversikt over de mest vanlige prebiotiske substratene som benyttes til fisk.

Tabell 1: Vanligste prebiotiske substrat benyttet til fisk. Informasjonen er hentet fra Ringø et al.2010.

Prebiotisk substrat	Kommentar
Inulin	Er oligosakkarider hentet fra sukrose som er isolert fra naturlige grønnsakskilder. Isoleres fra korn, frukt og grønnsaker.
Fruktooligosakkarider (FOS)	Inkluderer alle ufordøyelige oligosakkarider sammensatt av fruktose og glukose-enheter.
Kort-kjedete fruktooligosakkarider (scFOS)	Er et naturlig, løselig prebiotisk fiber som kan utnyttess raskere enn andre FOS.
Mannanligosakkarider (MOS)	Er komplekser av glukomannoprotein som er utvunnet fra celleveggen til gjær.
Galaktooligisakkarider (GOS)	Kan produseres gjennom enzymatisk behandling av laktose. Består av galaktose og glukose.
Xylooligosakkarider (XOS)	Er xylose-baserte oligomerer og forekommer naturlig i bambusskudd, frukt, grønnsaker, melk og honning.
Arabinoxylooligosakkarider (AXOS)	Kan produseres fra enzymatisk depolymerisering av lignocellulose slik som hvetekli.
Isomaltooligosakkarider (IMO)	Er en blanding av isomaltose, isomaltotriose, panose, isomaltotetraose, osv.
GroBiotic®-A	Er et kommersielt produkt og en blanding av delvis autolysert ølgjær, komponenter fra meieri- ingredienser og tørkede fermenteringsprodukt.

Ved å tilføre prebiotika kan man manipulere selekterende forhold i tarmsystemet i akvatiske dyr, slik at forholdene endres og favoriserer gunstige bakterier. Dette kan videre redusere sykdom ved at patogene stammer ikke trives under visse forhold skapt av prebiotika. Bruken av karbohydrater som prebiotika i akvakultursystemer kan ha negativ effekt, da også patogene og opportunistiske bakteriestammer kan dra nytte av karbohydrater, og dermed også videre kolonisere i tarmsystemet. En kombinasjon av probiotika og prebiotika vil kunne danne et symbiotisk forhold med positive effekter (Nayak 2010).

Tarmsystemet er vist å spille en viktig rolle i forhold til helsen til en organisme, og tilførsel av prebiotika for å fremme vekst av gunstige bakterier og samtidig hemme vekst av patogene bakterier, er vist å være positiv i landdyr. Informasjon angående virkningen i akvatiske dyr er dårlig, og generelt er tarmsystemet i fisk, inkludert oppdrettsfisk, dårlig karakterisert. Dette gjelder særlig den anaerobe mikrobielle floraen. En videre karakterisering innen dette området er nødvendig for å undersøke effekten tilførsel av prebiotika kan ha på helsen og overlevelsen til fiskelarver under kultivering. Anaerob flora er særlig interessant da tarmen til larver blir anaerob etter hvert som larvene vokser. (Ringø et al. 2010).

1.4 Hva er gjort av tidligere forskning?

1.4.1 Forskning på probiotika innen akvakultur

Forskning angående bruk av bakterier til å kontrollere sykdom blant fisk, ble foreslått allerede i 1980 (Yasuda og Taga 1980), og på slutten av 80-tallet dukket den første publikasjonen angående biologisk kontroll i akvakultur opp (Kozasa 1986). Siden da har forskning innen dette området hatt en kontinuerlig økning. Probiotika blir generelt tilført gjennom fôr eller direkte til kultiveringstanken som forebyggende middel mot infeksjon av patogene bakterier (Verschuere et al. 2000).

Tidligere forskning på potensielle probiotiske stammer har fokusert mye på evne til å hemme patogene stammer, og mye av denne forskningen er studier av inhiberingseffekt *in vitro*. Alle metodene som hittil har blitt benyttet til dette formålet har gått ut på at en bakteriestamme produserer en ekstracellulær substans som enten inhiberer seg selv eller en annen bakteriestamme. Den eventuelle inhiberingen har blitt vist med inhibering av vekst for bakteriestammen i flytende eller fast medium (agar). For noen *in vitro* forsøk ble det også utført små *in vivo* forsøk for å undersøke om de probiotiske kandidatene var skadelig mot verten, eller om de hadde evne til å gi beskyttelse når verten ble utsatt for skadelige bakterier. Selv om en potensiell kandidat som probiotisk stamme viser seg å gi inhiberende effekt mot en patogen stamme *in vitro*, betyr dette nødvendigvis ikke at stammen har den samme effekten *in vivo*. Dette vil også kunne medføre at stammer som ikke viser inhiberende effekt *in vitro*, kan tenkes å ha evne til dette *in vivo*. En stor begrensning for studier som blir utført *in vitro* er at probiotiske aktiviteter som immunstimulering, produksjon av fordøyelsesenzymer og konkurranse for festesteder eller næring, ikke kan uttrykkes i laboratoriet i medier. I tillegg blir det vanskelig å undersøke en potensielt probiotisk stamme sin evne til å konkurrere mot alle stammer som potensielt kan skape konkurranse for kandidaten (Kesarcodi-Watson et al. 2008).

Ved *in vivo* studier kan generelt færre patogene stammer undersøkes i forhold til *in vitro* studier. For å undersøke effekt av utvalgte stammer, kan den potensielle probiotiske bakterien tilsettes til vertsorganismen den skal virke på, eller til miljøet rundt organismen, på flere ulike måter. Eksempelvis kan tilsetning foregå gjennom formulert fôr, direkte tilsetning til kultiveringsvannet og tilsetning via levende fôr. Deretter kan patogene eller opportunistiske bakteriestammer tilsettes på samme måte som den potensielle probiotiske stammen for å undersøke eventuell effekt dette gir. Ved slike undersøkelser er det viktig å se på

langtidseffektene. Dette er særlig viktig da veksten av den patogene stammen kan være forsinket grunnet konkurranse for næring og lignende, og ikke virkelig er inhibert (Verschuere et al. 2000).

Av probiotiske bakterier som har blitt foreslått som midler for biologisk kontroll innen akvakultur, har de fleste tilhørt melkesyrebakteriene *Lactobacillus* og *Carnobacterium*, i tillegg til *Vibrio*, *Bacillus* og *Pseudomonas*. Andre arter har også blitt foreslått, blant annet *Aeromonas* og *Flavobacterium* (Balcazar et al. 2006).

1.4.2 Forskning på probiotika til torskelarver

Forskning på bruk av probiotiske bakterier til torskelarver har vist at tilførsel av *Carnobacterium* divergens ga en viss forbedring av resistens mot sykdom for torskeyngel etter eksponering med den patogene bakterien *Vibrio anguillarum* (Gildberg og Mikkelsen 1998). Tilførsel av melkesyrebakterien *Lactobacillus plantarum* til kultiveringsvannet for torskelarver ble vist å endre den bakterielle sammensetningen i fisketarmen, ved å redusere koloniseringen av opportunistiske bakterier (Strøm og Ringø 1993). I et *in vivo* forsøk med torskelarver ga 4 av de probiotiske kandidatene som ble undersøkt bedre overlevelse av larvene enn den positive kontrollen, både ved lave og høye konsentrasjoner av bakteriene. Disse kandidatene var av slektene *Pseudoalteromonas sp.*, *Microbacterium sp.*, *Ruegeria sp.* og *Vibrio gallicus*. I samme forsøk viste også to av de potensielt probiotiske stammene patogenitet mot torskelarvene, og larvene døde ved tilsetning av disse stammene på samme tidspunkt som den negative kontrollen (Fjellheim et al. 2010).

1.5 Mål for oppgaven

Denne oppgaven hadde som mål å karakterisere bakterier isolert fra torskeyngel, for å undersøke om de hadde evne til å være potensielle probiotiske bakterier til bruk for torskelarver. Bakterieisolatene ble valgt ut fra en eksisterende samling fra SINTEF som var karakterisert ved klassiske, mikrobiologiske metoder, i tillegg til sekvensering av deler av 16S rRNA-genet.

Karakteriseringen av bakterieisolatene ble utført under ulike vekstvilkår. Både enkeltstammer og blandingskulturer ble undersøkt for evne til å hemme og utkonkurrere patogene stammer. Normal flora fra torskeyngel ble også inkludert for å undersøke hvilke stammer som dominerte ved naturlige forhold. Analysering for eventuelle negative egenskaper for

stammene ble også undersøkt, og da med hensyn på hemolytiske egenskaper og patogenitet for torskelarver.

Karakterisering ble også utført med hensyn på vekst på ulike substrater. Substrater inkluderte ulike karbonkilder, prebiotika og vanlige fôringredienser som proteinsubstrat. Identifisering av potensielle prebiotiske substrat som kunne stimulere veksten av de probiotiske stammene fremfor patogene var av interesse. Veksten på substratene ble undersøkt ved aerobe og anaerobe dyrkningsforhold.

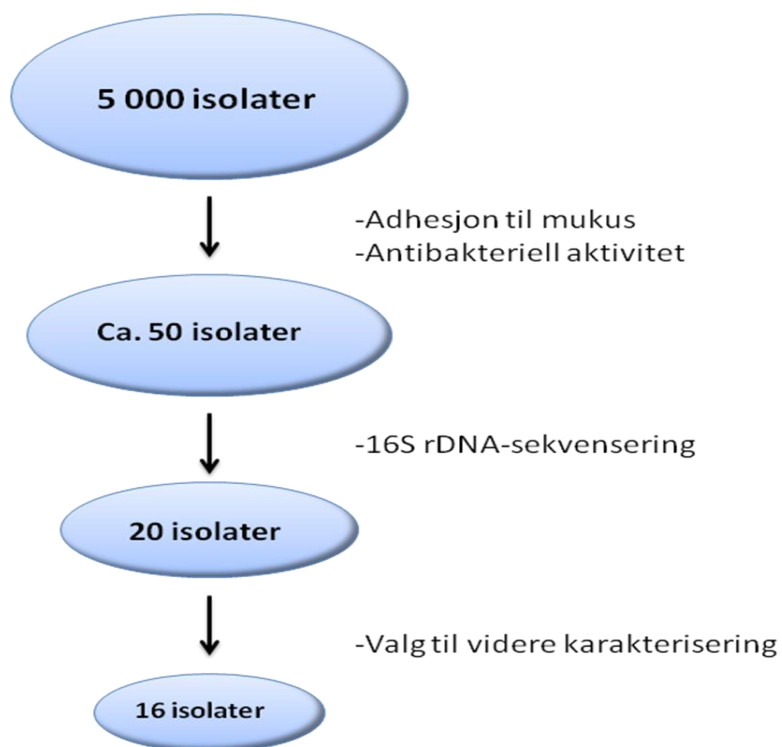
Undersøkelse av evne til å hemme patogene bakterier ble blant annet undersøkt ved denaturerende gradient gelelektroforese (DGGE), og fermenteringsprodukt ble analysert ved høytrykksvæskekromatografi (HPLC).

2 Materialer og metoder

2.1 Bakteriekultur og oppbevaring

2.1.1 Bakterieisolater

Bakterieisolatene som ble benyttet i denne oppgaven stammet fra et prosjekt i SINTEF, som ble utført i perioden 2004-2006. Bakteriene ble isolert fra torskeyngel, og om lag 5 000 isolater ble screenet med hensyn på evne til adhesjon til mukus og antimikrobiell aktivitet mot to patogene isolater; *Vibrio anguillarum* (*V. anguillarum*) HI 610 (også kalt *Listonella anguillarum*) og *Marinomonas* sp. Av disse isolatene ble ca. 50 valgt ut basert på evne til adhesjon til mukus og/eller antagonisme mot en eller begge de patogene isolatene. Stammene ble videre identifisert ved 16S rDNA-sekvensering, som reduserte antallet isolater til vel 20 ved at isolater som mest sannsynlig var identiske ble utelatt. Av de 20 isolatene, ble 16 stammer valgt ut til videre karakterisering i denne oppgaven (Tabell 2). Av de 16 stammene hadde 9 av dem påvist evne til mukusadhesjon og 11 vist å være antagonistisk. Bakteriestammene var av slektene *Vibrio*, *Microbacterium*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Marinomonas*, *Flavobacterium* og *Shewanella*. En oversikt over historikken for valg av stammer til videre karakterisering, er gitt i Figur 3.



Figur 3: Oversikt over historikken for valg av bakteriestammer til videre karakterisering.

I tillegg til de 16 stammene fra SINTEF sin samling, ble 4 probiotiske kandidater fra Anders J. Fjellheims doktoravhandling; "Selection and administration of probiotic bacteria to marine fish larvae" (Fjellheim 2006) inkludert i denne oppgaven. Disse 4 var av slektene *Microbacterium sp.*, *Vibrio gallicus*, *Ruegeria sp.* og *Pseudoalteromonas sp.*, og var vist å ha positiv effekt som potensielle probiotiske stammer (punkt 1.4.2). To av stammene hadde antagonisme mot patogene stammer og en av dem var fermentativ. Disse 4 stammene vil videre bli referert til som de 4 potensielt probiotiske stammene i denne oppgaven.

Patogene stammer inkludert i denne oppgaven var *V. anguillarum* HI 610 og *Marinomonas sp.* En oversikt over alle stammene som ble valgt ut til videre karakterisering i denne oppgaven er gitt i Tabell 2. Navnet på stammene fra SINTEF sin samling var basert på resultater fra sekvensering, som beskrevet over. En del av sekvenseringsresultatene viste dårlig likhet for stammene og dermed er ikke de påståtte stammene 100 % sikker. Dette blir diskutert nærmere senere i oppgaven (punkt 3.2 i resultatdelen).

Tabell 2: Oversikt over stammer som ble valgt ut til videre karakterisering i oppgaven. Stammene er gitt med slektsnavn, ID nummer, opprinnelse og egenskaper valget var basert på. Påviste egenskaper er markert med +, og ikke påviste er markert med -. Stammene med opprinnelse A. Fjellheim (Fjellheim 2006) var alle vist å ha evne til adhesjon til mukus, men ikke alle ble vist å vokse i mukus. På grunnlag av dette er + satt på RA 4-1 som var den stammen med høyest % adhesjon til mukus og som samtidig vokste i mukus (Fjellheim et al. 2010).

Stamme	Opprinnelse	Antagonisme	Mukusadhesjon	Fermentativ
<i>Vibrio</i> 1-1 D8	SINTEF isolat	-	+	(+)*
<i>Vibrio</i> 1-2 D12	SINTEF isolat	-	+	(+)*
<i>Photobacterium</i> 1-12 D8	SINTEF isolat	-	+	(+)*
<i>Photobacterium</i> 1-8 D12	SINTEF isolat	-	+	(+)*
<i>Photobacterium</i> 1-8 B9	SINTEF isolat	+	-	(+)*
<i>Photobacterium</i> 1-2 D8	SINTEF isolat	+	-	(+)*
<i>Microbacterium</i> 3-5 G10	SINTEF isolat	+	-	(+)*
<i>Shewanella</i> 1-2 D6	SINTEF isolat	+	-	(+)*
<i>Shewanella</i> 1-8 C8	SINTEF isolat	+	-	(+)*
<i>Pseudomonas</i> 1, 3-7 C4	SINTEF isolat	+	+	-
<i>Pseudomonas</i> 2, 3-14 E9	SINTEF isolat	+	+	-
<i>Pseudomonas</i> 3, 3-1 C11	SINTEF isolat	+	+	-
<i>Pseudomonas</i> 4, 3-9 B8	SINTEF isolat	+	-	-
<i>Marinomonas</i> 3-14 D2	SINTEF isolat	+	+	-
<i>Marinomonas</i> 3-14 F8	SINTEF isolat	+	-	-
<i>Flavobacterium</i> 3-5 F9	SINTEF isolat	-	+	-
<i>Ruegeria</i> RA 4-1	A. Fjellheim	+	-	-
<i>Pseudoalteromonas</i> RA 7-14	A. Fjellheim	+	-	-
<i>Microbacterium</i> ID 3-10	A. Fjellheim	-	+	-
<i>Vibrio gallicus</i> RD 5-30	A. Fjellheim	-	-	+
<i>V. anguillarum</i> HI 610	Havforskningsinstituttet, Bergen	-	-	-
<i>Marinomonas</i> sp.**	Troms Marin Yngel, Tromsø	-	-	-

*Stammene kan teoretisk ha evne til å være fermentativ.

** Stammen ble isolert etter høy dødelighet blant larver.

2.1.2 Oppbevaring av isolatene

Isolatene ble dyrket opp i Marine broth (MB) 2216 (DIFCO, USA) tilsatt 5 g/L glukose (Apotekerproduksjon, Norge) i sterile 250 ml ristekolber, autoklavert ved 120 °C i 20 minutter. Ristekolbene ble inkubert i et Minitron risteskap (Infors AG, Bottmingen, Sveits) ved 17 °C og 160 rpm (rotasjoner per minutt), frem til bakteriene var i god eksponentiell vekst.

God eksponentiell vekst, med en OD (optisk tetthet, "density") > 1-2, var ønskelig på kulturene. OD ble målt som beskrevet under punkt 2.5.2. Ved OD > 1-2 i kulturene, ble det tilsatt 3 ml 86-88 % steril glycerol (kat.nr.33224, Sigma-Aldrich Norway AS) til 15 ml kultur, som tilsvarte ca. 20 % sluttkonsentrasjon i kulturene. 1 ml av bakteriekulturene, tilsatt glycerol, ble deretter overført til cryotube 1 ml ampuller (NUNC, Roskilde, Danmark) før nedfrysning ved -80 °C til oppbevaring.



Figur 4: Minitron risteskap (Infors AG, Bottmingen, Sveits) benyttet til inkubering av bakteriekulturer.

2.1.3 Forkultur

For at bakteriestammene skulle være i god eksponentiell vekst før forsøk, ble ampuller av stammene tint opp fra frysen, og videre dyrket opp i sterile 50 ml sentrifugerør (Sarstedt, Tyskland) med 20 ml MB 2216 (DIFCO, USA) tilsatt 5 g/L glukose (Apotekerproduksjon, Norge). Innokulum som ble benyttet fra ampullene var 200 µl (1 %). Sentrifugerørene ble inkubert i et Minitron risteskap (Infors AG, Botmningen, Sveits) ved 17 °C og 160 rpm frem

til $OD > 1-2$ og god eksponentiell vekst var oppnådd på kulturene. Kulturene var da klar til å benyttes videre i forsøk.

2.2 Medium til vekstforsøk

Basismedium for dyrkning av de fleste bakteriestammene var MB 2216 (DIFCO, USA) eller såkalt redusert MB, som inneholdt de samme komponentene som fullversjonen av mediet fra DIFCO, men hvor innholdet av gjær og pepton var redusert (Tabell 3).

For å holde pH i mediet mest mulig stabilt gjennom forsøk, ble ekstra buffer tilsatt redusert MB i forhold til det kommersielle mediet fra DIFCO. Det ble da benyttet MOPS (kat.nr M1254, Sigma-Aldrich Norway AS), som er en buffer som fungerer i området pH 6,5 – 7,9. Etter tilsats av buffer ble pH i mediet justert til 7,5 før det ble sterilfiltrert gjennom et filter med porestørrelse 0,22 μm over til stericup Millipore ExpressTM PLUS sterilflaske (Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts) for oppbevaring.

Karbonkilder som ble tilsatt mediet varierte for ulike forsøk, og inkluderte glukose, alanin, natriumglutamat, alginat, β -glukan, inulin og laminaran. Alanin og natriumglutamat ble tilsatt i konsentrasjon 9 g/L, alginat, β -glukan, inulin og laminaran ble tilsatt i konsentrasjon 6,5 g/L og glukose ble tilsatt i 6,5 og 9 g/L, avhengig av forsøk. Fremgangsmåte for tillaging av karbonkildene er gitt i Vedlegg A (Tabell A-1 og Tabell A-2).

Noen av bakteriestammene vokste dårlig på begge MB-mediene og disse stammene ble dyrket i Brain Heart Infusion (BHI) (CM1135, Oxoid, UK) tilsatt 15 g/L NaCl (Apotekerproduksjon, Norge) og BHI tilsatt 15 g/L NaCl, 1 g/L vitaminkonsentrat (se Vedlegg A, Tabell A-3) og 0,5 g/L spormineraler (Tabell 4).

Tabell 3: Komponenter benyttet i redusert MB gitt med sluttkonsentrasjon i g/L. Komponentene ble løst i RO (revers osmose)-vann som er filtrert vann uten innhold av mineraler.

Komponent	Merke	Kat.nr	Kons. g/L
Pepton	Oxoid	LP 0037	2,0
Gjærekstrakt	Oxoid	LP 0021	1,0
Ammoniumnitrat, NH_4NO_3	Riedel-de Haën	1217	0,5
Jern, Fe_3 -citrat	Sigma-Aldrich	F-6129	0,1
Natriumklorid, NaCl	Apotekerproduksjon	08L051/3	19,5
Kaliumdihydrogenfosfat, KH_2PO_4 *	Riedel-de Haën	30407	2,0
Magnesiumsulfat heptahydrat, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	Riedel-de Haën	13142	1,0
Kalsiumklorid dihydrat, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich	12022	0,10
Kaliumklorid, KCl	Riedel-de Haën	31248	0,55
Kalium bromid, KBr	Fluka	60089	0,08
MOPS	Sigma-Aldrich	M1254	10

* Lages i egen løsning og pH justeres til 7,5 før løsningen autoklaveres ved 120 °C i 20 minutter. Fosfatløsningen ble tilsatt til redusert MB i konsentrasjonen 10 ml/L, men ikke før mediet benyttes i forsøk, da den kan felle ut dersom den tilsettes medium som oppbevares over tid.

I tillegg ble det tilsatt spormineraler til redusert MB. Spormineralene ble løst i RO-vann og sterilfiltrert gjennom et filter med porestørrelse 0,22 μm over til stericup Millipore Express™ PLUS sterilflaske (Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts) for oppbevaring. Spormineralene ble på samme måte som fosfatløsningen ikke tilsatt mediet før start av forsøk. Det ble da tilsatt 10 ml/L av mineralene til redusert MB. Komponentene for tillaging av spormineraler er gitt i Tabell 4.

Tabell 4: Spormineraler til redusert MB angitt med konsentrasjon i g/L.

Komponent	Merke	Kat.nr	Kons. i mediet
Strontiumklorid, $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Sigma- Aldrich	25,552-1	34
Borsyre, H_3BO_3	Merck	Art.165	22
Natriummetasilikat, $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich	S-4392	4,0
Natriumfluorid, NaF	Fluka	71518	2,4

I noen forsøk ble fôringredienser benyttet som vekstsubstrat (Tabell 5). Fôringrediensene inneholdt også forbindelser som normalt fordøytes og tas opp i tarmen, og ville derfor ikke være vekstsubstrat for bakteriene. På bakgrunn av dette ble fiskemel og Artemia behandlet med fordøyelsesenzymer. Lavmolekylære (lettfordøyelige) reaksjonsprodukter ble fjernet ved dialyse.

Tabell 5: Oversikt over fôringredienser benyttet som vekstsubstrat i forsøk. Ingrediensene er gitt med navn og opprinnelse.

Fôringrediens	Opprinnelse
Fiskemel	LT-mel, Felleskjøpet, Trondheim
Artemia	SINTEF Fiskeri og havbruk, juni-10
Gemma Micro 300	Skretting, Norge

Behandlingen med fordøyelsesenzymer ble utført av SINTEF og ble ikke utført på det kommersielle starfôret fra Skretting. Metoden bestod av behandling med pepsin ved 37 °C, pH 1,5 i 4 timer. Videre var det ulike steg for fiskemel og Artemia. Fiskemel ble behandlet med en blanding av trypsin og chymotrypsin, pH 7,0 i 5 timer. Artemia ble behandlet med pankreatin ved 37 °C, pH 7,0 i 3 timer.

En oversikt over enzymene som ble benyttet, er gitt i Tabell A-4, Vedlegg A. Reaksjonene ble fulgt ved økning i UV-absorbans (280 nm) og avsluttet når det ikke lenger var vesentlig økning. Produktet ble dialysert mot vann (Spectrapor, MWCO 1000).

Til bruk i forsøk ble fiskemel og Artemia løst i redusert MB (Tabell 3) og Gemma Micro 300 fra Skretting ble løst i RO-vann. Konsentrasjon av fiskemel og Artemia som ble benyttet var 6,5 g/L. Gemma Micro bestod av 59 % protein og ble tilsatt mediet slik at konsentrasjonen av protein var på 6,5 g/L. Alle løsningene ble autoklavert i 20 minutter ved 120 °C.

2.3 Vekstforsøk under aerobe betingelser

2.3.1 Vekstforsøk i sentrifugerør

Til vekstforsøk i sentrifugerør ble det benyttet sterile 50 ml sentrifugerør (Sarstedt, Tyskland). Til forsøk med renkulturer ble det tilsatt et volum på 15 -20 ml medium og 200 µl forkultur av bakteriestammene, og til forsøk med blandingskulturer ble det tilsatt 20 ml medium med OD 0,1 sammenlagt for alle stammene. For forsøk med renkulturer ble sentrifugerørene inkubert i

et Minitron risteskap (Infors AG, Botmmingen) ved 17 °C og 160 rpm, og i forsøk med blandingskultur ble sentrifugerørene inkubert på ”rørsnurrer” (Labinco, modell LD-76, Nederland) i inkubatorskap Sanyo incubator (Sanyo, USA) ved 17 °C og 20 rpm. En gang i døgnet ble sentrifugerørene ristet forsiktig med lokket av, utført i sterilbenk, for å tilføre nytt oksygen til rørene.

2.3.2 Vekstforsøk i brønnplate

Til vekstforsøk av renkulturer i brønnplate ble det benyttet en steril dypbrønnsplate (Greiner bio-one, Tyskland). Brønnplaten bestod av 96 brønner hvor hver brønn hadde v-form og et volum på 2 ml. For forsøk med renkulturer ble det tilsatt 1 ml medium og 20 µl forkultur av bakteriestammene. Til forsøk med blandingskulturer ble det benyttet 1 ml medium og 60 µl bakteriekultur. Kulturen var blandet sammen i en slik mengde at bakteriestammene hadde noenlunde lik konsentrasjon basert på OD. Fortynningsoppsett for blandingskulturen er gitt i Vedlegg G. Brønnplatene ble for begge forsøkestypene inkubert ved 17 °C og 200 rpm i et Minitron risteskap (Infors AG, Botmmingen). Etter hvert som veksten tok seg til, ble ristingen gradvis skrudd opp til 300 rpm.

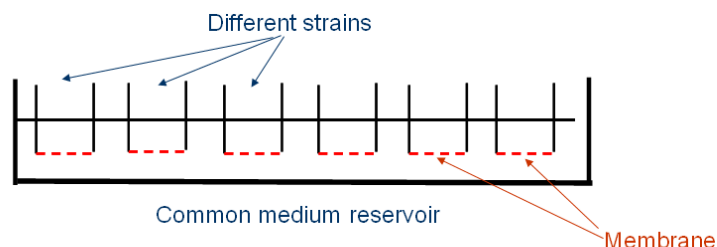
2.3.3 Vekstforsøk i brønnplate med filterinnsatser og felles reservoar for vekstmedium

Vekstforsøk i brønnplate med filterinnsatser og felles reservoar for vekstmedium, ble utført i en steril Millicell® 24-brønns-cellekulturplate (Millipore™, Carrigtwohill, CO.Cork, Ireland) hvor hver brønn hadde et filter i bunnen. Brønnene med filter var plassert i en plate som var inndelt i 4 reservoarer, slik at når platen var fylt med medium, ble brønnene stående nede i mediet. På denne måten fungerte filteret som en passasje for eventuelle komponenter produsert av stammene, samtidig som filteret hindret passasje av bakterieceller. Bakteriestammene ble fortynnet til OD tilsvarende 0,1, og 0,4 ml av de fortynnete kulturene ble tilsatt per brønn i platen. Fremgangsmåte for fortynning er gitt i Vedlegg H.

Til reservoaret i platen ble det tilført 20 ml medium (reduert MB tilsatt 6,5 g/L glukose). Som kontrollplate ble det i forsøket inkludert en steril 24-brønnsplate (NUNC™, Roskilde, Danmark) uten filter, for å undersøke vekst av stammene når de ble dyrket i eget medium. Til kontrollplaten ble det tilført 0,7 ml fortynnet kultur av bakteriestammene per brønn. Brønnplatene ble inkubert på IKA®-Schüttler MTS4 Electronic risteplate i inkubatorskap, Sanyo incubator (Sanyo, USA), ved 17 °C og 300 rpm. En illustrasjon for oppbygging av brønnplaten er gitt i Figur 5.

For å undersøke at reservoaret var fritt for vekst ble det målt OD av dette mediet ved prøveuttak. Ingen vekst ble påvist i reservoaret.

Test system:

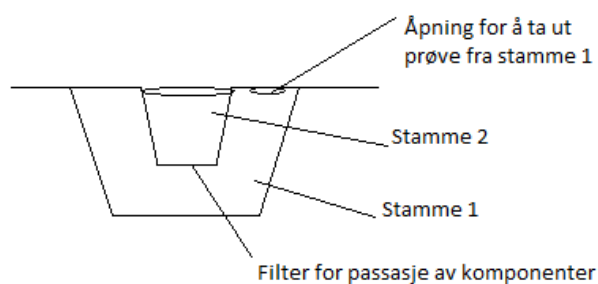


Figur 5: Oversikt over oppbygging av brønnplate med filterinnsatser og felles reservoar. Illustrasjonen er tegnet av SINTEF Materialer og kjemi.

2.3.4 Vekstforsøk i brønnplate med filterinnsatser og separate reservoar for vekstmedium

Vekstforsøk i brønnplate med filterinnsatser og separate reservoar, ble utført i en Millicell® steril 24-brønnsplate (Millipore™, Carrigtwohill, CO.Cork, Ireland) hvor en Millicell® steril cellekulturplate (Millipore™, Carrigtwohill, CO.Cork, Ireland) ble plassert oppi. Hver brønn hadde et filter i bunnen av polykarbonat (PCF) som hadde porestørrelser på 0,4 µm. Filteret fungerte som en passasje slik at mediumkomponenter fritt kunne vandre gjennom membranen, mens bakterieceller ble forhindret i å passere. Bakteriestammene ble fortynnet til OD tilsvarende 0,1 (se Vedlegg H) og deretter overført til brønnplatene.

Stammene ble tilsatt i brønnene på hver sin side av filteret, og i motsatt rekkefølge på neste brønn. Dette førte til at når en stamme var tilsatt utsiden i en brønn, ble den tilsatt innsiden i neste brønn, og motsatt for stammen den ble dyrket mot. Stammene ble også dyrket i renkultur med samme stamme både på innsiden og utsiden av filteret, for å undersøke vekst uten påvirkning fra andre stammer. En skjematisk fremstilling over brønnene i Millipore-platen er gitt i Figur 6.



Figur 6: Brønner i Millipore-plate med filterinnsatser. Figuren gir en skjematisk oversikt over hvordan platen var bygget opp med en brønn plassert oppi en annen, separert av et filter for passasje av komponenter produsert av bakteriestammene som befant seg på hver sin side av filteret. Det var laget en åpning på toppen av platen for å komme til mediet som befant seg i den underste brønnen, uten å måtte løfte opp den øverste brønnen.

Til brønnene på innsiden av filteret ble det tilsatt 0,4 ml av hver av stammene, og til brønnene på utsiden av filteret ble det tilsatt 0,8 ml av hver av stammene. Platene ble inkubert på IKA®-Schüttler MTS4 Electronic risteplate i inkubatorskap Sanyo incubator (Sanyo, USA) ved 17 °C og 300 rpm.

2.3.5 Dyrkning på agarplater

Agarplater ble laget ved å tilsette MB 2216 (DIFCO, USA) og 1,5 % bakteriologisk Agar NO.1 (kat.nr LP0011, Oxoid, UK) til RO-vann. Løsningen ble blandet på magnetrører, og deretter autoklavert ved 120 °C i 20 minutter. Etter autoklaving ble mediet satt i vannbad, som på forhånd var varmet opp til 50 °C, i ca. 5 minutter. Deretter ble mediet overført til petriskåler, ca. 20 ml medium per skål. Deretter ble skålene oppbevart i romtemperatur på benk i minimum 24 timer frem til agaren stivnet. Når agaren var stivnet, ble platene overført til poser som ble forseglet slik at agaren ikke tørket ut. Agarplatene ble oppbevart i romtemperatur etter innpakking. Platene ble benyttet til dyrkning av bakteriestammer og til utsåing for bestemmelse av kimtall. Til dyrkning av bakteriene på platene, ble det benyttet en 10 µl podeøse for utsåing, og til kimtall ble det benyttet en egen fremgangsmåte som er beskrevet under punkt 2.5.3.

2.4 Vekstforsøk under anaerobe betingelser

2.4.1 Vekstforsøk av renkultur i Hungate glassrør

Medium for anaerob dyrkning av renkulturer var redusert MB tilsatt ulike karbonkilder (se Tabell 3 for tillaging av redusert MB). Redusert MB uten tilsatt karbonkilde ble tatt med som en kontroll under anaerobe forhold for å påvise at stammene virkelig vokste på de tilsatte karbonkildene. Hungate glassrør og tilhørende septum ble autoklavert ved 120 °C i 20 minutter. Til rørene ble det videre tilført 15 ml medium og 200 µl forkultur før rørene ble tettet igjen med gummiseptum og skrukork. Skrukorken hadde hull i midten slik at det var mulig å ta ut prøver ved å stikke en steril sprøyte gjennom gummiseptumet. Hungate-rørene ble inkubert i et Minitron risteskap (Infors AG, Botmmingen) ved 17 °C og 160 rpm. Stammer som teoretisk ikke hadde evne til anaerob vekst, ble ikke dyrket under anaerobe forhold.

2.4.2 Vekstforsøk i brønnplate med filterinnsats og separate reservoar for vekstmedium

Vekstforsøk under anaerobe forhold i brønnplater med filterinnsatser og separate reservoar, ble utført på samme måte som beskrevet for aerobe dyrkningsforhold (2.3.4). For å få anaerobe forhold ble mediene før oppstart av forsøket plassert i oppbevaringsbokser hvor miljøet ble gjort anaerobt ved poser med indikator fra BD GasPakTMEZ (BD, USA) som danner anaerobt miljø. I tillegg ble fortynningen av bakteriestammene og tilsetningen av kulturer til platene utført i en anaerob arbeidsbenk (Figur 7). Etter tilsetning av kulturene til brønnene ble platene plassert i poser som kunne forsegles, og det ble skapt et anaerobt miljø i oppbevaringsposene ved bruk av posene fra BD GasPakTMEZ (BD, USA). Deretter ble platene inkubert på IKA®-Schüttler MTS4 Electronic risteplate i inkubatorskap Sanyo incubator (Sanyo, USA) ved 17 °C og 300 rpm.



Figur 7: Anaerob arbeidsbenk benyttet for å sette opp forsøk med anaerobe vekstvilkår. Utstyr som var nødvendig til forsøket ble sluset inn i benken ved hjelp av et kammer som ses til venstre i bildet.

2.4.3 Vekstforsøk av blandingskultur i Hungate glassrør

Vekstforsøk av blandingskulturer ble utført i sterile Hungate-rør, autoklavert ved 120 °C i 20 minutter. For å lage anaerobt vekstmedium ble komponenter til mediet på forhånd veid ut og overført til veieskip før de ble sluset inn i den anaerobe arbeidsbenken. Her ble komponentene tilsatt anaerobt vann i anaerobe flasker før korker ble satt på flaskene til forsegling. Deretter ble flaskene tatt ut av benken og autoklavert ved 120 °C i 20 minutter for at mediet skulle bli sterilt før tilsetning av bakteriestammer. Mediet ble deretter igjen sluset inn i anaerobbenken og bakteriestammene ble hver for seg fortynnet til OD tilsvarende 0,1 i vekstmediet (se Vedlegg H). Fortynningen ble utført i sterile 10 ml rør (Sarstedt, Tyskland) før alle de fortynnede kulturene ble blandet sammen i sterile Hungate glassrør til et totalt volum på 15 ml, utført i den anaerobe arbeidsbenken. Hungate-rørene ble inkubert på ”rørsmurrer” (Labinco, modell LD-76, Nederland) ved 20 rpm i inkubatorskap Sanyo incubator (Sanyo, USA) ved 17 °C.

2.5 Målemetoder

2.5.1 pH-måling

Bestemmelse av pH i bakteriekulturer ble utført på et kalibrert PHM 210 standard pH-meter (Meterlab®, Lyon, Frankrike). Elektroden (Mettler toledo Inlab®Routine, 3 mol/L KCL elektrolytt), ble ført ned i volumet av bakteriekulturen og pH ble avlest når pH-meteret viste en stabil verdi.

2.5.2 OD-måling

OD gir en indikasjon på hvor blakket en løsning er ved at det måles hvor mye lys som spres og absorberes av kulturen. OD vil gi et mål på biomassen av bakterier i kulturen (p.g.a. lysspredning), men OD vil også bli påvirket av pigmenter i kulturen hvis de absorberer lys av den bølgelengden som benyttes.

Prøver dyrket i sentrifugerør og Hungate glassrør

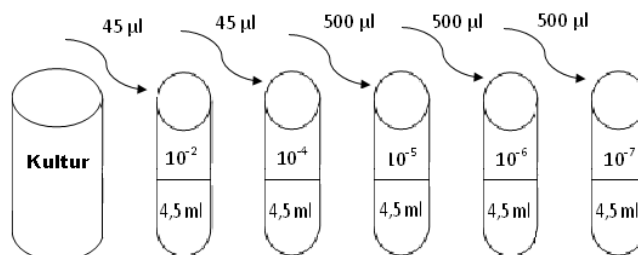
Bestemmelse av OD på kulturer dyrket i sentrifugerør eller i Hungate glassrør, ble utført på Shimadzu UV-1700 PharmaSpec spektrofotometer (Shimadzu GmbH, Tyskland). Prøveuttak ble utført ved å ta ut 1 ml prøve, utført i sterilbenk, fra sentrifugerørene med pipette og fra Hungate-rør med steril sprøyte. Prøvene ble videre overført til 10 x 4 x 45 mm mikrokyvetter (Sarstedt, Tyskland) og OD ble målt ved 600 nm. Da spektrofotometeret har et begrenset område for hvor sammenhengen mellom biomasse/bakterietetthet og OD er lineært, var det nødvendig å fortynne prøver som var over en maksimum OD-verdi. Prøver med OD mellom 0,4 – ca. 1,5 ble derfor fortynnet 5 ganger i 0,9 % NaCl på Microlab® 500 series fortynner (Hamilton Company, USA) og prøver med OD > 1,5, ble fortynnet 25 ganger. Deretter ble det på nytt målt OD på de fortynnede prøvene og OD-verdien ble multiplisert opp med fortynningen for endelig OD.

Prøver dyrket i brønnplate

Bestemmelse av OD på kulturer dyrket i brønnplater, ble utført på brønnplateleser Spectramax Plus 8010-U-506 (Molecular Devices, USA) og på spektrofotometer FLUOstar Omega (BMG LABTECH GmbH, Offenburg, Tyskland) ved 600 nm. Prøveuttak ble utført ved å ta ut 75 µl prøve fra kulturene som videre ble overført til brønner i en ikke steril 96-brønnsplate (NUNC™, Roskilde, Danmark). For best oversikt over prøvene, ble overføringen til brønnplaten utført i samme mønster som kulturene var tilsatt dyrkningsplaten hvor forsøket ble utført. Fortynning av disse prøvene var ikke nødvendig da brønnplateleseren måler OD med kortere lysvei enn på Shimadzu UV-1700 hvor absorpsjonen måles gjennom kulturen med 1 cm lysvei. Forholdet mellom OD målt i kyvette og brønnplate er grovt estimert til 1,5. Det vil si at prøver målt i brønner bør multipliseres opp med 1,5 for å sammenlignes med måling i kyvette.

2.5.3 Bestemmelse av kimtall

Kimtall gir en indikasjon på antall kolonidannende bakterier som kan vokse opp til en tellbar koloni på et gitt vekstmedium, under gitte vekstbetingelser (CFU=colony forming units). For bestemmelse av CFU/ml i bakteriekulturer ble det satt opp en fortynningsrekke, som vist i Figur 8. Fortynningsrekken var satt opp av sterile 13 ml rør (Sarstedt, Tyskland) som var fylt med 4,5 ml fortynningsmedium. Medium som ble benyttet som fortynningsmedium var RO-vann tilsatt 1 g/L pepton (LP 0037, Oxoid, UK) og 20 g/L NaCl (Apotekerproduksjon, Norge), autoklavert ved 120 °C i 20 minutter. Kulturene ble overført til rørene som vist i Figur 8, og ble blandet på IKA® Vortex, genius 3 bordmikser (Sigma-Aldrich Norway AS) mellom hver tilsetning. Det ble sådd ut til en 10^{-6} , 10^{-7} og 10^{-8} fortynning fra kulturene på agarplater. 3 paralleller med 100 µl kultur per plate ble benyttet for hver fortynning. Bakteriekulturen ble fordelt utover platene ved å bruke en glasstav som var sterilisert i etanol, og brent av mellom de ulike stammene. Utsåing ble gjort fra mest fortynnet til minst fortynnet plate, slik at glasstaven ikke trengte å brennes av mellom plater tilhørende samme bakteriestamme. Platene ble deretter inkubert i inkubatorskap, Sanyo incubator (Sanyo, USA), ved 17 °C i 3-4 døgn, frem til synlige kolonier. Koloniene ble talt manuelt med Stuart® colony counter (Bibby Scientific Limited, UK) og antallet bakterier pr ml ble beregnet. Beregningsmetode for CFU/ml er gitt i Vedlegg I.



Figur 8: Fortynningsoppsett til kimtall. Hvert av rørene inneholdt 4,5 ml sterilt peptonvann (1 g/L) tilsatt NaCl (20 g/L). Fra bakteriekulturen ble det tatt ut 45 µl som ble overført til røret merket 10^{-2} , blandet, og nye 45 µl ble overført til neste rør. Videre ble røret blandet og 500 µl ble tatt ut og overført til neste rør, og slik ble det fortsatt ut fortynningsrekken før overføring til agarplater til en 10^{-6} , 10^{-7} og 10^{-8} fortynning.

2.5.4 Analysering av syrer og sukker ved HPLC

Fermenteringsprodukt fra anaerob dyrkning av stammene ble analysert ved høytrykksvæskeskromatografi (HPLC). Produkter produsert fra aerob dyrkning ble også analysert. Mengde glukose omsatt i kulturer ble også bestemt ved hjelp av HPLC.

Opparbeiding av prøver fra kulturer med volum > 1 ml

Prøver til analyser av syre- og sukkerkonsentrasjon ved HPLC ble laget ved å ta ut 1 ml kultur som ble overført til 1,5 ml eppendorfrør (Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland) og sentrifugert i 2 minutter ved 12 000 rpm i minispinn sentrifuge (Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland). Supernatanten ble pipettert av og overført til nye 1,5 ml eppendorfrør. Ca. 0,35 ml prøve ble filtrert gjennom et GHP Acrodisc 13 sprøytefilter (PALL Corporation, Port Washington, NY, USA) med 0,2 µm porestørrelse, over til 32 x 11,6 mm Shimadzurør (Xholger Teknologi) tilpasset analysering ved HPLC. Det ble på forhånd satt inn en 30,75 x 6,0 mm innsats (Xholger Teknologi) i Shimadzurørene for å redusere det nødvendige prøvevolumet.

Opparbeiding av prøver fra kulturer med volum < 1ml

Prøver til analyser av syre og sukker hvor det totale volumet med kultur var < 1 ml ble laget ved å ta ut 150 µl prøve som ble overført til 1,5 ml eppendorfrør (Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland) og sentrifugert i 2 minutter ved 12 000 rpm i minispinn sentrifuge (Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland). Da volumet her var for lite til å filtreres fritt for bakterier, ble disse prøvene sentrifugert to ganger og supernatanten ble pipettert av for hver sentrifugering, før analysering ved HPLC. Shimadzurør med innsats (Xholger Teknologi) ble også her benyttet for analyseringen.

Analyse

Prøvene ble analysert på en Aminex HPX-87-H kolonne (Biorad) eluert med H₂SO₄-buffer (5mM, 0,6ml/min) ved 45 °C. Elueringstiden var 25 minutter og komponentene ble detektert med RI-detektor (RID-6A, Shimadzu, Japan) og UV-detektor (SPD-6AV, Shimadzu, Japan) ved 210 nm. Standarder som ble inkludert i analyseringen, var etanol (16 g/L) glukose (4,5 g/L), smørsyre (40,79 mM), propionsyre (30,70 mM) og analysestandard av organiske syrer (BioRad, USA) som inneholdt en blanding av sitronsyre (4,0 µmol/ml), oxalsyre (0,8 µmol/ml), eplesyre (8,0 µmol/ml), ravsyre (20,0 µmol/ml), acetat (40,0 µmol/ml) og maursyre (20,0 µmol/ml). Konsentrasjonen av de ulike komponentene som ble funnet i prøvene ble bestemt ved sammenligning med de kjente standardene. Kun fermenteringsprodukt som er

sluttprodukter ble ansett som viktige fermenteringsprodukt. Dette gjaldt acetat, etanol og maursyre (Moat et al. 2002).

2.5.5 Analysering av aminosyrer ved HPLC

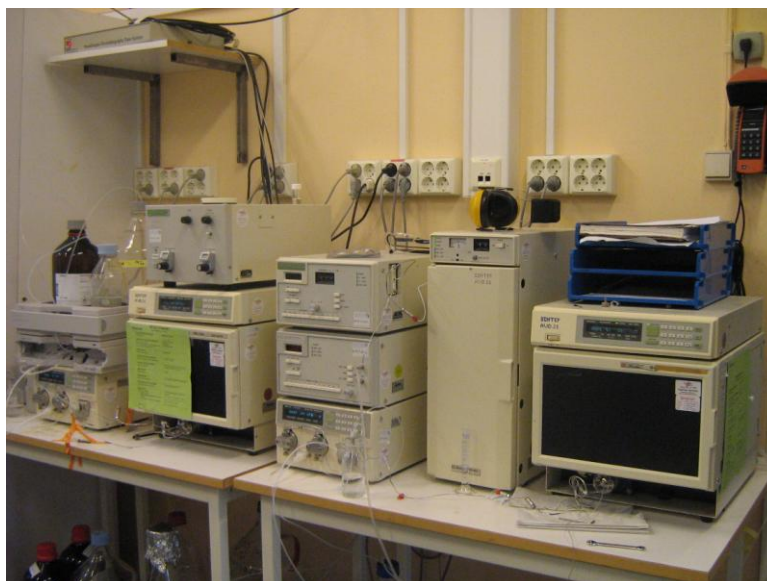
Opparbeiding av prøver

Prøver til analysering av aminosyrekonentrasjoner ved HPLC ble laget ved å blande til en løsning av bakteriekultur og sulfosalisylysyre i forholdet 4:1, dvs 0,4 ml bakteriekultur og 0,1 ml sulfosalisylysyre. Løsningen ble laget i 1,5 ml eppendorfrør (Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland) og inkubert i kjøleskap ved 4 °C i ca. 10 minutter før sentrifugering i 5 minutter ved 12 000 rpm og 20 °C i Eppendorf centrifuge 5810R (Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland). Supernatanten ble pipetert av og videre fortynnet 10 000 ganger i 0,1 M Na₂HPO₄ × 2 H₂O, pH=7,00 over til 1,5 ml eppendorfrør. Kjent standard som ble benyttet var 9 g/L natriumglutamat løst i RO-vann, som ble fortynnet i 0,1 M Na₂HPO₄ × 2 H₂O, pH=7,00 over til 1,5 ml eppendorfrør før analysering.

Analyse

Prøvene ble analysert på et Shimadzu 9A (Shimadzu, Japan) system i en Nova-Pak C18 60Å kolonne (Waters, USA) med en gradient buffer, MeOH blandet med 0,02 M natriumacetat tilsatt 2 % tetrahydrofuran (THF), pH=5.9. Gradienten av MeOH som ble benyttet var fra 23-100 % på 12 minutter, og hvor den totale analysetiden per prøve var på 20 minutter. Eksitasjons- og emmisjonsbølgelengder som ble benyttet ved analyseringen var henholdsvis λ_{ex} : 330 nm og λ_{em} : 430 nm.

Programmering av HPLC-instrumentene ble utført ved hjelp av Ingeniør Kathinka Qvenild Lystad ved SINTEF Materialer og Kjemi.



Figur 9: HPLC-instrumentene. Til høyre er instrumentet benyttet for analyse av syrer, og til venstre i bildet er instrumentet benyttet til analysering av aminosyrer.

2.5.6 Hemolysetesting av bakteriestammene

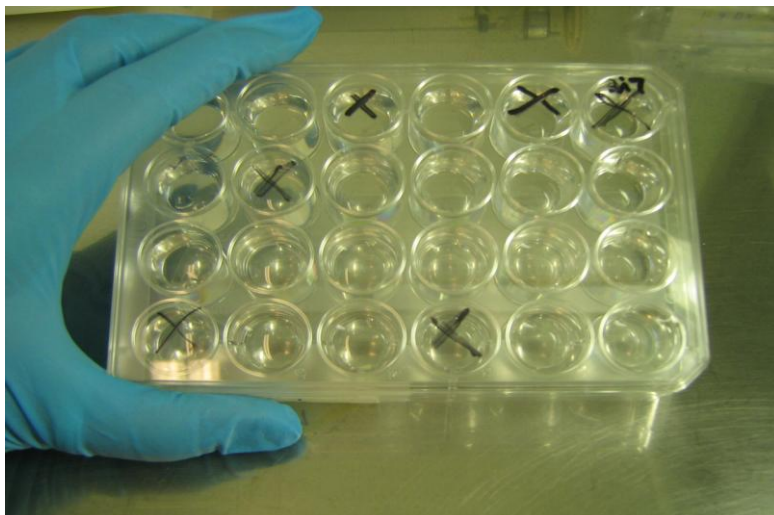
Hemolyse vil si at blodlegemer oppløses, og da særlig røde blodlegemer. Dette resulterer i frigjøring av hemoglobin, som er et oksygenbærende protein. Agarplater til undersøkelse av hemolytiske egenskaper hos bakteriestammene, ble laget av MB 2216 (DIFCO, USA) tilsatt 1,5 % bakteriologisk agar NO.1 (kat.nr. LP0011, Oxoid, UK) og 50 ml/L okseblod. Agarmediet ble tillaget som beskrevet under punkt 2.3.5, frem til og med plassering av mediet i vannbad. Derfra ble sterile 50 ml sentrifugerør (Sarstedt, Tyskland) fylt med sterilt okseblod (mottatt fra St. Olavs Hospital, Trondheim) også temperert i vannbad på 50 °C. Dette for at blodet var oppbevart kjølig og skulle få samme temperatur som mediet det ble tilsatt i. Medium og okseblod ble temperert i vannbadet i ca. 15 minutter. Deretter ble mediet plassert på magnetrører i sterilbenk, og 50 ml okseblod ble målt ut i 50 ml steril pipette og overført til mediet. Etter blanding på magnetrører ble det ferdige mediet overført til petriskåler, ca.20 ml per plate. Når agaren var stivnet og klar til bruk, etter ca. 24 timer, ble ampuller av bakteriestammene tint opp fra frysen, blandet opp på IKA® Vortes, genius 3 bordmikser (Sigma-aldrich Norway AS), og blå podeøse, som tilsvarer 10 µl, ble brukt til utsåing av bakteriestammene på platene. Platene ble deretter inkubert i inkubatorskap Sanyo incubator (Sanyo, USA) ved 17 °C i ca. 3-4 dager, frem til synlige kolonier. Plater til overs ble pakket inn og oppbevart i kjøleskap hvor de var holdbar i ca. 2 uker.

2.6 *In vivo testing av bakteriestammer med torskelarver*

Torskeegg kom fra Havbruksstasjonen i Tromsø da de var ca. 36 døgngader. Døgngader beregnes ut i fra antall døgn siden befruktning multiplisert med temperaturen. Eggene ble desinfisert i 10 minutter i 400 ppm ("parts per million", deler per million) glutaraldehyd og deretter vasket i sterilt 80 % sjøvann. Dette er standard prosedyre for desinfisering av torskeegg ved SINTEF Fiskeri og Havbruk, og ved flere norske oppdrettsanlegg (Skjermo og Vadstein 1999) Desinfiserte egg ble deretter overført til en 250 L egginkubator med vanntilførsel, for oppbevaring. Det tilførte vannet var modnet inntaksvann fra NTNU Sealab sitt anlegg, med vanntilførsel på 3 L/min og en temperatur på ca. 5,5 °C. Modnet vann vil si at vannet er mikrobielt modnet med et biofilter, hvor gunstige bakterier får utvikle seg gjennom konkurranse (Skjermo et al. 1997).

Forkultur av bakteriestammene (punkt 2.1.3) ble satt opp 12-24 timer før forsøksstart, avhengig av erfaring fra tidligere forsøk om hvor raskt stammene vokste. Videre ble det målt OD ved 600 nm på kulturene, og en gitt mengde kultur ble tatt ut og sentrifugert i 10 minutter ved 4 000 rpm og 15 °C i eppendorf centrifuge 5810R (Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland). Deretter ble supernatanten pipettert av og pelletten resuspendert i sterilt 80 % sjøvann til et gitt volum slik at stammene ble fortynnet til 2×10^7 CFU/ml. Disse mengdene for hver kultur og fremgangsmåte for fortynning er gitt i Vedlegg I. For å undersøke at rett fortynning var oppnådd, ble det fra de resuspenderte kulturene sådd ut til kimtall (punkt 2.5.3). Bakteriekulturene ble deretter oppbevart på is for å unngå at kulturene vokste mens eggene ble gjort klar til forsøket.

Eggene var på dette tidspunktet ca. 74 døgngader og ble igjen desinfisert i 10 minutter i 400 ppm glutardialdehyd, og deretter vasket i sterilt 80 % sjøvann for å fjerne overflatebakterier. Normalt er det kun nødvendig med ett trinn desinfisering, men da eggene ble oppbevart i inkubatoren i flere døgn før forsøksstart, ble eggene desinfisert på nytt for at de skulle være tilnærmet sterile til forsøket. Eggene ble deretter overført tilfeldig og individuelt til 24-brønnsplater (NUNCTM, Roskilde, Danmark) som var fylt med 2 ml sterilt 80 % sjøvann per brønn. Etter tilsetning av eggene ble 100 µl kultur av bakteriestammene tilsatt per brønn, slik at man endte opp med en konsentrasjon på ca. 10^6 CFU/ml i hver brønn. Bilde av oppsettet i brønnplatene er gitt i Figur 10.



Figur 10: 24-brønnsplate til dyrkning av torskeelarver. Ett torskeegg ble tilsatt i hver brønn. Brønner med døde torskeelarver ble markert med et svart kryss etter hvert som de døde i forsøksperioden.

Det ble benyttet 3 brønnplater, som tilsvarer 72 egg, per bakteriestamme. I tillegg ble det satt opp 8 kontrollplater som var fylt med usterilt 80 % sjøvann (vannet eggene kom i) slik at eggene ville få en naturlig død til sammenligning med dyrkning sammen med bakteriestammene som ble undersøkt i forsøket. Brønnene i brønnplaten ble fylt opp med sterilt 80 % sjøvann to dager før eggene ble tilsatt, og oppbevart i inkubatorskap ved 8 °C i lukkede poser. Eggene og bakteriene ble tilsatt brønnene 3 dager før forventet klekking, og brønnplatene ble oppbevart i mørke i inkubatorskap ved 8 °C. Bilde av inkubatorskapet er vist i Figur 11.



Figur 11: Inkubatorskap til oppbevaring av brønnplater med torskeelarver. Brønnplatene ble oppbevart i poser forseget med teip.

Torskelarver klekker vanligvis ved 90 døgngader og på dagen som ble satt som forventet dag for klekking var larvene 98 døgngader. På den forventede dagen for klekking var over 50 % av den totale andelen egg klekket, og denne dagen ble dermed satt som dag 0. Larvene ble undersøkt på ettermiddagen denne dagen og dette tidspunktet ble fulgt gjennom hele forsøket for å ha en fast tid på døgnet hvor larvene ble sjekket. Antall døde larver ble talt en gang i døgnet, fra og med dag 1 etter klekking, frem til alle larvene i kontrollplatene var døde. Dag 2 etter klekking ble temperaturen skrudd opp 1 grad for hver dag, frem til 12 °C, hvor temperaturen ble holdt til forsøket endte. Larvene ble ikke fôret underveis i forsøket.

Dette forsøket ble utført med hjelp fra Stine Wiborg Dahle (Master of Science) ved SINTEF Fiskeri og Havbruk.

2.7 Identifisering av stammer ved PCR amplifisering og sekvensering av 16S rDNA

2.7.1 Ekstrahering av DNA

For å identifisere bakteriene ble kulturer av stammene dyrket opp i MB 2216 (DIFCO, USA) tilsatt 5 g/L glukose (Apotekerproduksjon, Norge) og 5 ml kultur ble sentrifugert i 10 minutter ved 4 000 rpm og 20 °C i Eppendorf centrifuge 5810R (Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland). Supernatanten ble videre pipettert av og pelletten ble fryst ned i -20 °C i påvente av DNA-ekstrahering. DNA ble ekstrahert fra bakteriekulturer ved bruk av et kommersielt kit, DNeasy® Blood & Tissue Kit (Kat.nr. 69506, Qiagen GmbH, Hilden, Tyskland). Detaljert prosedyre for ekstraheringen er gitt i Vedlegg J. Mengde DNA i prøvene ble bestemt ved hjelp av NanoDrop® ND-1 000 spektrofotometer (Thermo Scientific, USA) ved 230 nm.

2.7.2 PCR amplifisering

Et fragment av det bakterielle 16S rRNA-genet ble amplifisert fra DNA ekstrahert fra kulturene ved "polymerase chain reaction" (PCR). Dataene fra målingen av mengde DNA med NanoDrop ble benyttet for å fortynne prøvene til 20 ng DNA/µl i sterilfiltrert Milli-Q (renset og deionisert)-vann før amplifisering. Prøvene ble amplifisert med primerne 518R og 8F-GC-M13R som amplifiserer en ~500 bp region som inkluderer V1-V3 (Tabell 6).

Tabell 6: Primersett benyttet for amplifisering ved PCR av prøver til sekvensering. Primere som ble benyttet var 8F-GC-M13R og 518R som amplifiserer V1-V3-regionen i 16S rRNA-genet.

Primer	Nukleotidsekvens
518R	5'-attaccgcgctgctgg-3'
8F-GC-M13R	5'- caggaaacagctatgacCGCCCGCCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGaga gtttgatcctggctcag-3'
M13R*	5'-caggaaacagctatgac-3'

*Denne primeren ble benyttet ved sekvensering.

PCR-reaksjonen ble kjørt med en mastermix av 2 mM MgCl₂, 0,2 μM av hver dNTP, 0,3 μM av hver primer, Taq polymerase (vWR, USA) og reaksjonsbuffer (Qiagen, Tyskland). Til en 25 μl PCR-reaksjon ble det tilsatt 20 ng/μl bakterielt DNA som templat. En UnoCycler (VWR, UK) ble benyttet til amplifiseringen, og programmet som ble benyttet er gitt i Tabell 7.

Tabell 7: PCR-program benyttet til amplifisering.

Steg	Temperatur (°C)	Tid	Forløp
1	95	3 min	Denaturering
2*	95	30 sek	Denaturering
3*	50	30 sek	Primer binding ("annealing")
4*	72	60 sek	DNA syntese ("elongation")
5	72	30 min	DNA syntese ("elongation")
6	10	∞	Oppbevaring

*Steg 2 til 4 ble gjentatt 35 sykluser

2.7.3 Agarosegelelektroforese

For å undersøke kvaliteten til PCR-produktene, ble prøvene undersøkt ved agarose gelelektroforese. Gelen ble støpt av agarose (1 %) og 1 x TAE buffer (2 M Tris-HCl, 1 M

Acetic acid, 50 mM EDTA, dH₂O) tilsatt 5 µl/ 100 ml GelRedTM Nucleic Acid Gel Stain (kat.nr 41003, Biotium, Hayward, CA). 1 x TAE ble benyttet som elektroforesebuffer. 5 µl PCR-produkt ble blandet med 1 µl Gel Pilot 6x loading dye (Fermentas, USA) og applisert i brønnene på gelen. GeneRulerTM 1 Kb DNA Ladder (Fermentas, USA) ble benyttet som størrelsesmarkør. Gelen ble kjørt ved 140 V i 40-50 minutter, og visualisert i en G:BOX (SynGene, UK) ved bruk av programmet GeneSnap. Prøver med svake bånd i gelen etter visualisering ble amplifisert på nytt med flere sykluser.

2.8 Karakterisering av mikrobefunn med PCR/DGGE

2.8.1 Amplifisering av bakteriekulturer med PCR

DNA ble ekstrahert fra bakteriekulturer som beskrevet under punkt 2.7.1, men et volum på 3 ml per kultur ble her benyttet. Etter ekstrahering av DNA ble amplifisering med PCR utført som beskrevet under punkt 2.7.2, men med primer som amplifiserer V3-regionen i 16S rRNA-genet (Tabell 8).

Tabell 8: Primersett benyttet til amplifisering av V3-regionen av 16S rRNA-genet.

Primer	Nukleotidsekvens
338F-GC*	5'- CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGactcctacgggaggcagcag- 3'
518R	5'-attaccgaggctgctgg-3'

*GC-"klamp" er gitt med store bokstaver

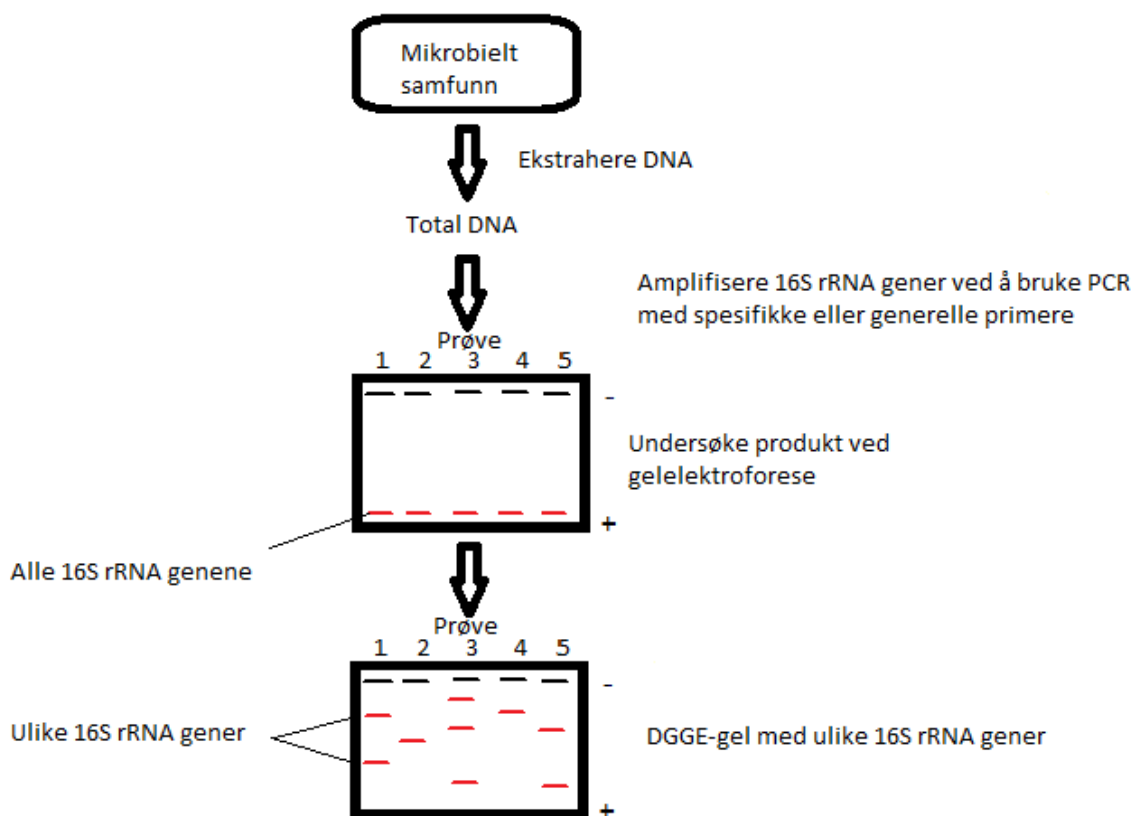
Mastermix som ble benyttet for PCR-reaksjonen ble beskrevet i punkt 2.7.2 og program ved amplifisering ble beskrevet i Tabell 7, men antall sykluser som ble repetert for steg 2-4 var her 30. Etter amplifisering ved PCR ble produktene undersøkt ved agarosegelelektroforese (punkt 2.7.3) for å sjekke at amplifiseringen var vellykket. PCR-produktene fra bakteriekulturene ble deretter benyttet i denaturerende gradient gelelektroforese (DGGE).

2.8.2 Analysering med DGGE

Denaturerende gradient gel elektroforese (DGGE) er en teknikk som kan benyttes for å analysere genetisk diversitet innen mikrobielle samfunn. 16S rRNA - genet inneholder mange konserverte regioner, og i tillegg variable regioner. Fordi deler av genet er så konserverte er det mulig å konstruere universelle bakterielle PCR-primere, og fordi sekvensen er variabel i andre områder er det nyttig innen fylogenetiske analyser. DGGE-teknikken baseres på at PCR-

amplifiserte 16S rDNA-fragmenter av omtrent samme lengde men med ulike sekvenser, kan separeres i en polyakrylamidgel som inneholder gradient av forbindelser som denaturerer DNA (Muyzer et al. 1993).

I DNA er GC-paring, som involverer 3 hydrogenbindinger per basepar, mer stabil enn AT-paring, som involverer 2 hydrogenbindinger per basepar. DNA med høyt innhold av GC vil dermed være vanskeligere å denaturere. Når DNA-fragmenter med ulike sekvenser migrerer gjennom en polyakrylamidgel vil innholdet av GC avgjøre hvor høy konsentrasjon av denaturerende forbindelser som trengs for å denaturere fragmentet. Ved tilstrekkelig konsentrasjon i gelen til delvis denaturering, ved at svake regioner i gelen denaturerer, vil bevegelsen til fragmentet stanse. Ulike sekvenser, fra ulike bakterier, vil denaturere ved ulike konsentrasjoner og vil resultere i et mønster av bånd i gelen. Endringer i sekvenser innen enkelte spesifikke domener endrer fragmentets egenskap for smelting og derfor vil ulike PCR amplifiserte produkter stoppe migreringen på ulike posisjoner i den denaturerende gradienten (Muyzer et al. 1993). Bruken av GC-rike sekvenser eller GC-”klamper” i en av PCR-primere, som består av 40-45 baser av GC-baser, hindrer fullstendig smelting av PCR-produktet. GC-klossen er normalt festet til 5'-enden av forward primeren (Maier et al. 2009). Stegene for analyseringen er gitt i Figur 12.



Figur 12: Steg i analyse av DNA fra et mikrobielt samfunn ved hjelp av Denaturerende gradient gelelektroforese (DGGE). Primer med GC-klamper som benyttes til amplifisering av prøvene hindrer fullstendig denaturering av DNA-fragmentene. Gjentegnet fra Brock Biology of Microorganisms (Madigan et al. 2009).

Gelen ble støpt med en denaturerende gradient på 35-55 % av ferdiglagede akrylamid-løsninger med konsentrasjoner på 0 og 80 %. Løsningene med 35 og 55 % denaturerende akrylamidløsning ble laget i separate rør, hver med et volum på 25 ml. 80 % løsningen ble sterilfiltrert. Det ble også laget et rør med 0 % denaturerende akrylamidløsning. Rett før støping av gelen ble det tilsatt tetrametyletylendiamin (TEMED) og APS (10 % Ammonium persulfat) for polymerisering. Gradienten ble støpt ved hjelp av en gradientblander. Løsningen med 0 % denaturering ble tilsatt på toppen av gelen når de to andre løsningene var tilsatt. Den ferdigstøpte gelen får da den høyeste denaturerende % nederst på gelen, og den minst denaturerende % øverst på gelen. Gelen ble satt til polymerisering i minimum 2 timer. Detaljert protokoll med fremgangsmåte og tillaging av løsninger er gitt i Vedlegg K.

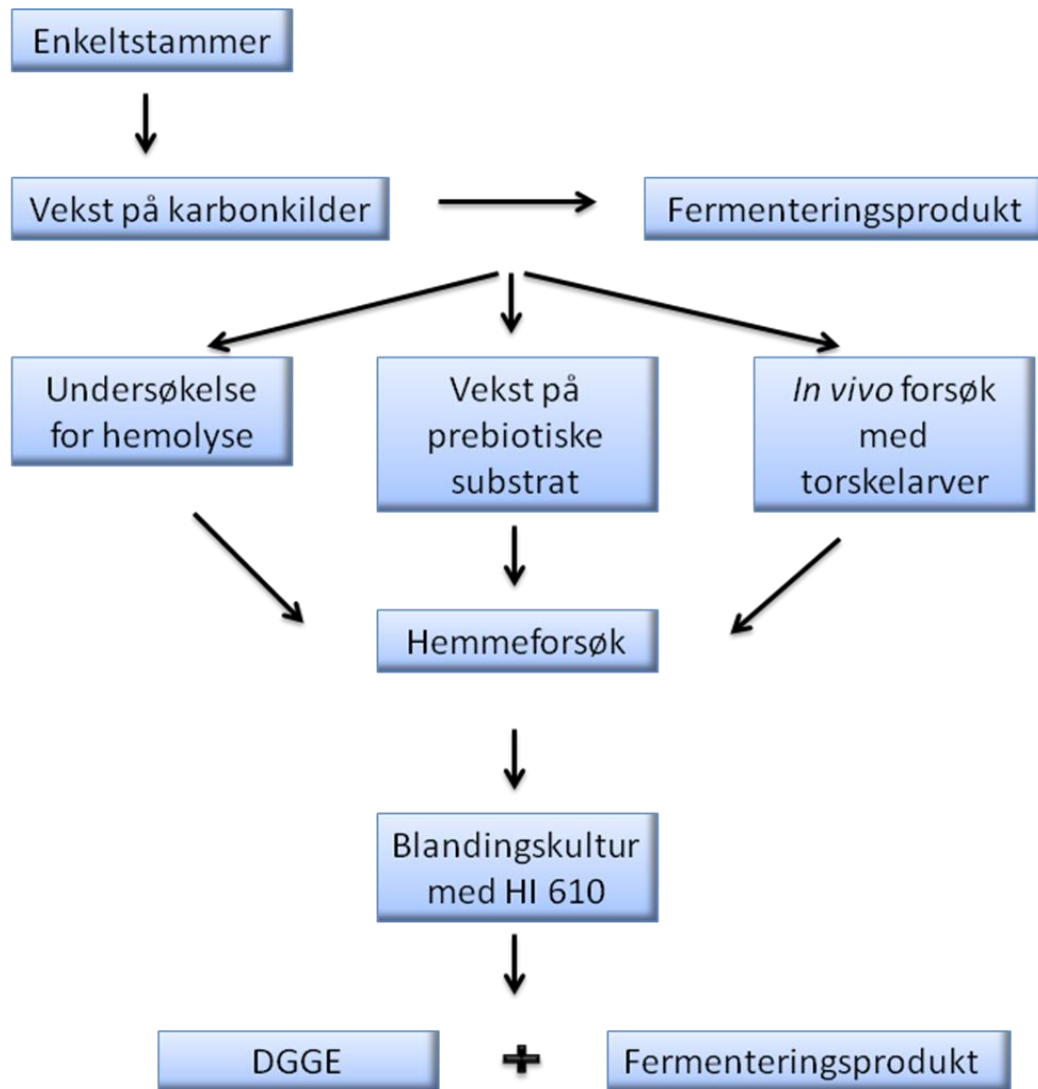
Etter polymerisering av gelen ble 2 μ l PCR-produkt og 2 μ l Gel Pilot 6x loading dye (Fermentas, USA) blandet og tilført brønnene i gelen. Gelene ble kjørt i 0,5 x TAE buffer ved 60 °C og 100 V i 17-18 timer. Farging av gelen ble utført med en fargeløsning bestående av 10 ml MilliQ-vann, 3 μ l SYBR Gold (Invitrogen Norge AS) og 600 μ l 50 x TAE buffer i ca.

1-2 timer. Gelen ble videre visualisert ved hjelp av UV-lys i en G:BOX (SynGene, UK) ved bruk av programmet GeneSnap.

3 Resultater

3.1 Flytskjema

Flytskjema for utførelse av forsøk i denne oppgaven er gitt i Figur 13. I oppgaven ble det utført en seleksjon av stammer som var interessant til videre forsøk, og figuren gir en oversikt over hvilke forsøk som la grunnlag for valgene av stammer.



Figur 13: Flytskjema for forsøkene utført i oppgaven. Enkeltstammer ble undersøkt for vekst på karbonkilder og produksjon av fermenteringsprodukt. Videre ble det utført en seleksjonsprosess for stammer som ble undersøkt for hemolyse, vekst på prebiotiske substrat og *in vivo* forsøk med torskellarver. Fra de forsøkene ble det vurdert stammer til hemmeforsøk med patogene stammer. Enkeltstammer som hadde best evne til å hemme patogene, ble undersøkt i blandingskultur med analysering ved bruk av DGGE og produksjon av fermenteringsprodukt.

3.2 Testing for renhet av stammene

Bakteriestammene fra SINTEF sin samling hadde aldri blitt undersøkt for renhet før oppgaven startet, og underveis ble derfor stammene undersøkt ved dyrkning på to ulike måter; 1) direkte utsåing fra ampulle til MB-agarplater og 2) utsåing på MB-agarplater etter dyrkning i flytende MB 2216 tilsatt glukose (5 g/L).

En del av stammene viste seg å være tydelig forurenset ved utsåing rett fra ampullen til agarplater, og noen stammer viste seg også å være ren ved utsåing rett fra ampullene, men tydelig forurenset etter dyrkning i flytende MB medium. Dette kunne tyde på at det var en minimal forurensing i ampullene som ikke slo ut ved utsåing direkte fra ampullene. Derimot når forurensingen fikk vokse opp i det flytende mediet over tid, ble den stor nok til å påvises på agarplatene. På grunnlag av dette ble alle stammene sådd ut på MB-agarplater og dyrket opp i 17 °C. Da det ble observert tydelige kolonier på platene, ble alle de ulike typer kolonier undersøkt i mikroskop. Ut ifra beskrivelser av de opprinnelige stammene i Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Bergey et al. 2001), ble det utført en vurdering av hvilke kolonier som stemte overens med beskrivelsene, og ble dermed antatt å være korrekt stamme.

En del av stammene som vokste opp, og som mest sannsynlig var forurensing, ble også tatt med videre i oppgaven da de mest sannsynlig var marine bakterier. Dette førte til at stammer med forurensing fikk endelse a og b bak ID-nummeret for å skille bakterietypene. A-endelse ble benyttet på stammer som mest sannsynlig var den opprinnelige stammen, og b-endelse ble benyttet på stammer som mest sannsynlig var forurensing. Videre ble det laget nye ampuller av alle stammene (punkt 2.1.2).

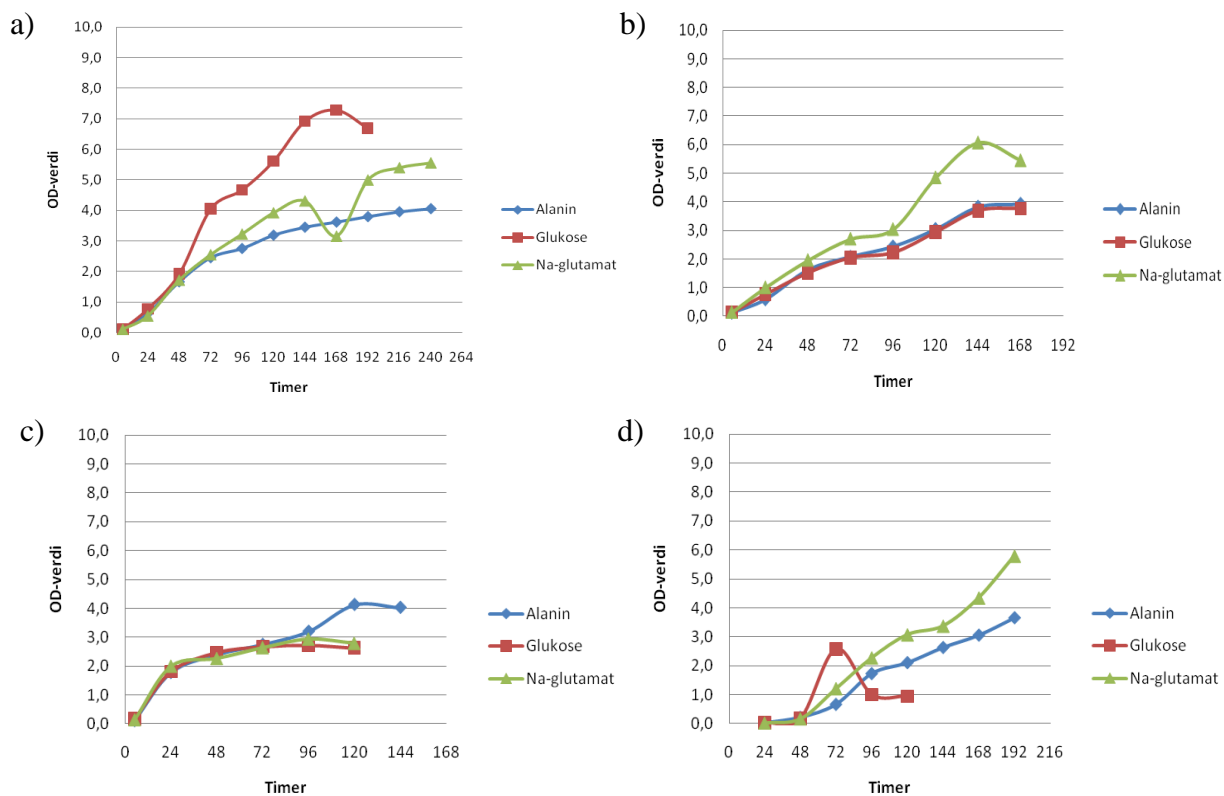
Av de 16 isolatene fra SINTEF sin samling som ble valgt ut til videre karakterisering i denne oppgaven, var noen av stammene vanskelig å dyrke opp igjen etter oppbevaring i -80 °C. Dette gjaldt *Photobacterium* 1-8 D12, 1-2 D8 og 1-8 B9, og disse 3 stammene ble dermed ekskludert fra oppgaven. Da disse ble ekskludert fra oppgaven og forurensinger ble inkludert, resulterte dette i at totalt 17 stammer fra samlingen til SINTEF ble karakterisert videre i denne oppgaven (se Tabell 9).

Tabell 9: Oversikt over de 17 stammene til videre karakterisering i denne oppgaven. Stammene er gitt med navn og ID nummer. Stammer med endelser a og b referer til stammer som ble funnet å være forurenset. a-endelse referer til den stammen som mest sannsynlig er den opprinnelige, og b-endelse referer til stammen som mest sannsynlig er forurensing. Stammene var av slektene *Vibrio*, *Photobacterium* (*Photob.*), *Microbacterium* (*Microb.*), *Shewanella*, *Pseudomonas*, *Marinomonas* og *Flavobacterium* (*Flavob.*). Stammer som mest sannsynlig var forurenset ble kun referert til med ID-nummer.

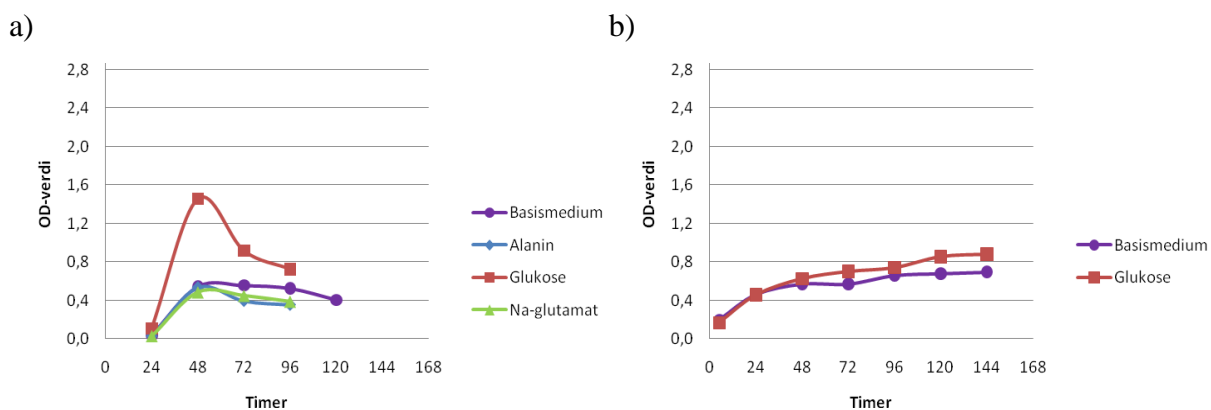
<i>Vibrio</i>	<i>Photob.</i>	<i>Microb.</i>	<i>Shewanella</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Marinomonas</i>	<i>Flavob.</i>	Stamme
1-2 D12	1-12 D8	3-5 G10	1-2 D6	1, 3-7 C4 a	3-14 D2 a	3-5 F9 a	3-14 D2 b
1-1 D8			1-8 C8 a	2, 3-14 E9 a	3-14 F8 a		3-14 D2 b
				3, 3-1 C 11			3-5 F9 b
				4, 3-9 B8 a			3-14 F8 b

3.3 Vekst med glukose og aminosyrer som karbonkilde

For å påvise hvilke karbonkilder stammene vokste best på, ble bakteriene karakterisert med hensyn på evne til aerob og anaerob vekst i sentrifugerør og Hungate-rør med redusert MB tilsatt ulike karbonkilder. Av vekstkurvene for aerobe vilkår er 4 diagrammer tatt med som eksempel, og for anaerobe vilkår er 2 av diagrammene tatt med, henholdsvis Figur 14 og Figur 15.



Figur 14: Eksempel på vekstkurver for a) Stamme 3-5 F9 b) *Pseudomonas* 1, 3-7 C4 a, c) *Shewanella* 1-8 C8 a og d) *Vibrio* 1-1 D8 under aerobe vilkår. Konsentrasjon for karbonkilder var 9 g/L. og OD ble målt i kyvette. Da det var stor variasjon i hvor lenge kulturene vokste, er x-aksen ulik for de 4 eksemplene.



Figur 15: Eksempel på vekstkurver for a) *Vibrio* 1-2 D12 og b) *Shewanella* 1-2 D6 under anaerobe vilkår. Konsentrasjon for karbonkilder var på 9 g/L og OD ble målt i kyvette. Diagrammet for *Shewanella* 1-2 D6 er et eksempel på anaerob dyrkning kun med glukose som karbonkilde, da veksten på aminosyrer generelt var dårlig under anaerobe vilkår.

Vekstforsøket viste at alle stammene kunne utnytte både glukose og aminosyrer under aerobe forhold. Det viste seg allikevel å være en forskjell i hvilken karbonkilde som ga den høyeste OD-verdien. Eksempel på et resultat hvor alanin og glukose ga forholdsvis lik celletetthet

(basert på OD), og natriumglutamat ga størst celletetthet, ble oppnådd på blant annet *Vibrio* 1-2 D12, hvor alanin=3,600, glukose=3,075 og natriumglutamat=5,550. Slik forskjell ble også påvist for *Photobacterium* 1-12 D8, *Vibrio* 1-1 D8, *Shewanella* 1-2 D6, *Pseudomonas* 1, 3-7 C4 a, *Marinomonas* 3-14 D2 a, *Marinomonas* 3-14 F8 a og *Flavobacterium* 3-5 F9 a. Motsatt, hvor alanin og glukose var relativ lik og natriumglutamat ga dårligst tetthet, ble oppnådd på *Pseudomonas* 2, 3-14 E9 a, hvor alanin=3,120, glukose=3,765 og natriumglutamat=1,990. Et eksempel hvor begge aminosyrene ga relativ lik celletetthet og glukose dårligst, ble oppnådd på *Pseudomonas* 4, 3-9 B8 a, hvor alanin= 4,375, natriumglutamat=4,780 og glukose= 2,975. Slik forskjell ble også påvist for *Microbacterium* 3-5 G10. Motsatt, hvor aminosyrene ga relativ lik celletetthet og glukose ga best, ble oppnådd på stamme 3-14 F8 b, hvor alanin=3,600, natriumglutamat=2,105 og glukose=7,050. Slik forskjell ble også påvist for *Pseudomonas* 3, 3-1 C11, stamme 3-14 E9 b, stamme 3-14 D2 b og stamme 3-5 F9 b. Eneste stamme hvor alanin ga høyest tetthet og hvor glukose og natriumglutamt var relativ lik, ble vist på *Shewanella* 1-8 C8 a. Det viste seg dermed at for stammene som fikk høyest celletetthet på aminosyrer, var natriumglutamat den karbonkilden som ga størst celletetthet for de fleste stammene, med unntak av *Shewanella* 1-8 C8 a som fikk størst celletetthet på alanin.

Under anaerobe forhold var også basismediet (redusert MB) uten tilsetning inkludert. Et eksempel på stammer hvor basismediet og aminosyrene ga relativ dårlig celletetthet og glukose ga god tetthet, ble oppnådd på *Vibrio* 1-2 D12 hvor basismediet=0,555, alanin=0,535, natriumglutamat=0,485 og glukose=1,455. Slik forskjell ble også påvist for *Microbacterium* 3-5 G10 og *Photobacterium* 1-12 D8. Et eksempel hvor alle karbonkildene ga relativt dårlig celletetthet og basismediet ga best tetthet, ble oppnådd på *Vibrio* 1-1 D8, hvor basismediet=0,855, alanin=0,324, glukose=0,377 og natriumglutamat=0,535. Begge *Shewanella*-stammene ble kun dyrket på basismediet uten tilsetning og glukose som karbonkilde. For *Shewanella* 1-8 C8 a ble celletettheten relativ lik på begge mediene, med basismediet=1,040 og glukose=0,995. *Shewanella* 1-2 D6 oppnådde best tetthet på mediet tilsatt glukose, hvor basismediet=0,680 og glukose=0,880. Resultatene for anaerob dyrkning var generelt vanskelig å tolke da stammer hvor glukose ga best celletetthet ble oppnådd på dag 1 etter innokulering. Dette var med unntak av *Shewanella* 1-2 D6 som oppnådde best celletetthet på glukose 6 dager etter innokulering.

Stammer som hadde best evne til å utnytte glukose som karbonkilde under aerobe vilkår, er gitt i Tabell 10 og stammer som hadde best evne til å utnytte aminosyrer under aerobe vilkår,

er gitt i Tabell 11. Tabell 11 gir også en oversikt over hvilken karbonkilde stammene hadde best evne til å utnytte under anaerobe forhold.

Av stammene som hadde best evne til å utnytte glukose som karbonkilde under aerobe forhold, var det stamme 3-14 E9 b og stamme 3-14 D2 b som hadde omsatt all glukosen som var tilsatt mediet. Det var også disse to stammene som hadde lavest pH i mediet ved avslutning av forsøket. Stamme 3-5 F9 b hadde omsatt nesten all glukosen i mediet, 7,9 g av totalt 9 g, og hadde også en av de laveste pH-verdiene i mediet ved avslutning av forsøket. Lav pH i mediet skyldes produksjon av syre, og resultatene for syreproduksjon diskuteres senere i kapitlet. Stammen som hadde omsatt minst glukose var *Pseudomonas* 2, 3-14 E9 a, og var den stammen med høyest pH i mediet tilsatt glukose ved avslutning av forsøket, og har dermed ikke produsert syre.

Ved analysing av standard for natriumglutamat ble det problemer, og derfor kunne ikke mengde omsatt natriumglutamat bestemmes. Det er da bare gitt en vurdering av hvor mye/lite stammene omsatte (Tabell 10 og Tabell 11).

Tabell 10: Stammer som hadde best evne til å utnytte glukose som karbonkilde ved aerob dyrkning. Tabellen viser mengde glukose som ble omsatt og pH ved avslutning av vekstforsøket i medium tilsatt glukose. Ingen av disse stammene ble dyrket anaerobt. Mengde omsatt natriumglutamat er angitt med ↑ for stammer som omsatte mest, og ↓ for stammer som omsatte minst. Detaljert mengde omsatt natriumglutamat kunne ikke påvises da det ble problemer ved analysering av standarden. Resultater med hensyn på OD for alle substratene er gitt i Vedlegg B og eksempler på vekstkurver er gitt i Vedlegg D. Beregning av mengde omsatt glukose er gitt i Vedlegg F. Stammer som ble valgt ut til videre karakterisering er angitt med grå markering i tabellen.

Stamme	Omsatt glukose (g) av totalt 9 g/L	Omsatt na-glu av totalt 9 g/L	Slutt-pH i medium med glukose
	<i>Aerob</i>	<i>Aerob</i>	<i>Aerob</i>
<i>Pseudomonas</i> 3, 3-1 C11	5,5	↑	6,8
<i>Pseudomonas</i> 2, 3-14 E9 a	2,9	↓	6,9
Stamme 3-14 E9 b	9,0	↑	6,2
Stamme 3-14 D2 b	9,0	↑	5,9
Stamme 3-14 F8 b	6,4	↓	6,7
Stamme 3-5 F9 b	7,9	↑	6,3

Av stammene som hadde best evne til å utnytte aminosyrer som karbonkilde under aerobe vilkår, var det ingen antydning til sammenheng mellom omsatt glukose og pH i mediet tilsatt glukose ved avslutning av forsøket, slik som det så ut til å være hos stammene som foretrakk glukose som karbonkilde. Et unntak for dette var begge *Shewanella*-stammene som omsatte minst glukose og hadde også høyest pH i mediet tilsatt glukose ved avslutning av forsøket. Stammer som omsatte mest glukose hadde derimot ikke lavest pH i mediet tilsatt glukose, og har dermed ikke produsert syre.

Tabell 11: Stammer som hadde best evne til å utnytte aminosyrer som karbonkilde ved aerob dyrkning. Tabellen viser mengde glukose som ble omsatt og pH ved avslutning av vekstforsøket i medium tilsatt glukose. Mengde omsatt natriumglutamat er angitt med ↑ for stammer som omsatte mest, og ↓ for stammer som omsatte minst. Detaljert mengde omsatt natriumglutamat kunne ikke påvises da det ble problemer ved analysering av standarden. Resultater med hensyn på OD for alle substratene er gitt i Vedlegg B og C, og eksempler på vekstkurver er gitt i Vedlegg D. Beregning av mengde omsatt glukose er gitt i Vedlegg F. Stammer som ble valgt ut til videre karakterisering etter dette forsøket er angitt med grå markering.

Stamme	Omsatt glukose (g) av totalt 9 g/L		Omsatt na-glu av totalt 9 g/L		Substrat*		Slutt-pH i medium med glukose	
	Aerob	Anaerob	Aerob	Anaerob	Aerob	Anaerob	Aerob	Anaerob
<i>Microbacterium</i> 3-5 G10	5,6	3,1	↑	↓	Na-glu.	Glukose	5,5	5,3
<i>Vibrio</i> 1-1 D8	6,1	0	↑	↓	Na-glu.	Basis.	5,7	7,3
<i>Vibrio</i> 1-2 D12	4,9	7,6	↑	↓	Na-glu.	Glukose	5,3	5,4
<i>Photobacterium</i> 1-12 D8	5,3	4,5	↑	↓	Na-glu.	Glukose	5,4	5,4
<i>Pseudomonas</i> 1, 3-7 C4 a	4,3	—	↓	—	Na-glu.	—	6,7	—
<i>Pseudomonas</i> 4, 3-9 B8 a	4,0	—	↑	—	Na-glu.	—	6,7	—
<i>Marinomonas</i> 3-14 D2 a	6,8	—	↑	—	Na-glu.	—	6,6	—
<i>Marinomonas</i> 3-14 F8 a	7,3	—	↑	—	Na-glu.	—	6,6	—
<i>Flavobacterium</i> 3-5 F9 a	4,9	—	↑	—	Na-glu.	—	6,7	—
<i>Shewanella</i> 1-8 C8 a	2,6	0,3	↓	—	Alanin	Basis.	7,1	7,3
<i>Shewanella</i> 1-2 D6	0,3	0,2	↓	—	Na-glu.	Glukose	7,5	7,5

*Aminosyre som ga størst celletetthet ved aerob dyrkning.

Ved avslutning av vekstforsøkene ble pH målt i alle de ulike mediene, både fra aerobe og anaerobe vilkår. I de fleste medier holdt pH seg noenlunde stabil rundt 7,5 (Vedlegg B og C), med unntak av medium tilsatt glukose hvor nedgangen i pH var størst. Dette gjaldt både under aerobe og anaerobe forhold.

Begge *Shewanella* stammene; 1-2 D6 og 1-8 C8 a, holdt pH rundt 7,5 under både aerobe og anaerobe forhold på glukose. Disse stammene ble vist å ha produsert syre i mediene med

glukose under anaerobe forhold, men ikke under aerobe forhold. Allikevel var mengden syre som ble produsert svært liten, og har dermed ikke påvirket pH i noen stor grad (se Figur N-1 i Vedlegg N). *Vibrio* 1-1 D8 holdt pH rundt 7,5 på mediet tilsatt glukose under anaerobe forhold, og ble ikke vist å ha produsert syre i mediene med glukose som tilsetning under disse forholdene. Bakteriestammene med påviste produkter fra aerob dyrkning er gitt i Tabell 12 og fermenteringsprodukt fra anaerob dyrkning er gitt i Tabell 13.

Tabell 12: Produkter produsert av stammene ved aerob dyrkning på glukose og aminosyrer som karbonkilde. Produkt med retensjonstid $12,77 \pm 1$ er ikke identifisert.

Stamme	Substrat	Produkt
<i>Microbacterium</i> 3-5 G10	Alanin	Acetat, 12,84
	Glukose	Acetat, 12,78
<i>Vibrio</i> 1-1 D8	Alanin	Acetat
	Glukose	Acetat, 12,78
<i>Photobacterium</i> 1-12 D8	Glukose	12,77, Acetat
<i>Vibrio</i> 1-2 D12	Alanin	Acetat
	Glukose	12,78, Maursyre, Acetat
Stamme 3-5 F9 b	Alanin	(12,90)*
	Glukose	12,78
<i>Marinomonas</i> 3-14 F8 a	Glukose	12,77
<i>Marinomonas</i> 3-14 D2 a	Glukose	12,78, Acetat
Stamme 3-14 D2 b	Alanin	12,76, Acetat
	Glukose	Acetat
Stamme 3-4 E9 b	Alanin	Maursyre, 13,01**
	Glukose	Acetat, 12,99**
<i>Shewanella</i> 1-8 C8 a	Alanin	Acetat
<i>Shewanella</i> 1-2 D6	Alanin	Acetat
	Na-glutamat	Acetat
Stamme 3-14 F8 b	Glukose	12,76

*Produktet avviker for mye fra retensjonstid $12,77 \pm 1$, og kan derfor være et annet produkt.

**Produktet ble påvist ved en senere analysering ved HPLC enn de andre påviste produktene, og kan dermed være retensjonstid $12,77 \pm 1$ påvist ved forrige kjøring.

Tabell 13: Fermenteringsprodukt produsert av stammene ved anaerob dyrkning på glukose og aminosyrer som karbonkilde. Produkt med retensjonstid $12,77 \pm 1$ er ikke identifisert.

Stamme	Substrat	Fermenteringsprodukt
<i>Microbacterium</i> 3-5 G10	Glukose	Maursyre, Acetat, EtOH
	Na-glutamat	Acetat
<i>Vibrio</i> 1-1 D8	Alanin	Acetat
	Na-glutamat	Acetat
<i>Photobacterium</i> 1-12 D8	Glukose	12,77, Maursyre, Acetat
<i>Vibrio</i> 1-2 D12	Alanin	Acetat
	Glukose	12,77, Maursyre, Acetat
	Na-glutamat	Acetat
<i>Shewanella</i> 1-8 C8 a*	Basismedium	Acetat
	Glukose	Acetat
<i>Shewanella</i> 1-2 D6*	Basismedium	Acetat
	Glukose	Acetat

*Produksjonen av syre var svært liten (se Figur N-1, Vedlegg N).

Basert på resultatene ovenfor ble 11 stammer valgt ut som interessante for videre forsøk (angitt med grå markering i Tabell 10 og Tabell 11). Stammene ble valgt slik at de ga en samling av bakterier med ulike egenskaper. Alle stammer med påviste fermenteringsprodukt, ble inkludert da fermentativ metabolisme er viktig for bruk til torskelarver (punkt 1.3). Egenskaper som ble tatt med i vurderingen var mengde omsatt glukose i medium tilsatt glukose, både under aerobe og anaerobe forhold, karbonkilde som var lettest å utnytte, pH i medium tilsatt glukose ved avslutning av vekstforsøk, både aerobt og anaerobt, og påviste fermenteringsprodukt.

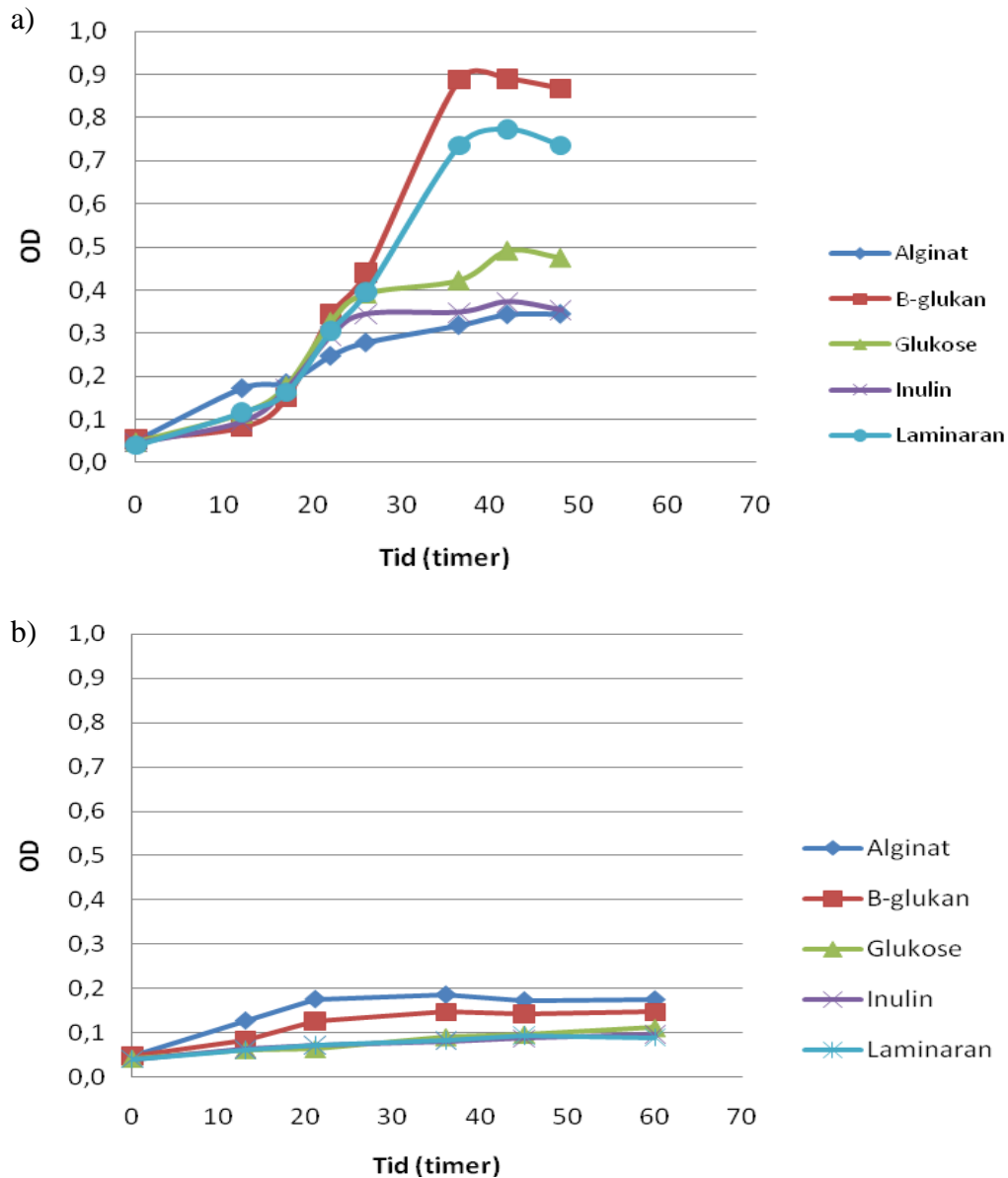
Enkelte stammer var fortsatt i vekst da forsøket ble avsluttet fordi det gikk tomt for medium etter prøveuttakene. Dette gjaldt under aerobe forhold for *Pseudomonas* 3, 3-1 C11 dyrket med glukose, *Vibrio* 1-2 D12, *Microbacterium* 3-5 G10, *Photobacterium* 1-12 D8 og *Vibrio* 1-1 D8 dyrket på alanin og natriumglutamat. For anaerobe forhold gjaldt dette *Microbacterium* 3-5 G10 dyrket med alanin og natriumglutamat og *Vibrio* 1-1 D8 dyrket med basismediet uten tilsetning, glukose og natriumglutamat.

3.4 Vekst på prebiotiske substrater

For å undersøke vekst på potensielle prebiotiske substrater, ble de 11 utvalgte stammene dyrket i brønnplate på ulike substrater. Substratene som ble undersøkt var alginat, β -glukan, inulin og laminaran (6,5 g/L). Glukose ble også inkludert med samme konsentrasjon for å undersøke om de prebiotiske substratene ble foretrukket fremfor karbonkilden. De 4 potensielt prebiotiske stammene var ikke undersøkt på prebiotiske substrat, og ble derfor inkludert i dette forsøket. De to patogene stammene, *V. anguillarum* HI 610 og *Marinomonas sp.* ble også inkludert for å kunne ekskludere substrat som fremmet veksten av disse.

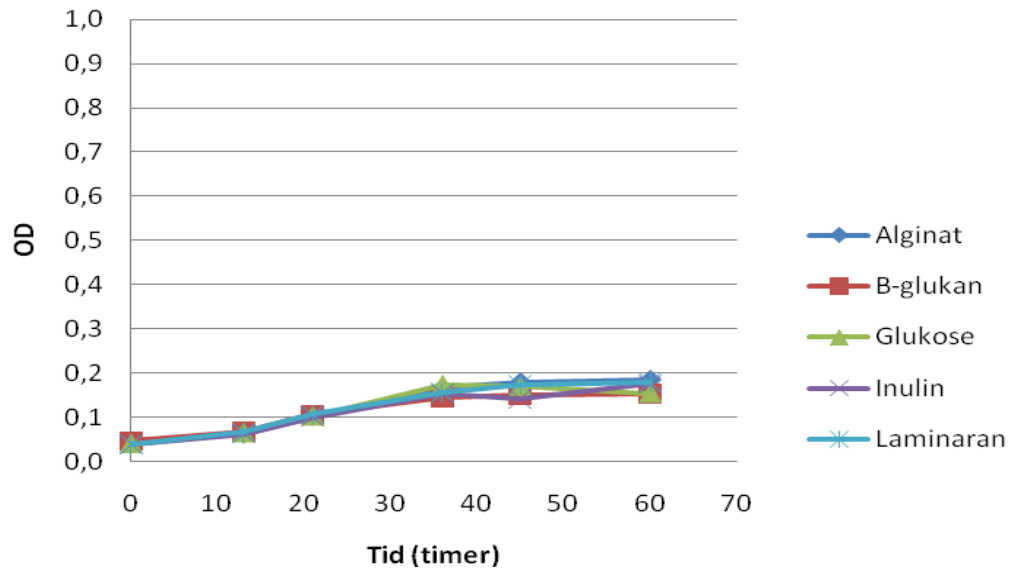
I dette forsøket ble det ikke vekst i forkulturen på *Vibrio* 1-1 D8 og 1-2 D12, og stammene kunne derfor ikke inkluderes i dette forsøket. Ulike medium ble derfor testet ut for de to stammene og til slutt ble det oppnådd vekst for 1-2 D12 i Brain Heart Infusion (CM1135, Oxoid, UK) tilsatt 0,5 g/L vitaminkonsentrat og 10 ml/L spormineraler som tilhørte redusert MB. *Vibrio* 1-1 D8 oppnådde ikke vekst på noen av mediene som ble undersøkt for denne stammen.

Det var kun to stammer som vokste på de prebiotiske substratene. Dette gjaldt *Pseudoalteromonas* RA 7-14, fra de 4 potensielle stammene og *Marinomonas* 3-14 D2 a fra isolatene til SINTEF (Figur 16). RA 7-14 vokste bedre på β -glukan og laminaran enn glukose, og hadde også god vekst på alginat og inulin. For 3-14 D2 a ble best vekst oppnådd på alginat og β -glukan fremfor glukose, men hadde generelt en lav vekst på alle tilsetningene. OD ble i dette forsøket målt i brønnplate, noe som ga lavere OD enn måling i kyvette (se punkt 2.5.2).

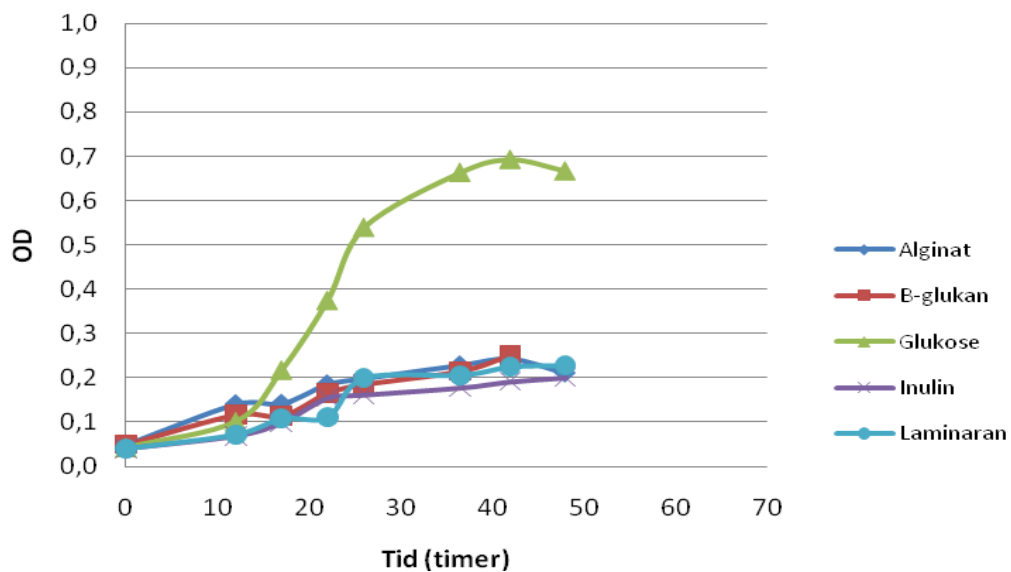


Figur 16: Vekst på ulike prebiotiske substrat med konsentrasjon 6,5 g/L. OD ble målt i brønnplate. **a)** Vekst for *Pseudoalteromonas* RA 7-14, **b)** vekst for *Marinomonas* 3-14 D2 a.

Resten av stammene hadde best evne til å utnytte glukose fremfor de prebiotiske substratene, eller hadde dårlig vekst på alle substratene. Vekstkurven til *Shewanella* 1-2 D6, som er gitt i Figur 17, er et eksempel på hvordan vekstforløpet så ut for stammer med dårlig vekst. Dette gjaldt følgende stammer; *Shewanella* 1-8 C8 a, stamme 3-5 F9 b og *Photobacterium* 1-12 D8. Stammer som hadde best evne til å utnytte glukose hadde vekstkurver som kunne sammenlignes med *Vibrio gallicus* RD 5-30 (Figur 18). Dette gjaldt følgende stammer; *V. anguillarum* HI 610, *Marinomonas* sp., *Microbacterium* ID 3-10, *Ruegeria* RA 4-1, stamme 3-14 D2 b, *Pseudomonas* 1, 3-7 C4 a, stamme 3-14 E9 b og *Microbacterium* 3-5 G10.



Figur 17: Vekst for *Shewanella* 1-2 D6 på ulike prebiotiske substrat i brønnplate, substratkonsentrasjon 6,5 g/L. Diagrammet er et eksempel på hvordan vekstforløpet så ut på følgende stammer; *Shewanella* 1-8 C8 a, Stamme 3-5 F9 b og *Photobacterium* 1-12 D8. OD ble målt i brønnplate.



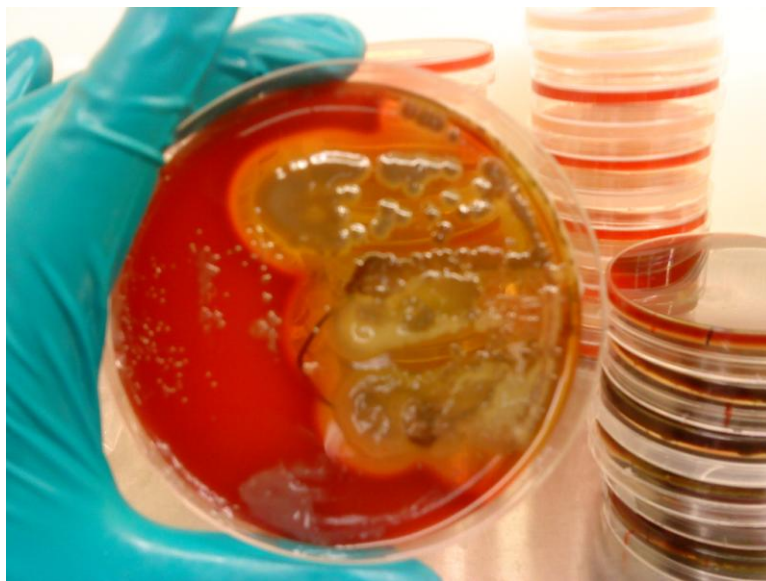
Figur 18: Vekst for *Vibrio gallicus* RD 5-30 på prebiotiske substrat i brønnplate, substratkonsentrasjon 6,5 g/L. Vekstkurven er angitt med OD etter x antall timer, hvor hvert punkt representerer når prøveuttaket ble utført. Diagrammet er tatt med som et eksempel på hvordan vekstforløpet så ut på følgende stammer; *V.anguillarum* HI 610, *Marinomonas* sp., *Microbacterium* ID 3-10, *Ruegeria* RA 4-1, stamme 3-14 D2 b, *Pseudomonas* 1, 3-7 C4 a, stamme 3-14 E9 b og *Microbacterium* 3-5 G10.

Forkulturen på stamme 3-5 F9 b hadde i dette forsøket generelt dårlig vekst, og i tillegg ble det dårlig vekst på substratene som ble undersøkt for denne stammen. På bakgrunn av dette ble vekst i Brain Heart Infusion (BHI) (CM1135, Oxoid, UK) undersøkt for denne stammen,

noe som ga en mye bedre vekst. Det ble dermed laget nye ampuller for denne stammen i dette mediet (punkt 2.1.2).

3.5 Hemolysetesting

For å ekskludere stammer som kunne være skadelig for torskelarver med hensyn på hemolyse, ble de 11 gjenværende stammene undersøkt ved å dyrkes på blodagarplater. *Vibrio* 1-1 D8 og 1-2 D12 vokste ikke opp på blodagarplatene, og ble derfor ikke testet for eventuell hemolytisk egenskap. Det ble her tatt med en bakteriestamme som er kjent for å ha hemolytisk egenskap som positiv kontroll på at agarplatene var pålitelig med hensyn på å kunne påvise hemolytiske bakteriestammer. Ingen av stammene som ble testet ble påvist som hemolyserende stammer, og ble derfor ikke karakterisert som skadelig for torskelarver med hensyn på hemolyse. Figur 19 viser bilde av den positive kontrollen som ble tatt med i forsøket. På bildet kan man se en oppklaringszone rundt bakteriekoloniene hvor blodet er så hemolysert at man kan se gjennom platen. Platene for stammene som ble testet i forsøket, og som var negativ for hemolyse, så ut som blodagarplaten på venstre del av bildet, hvor det ikke finnes noen oppklaringszone rundt koloniene.



Figur 19: Bilde av hemolyserende stamme, som ble brukt som positiv kontroll. Hemolyse ses ved oppklaringszone rundt koloniene.

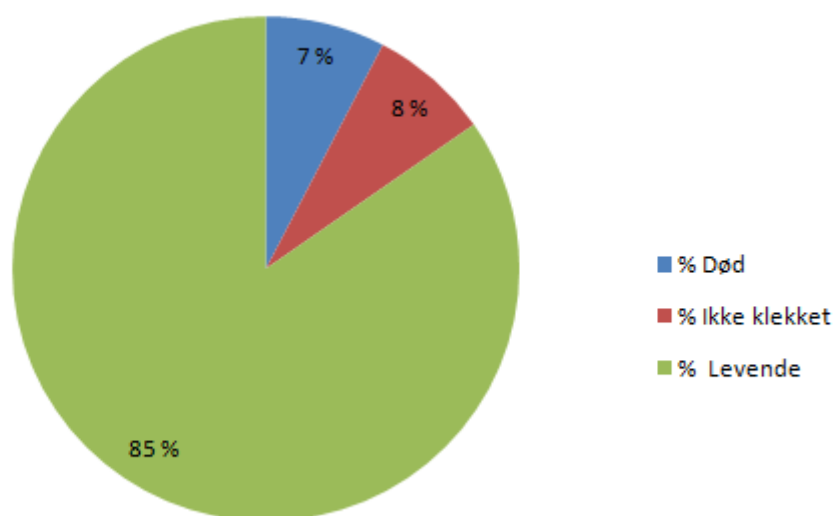
3.6 *In vivo* testing av bakteriestammer med torskelarver

10 av stammene ble testet sammen med torskelarver i et *in vivo* forsøk for å undersøke om noen av stammene var patogene for torskelarvene, og for å undersøke eventuelle probiotiske egenskaper hos stammene. *V. anguillarum* HI 610 ble inkludert i forsøket som negativ

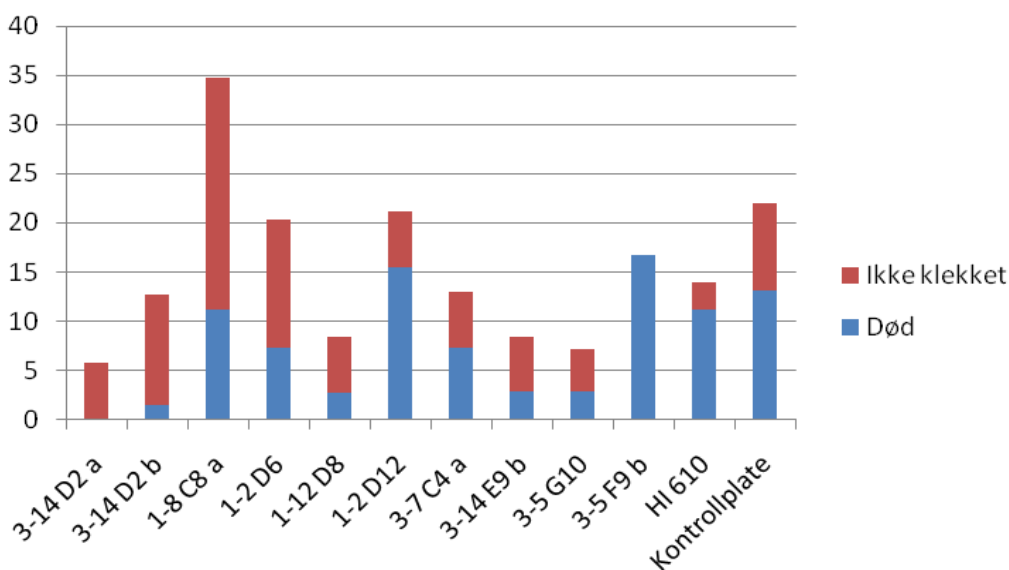
kontroll, og larver uten tilsats av bakterier tjente som positiv kontroll. Larvene ble ikke føret i forsøket og ville derfor dø når plommesekken var brukt opp.

Total andel larver som klekket var 85 % og er basert på gjennomsnittet av prosentandel klekkede larver for de 3 parallellene av brønnplater for hver stamme. I Figur 20 er det gitt en oversikt over den totale andelen torskelarver på dag 1 etter klekking. En del av larvene døde fra dag 0 til dag 1, men det var i tillegg vanskelig å skille mellom larver som var død og egg som ikke var klekket, slik at de to andelene til sammen blir en mer korrekt andel for ikke-levende larver totalt, enn de er hver for seg. I Figur 21 er det gitt en oversikt over andelen døde og ikke klekkede larver for hver av stammene på dag 1 etter klekking.

De 4 stammene som hadde størst andel klekkede larver var *Marinomonas* 3-14 D2 a, *Photobacterium* 1-12 D8, stamme 3-14 E9 b og *Microbacterium* 3-5 G10. Stammen som hadde høyest andel ikke klekkede eller døde larver var *Shewanella* 1-8 C8 a.

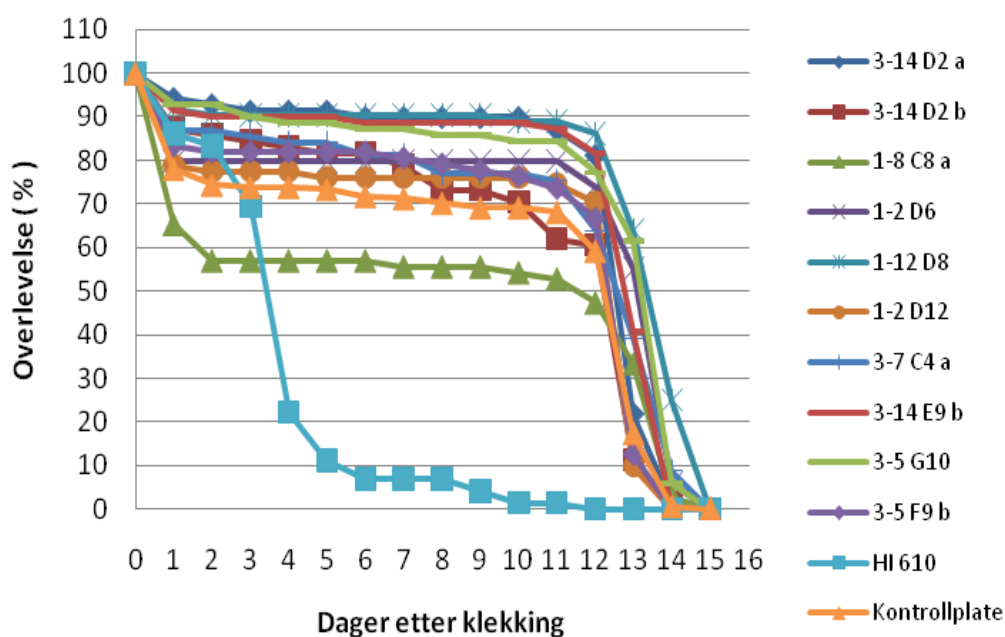


Figur 20: Oversikt over totalt antall torskelarver ett døgn etter klekking, gitt i %. Andelen er basert på gjennomsnittet for døde, ikke-klekkede egg og levende larver for hver av stammene.



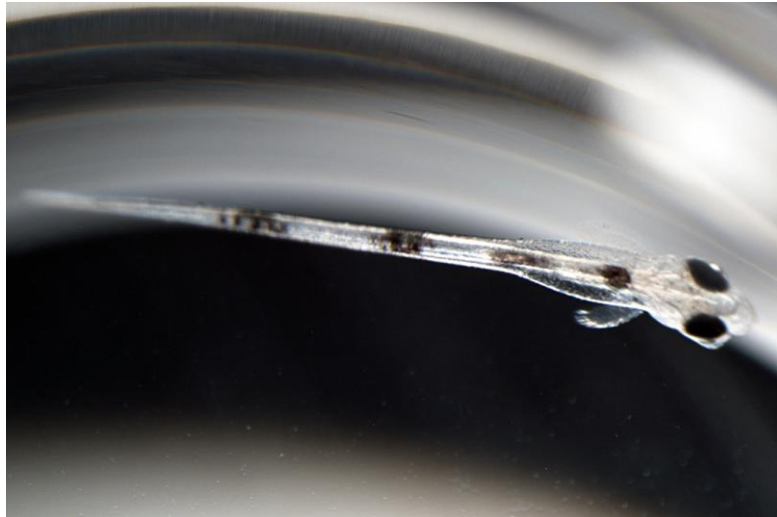
Figur 21: Andel ikke klekkede egg og døde larver ett døgn etter klekking for hver av stammene. Angitt i %.

Den negative kontrollen ga en tidlig nedgang i andel levende larver og allerede 6 dager etter klekking, var < 10 % av larvene fortsatt i live. Alle stammene ga bedre overlevelse enn den positive kontrollen, med unntak av *Shewanella* 1-8 C8 a, som etter dag 1 bare hadde 65 % overlevelse. Med denne stammen holdt andelen levende larver seg stabilt frem til dag 11, hvor også stamme 3-14 D2 b ga dårligere overlevelse enn den positive kontrollen. En oversikt over % overlevelse for larvene dyrket med bakteriestammene er gitt i Figur 22.



Figur 22: Kurve for andel levende torskelarver gitt i % for hvert døgn etter klekking, talt frem til alle larver i kontrollplaten døde.

Etter dag 1 hadde stammene *Vibrio* 1-2 D12 og *Shewanella* 1-2 D6 relativt lik overlevelse som den positive kontrollen, men hadde høyere overlevelse enn kontrollen resten av forsøket. Stammen som hadde høyest overlevelse ved slutten av forsøket, var *Photobacterium* 1-12 D8.



Figur 23: Bilde av en torskelarve i brønnplate. Bildet er tatt i løpet av forsøksperioden og dermed fotografert gjennom brønnplaten.

3.7 Dyrkning av *Pseudoalteromonas* RA 7-14 med patogene stammer

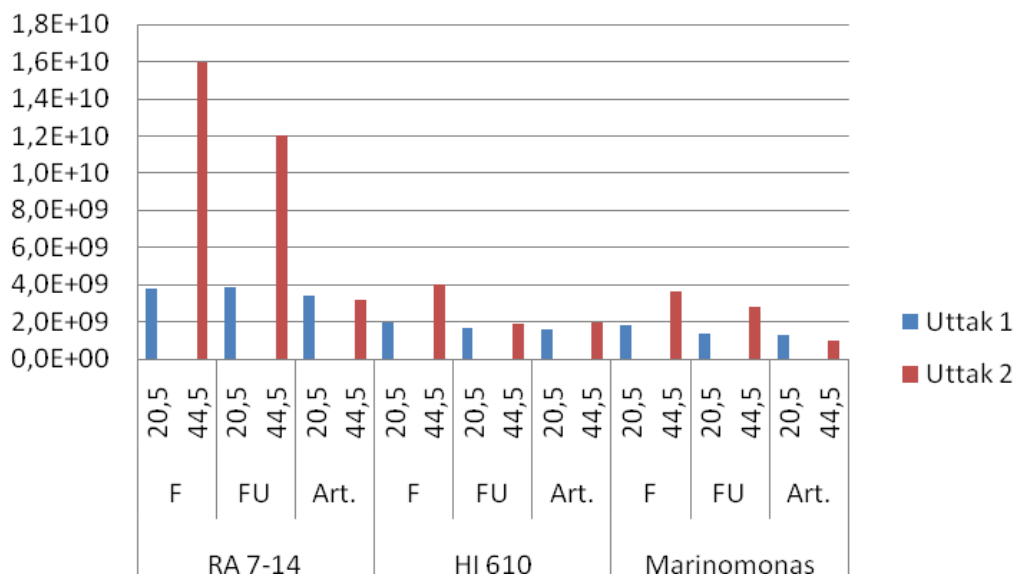
For å undersøke evne til å utkonkurrere patogene stammer, ble *Pseudoalteromonas* RA 7-14 valgt ut for å dyrkes i blandingskultur sammen med de to patogene stammene; *V. anguillarum* HI 610 og *Marinomonas* sp. RA 7-14 ble undersøkt på bakgrunn av at den var den stammen som vokste best på de prebiotiske substratene (punkt 3.4). RA 7-14 foretrakk β -glukan og laminaran som prebiotisk substrat, og av disse to var det β -glukan den vokste best på. For å undersøke hvor høy konsentrasjon som var nødvendig for å gi RA 7-14 en konkurransefordel, ble β -glukan benyttet i 4 ulike konsentrasjoner.

Medium benyttet i forsøket var redusert MB tilsatt 3 ulike proteinsubstrater; fordøyd fiskemel (fiskemel f), ufordøyd fiskemel (fiskemel uf) og *Artemia*, som er en saltvannsreke, alle med en konsentrasjon på 6,5 g/L, for å undersøke vekst på vanlige ingredienser i fiskefôr. Til hver av de 3 betingelsene ble det tilsatt β -glukan i konsentrasjonene 0, 0,5, 1 og 3 g/L, slik at det ble 12 dyrkningsbetingelser sammenlagt. I tillegg ble de ulike stammene dyrket i renkultur på de 3 proteinsubstratene uten tilsatt β -glukan.

Det ble tatt ut prøver fra brønnene ved to ulike tidspunkt; 20,5 og 44,5 timer etter innokulering. Det ble da tatt ut 45 μ l av renkulturene og blandingskulturene som ble overført til sterile eppendorfrør og oppbevart på is for å hemme videre vekst. For å bestemme

mengden av de ulike bakteriestammene ble kimtall bestemt på prøvene ved hvert prøveuttak (punkt 2.5.3).

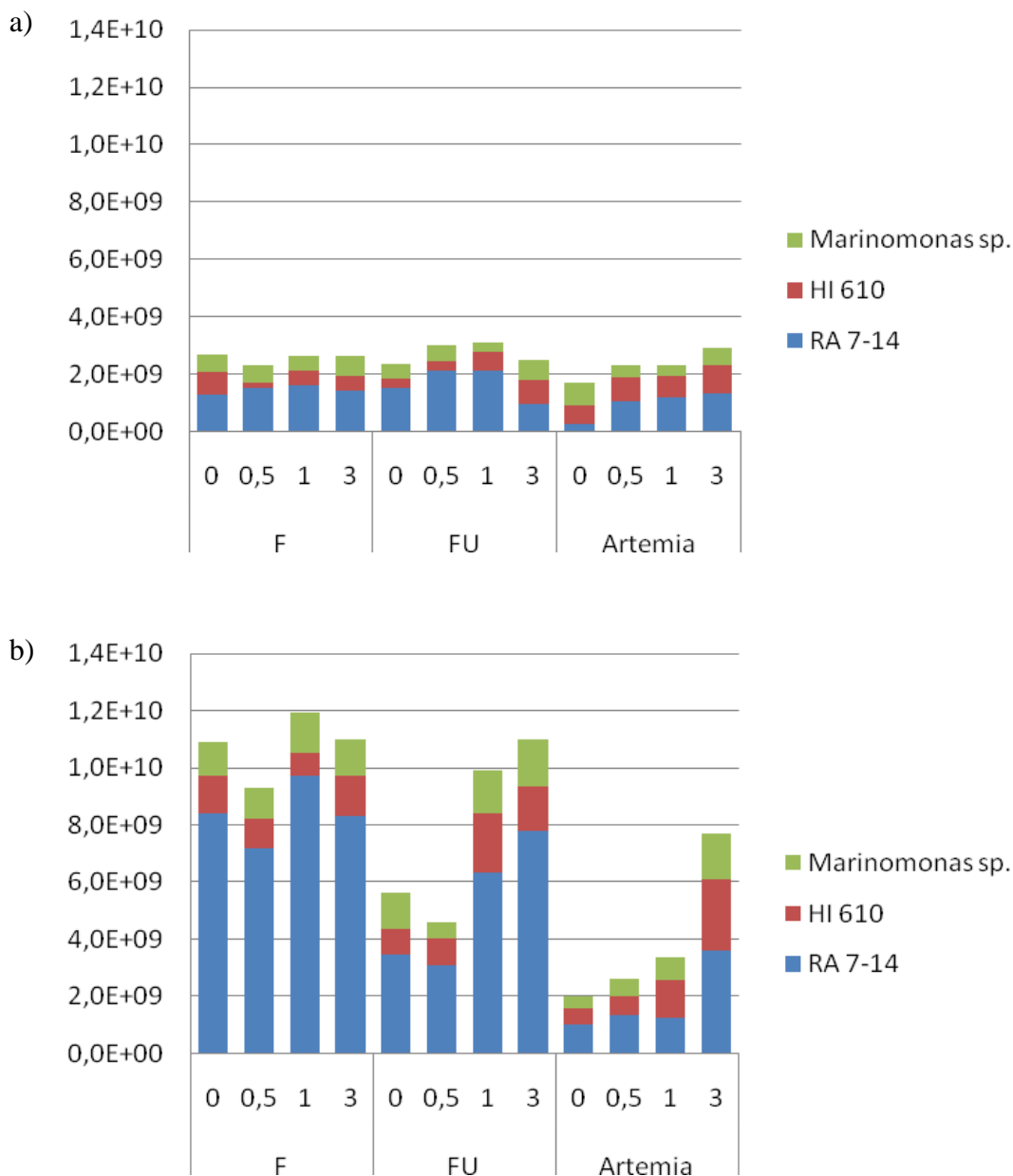
Vekst i renkultur viste at de to patogene stammene vokste generelt dårlig på alle de 3 mediene, mens derimot RA 7-14 oppnådde god vekst. Det viste seg også at RA 7-14 vokste best på fordøyd og ufordøyd fiskemel i forhold til vekst på Artemia. Resultatene fra vekst i renkultur var kun indikert med proteinsubstratene som tilsetning da de var uten tilsatt β -glukan. En oversikt over CFU/ml i renkultur på de ulike proteinsubstratene er gitt i Figur 24.



Figur 24: Vekst i renkultur. Figuren gir en oversikt over CFU/ml for hver av stammene ved uttak 1 (etter 20,5 timer) og uttak 2 (etter 44,5 timer) dyrket i renkultur på proteinsubstratene; fordøyd fiskemel (F), ufordøyd fiskemel (FU) og artemia (Art.).

Ved det første uttaket, 20,5 timer etter innokulering, var stammene generelt ikke kommet så høyt opp i vekst, men *Pseudoalteromonas* RA 7-14 var den stammen som hadde vokst mest ved dette tidspunktet. Det minst foretrukke mediet for denne stammen, ved dette tidspunktet, så ut til å være på Artemia som tilsetning, og da særlig på Artemia uten tilsatt β -glukan. Ved det andre uttaket, 44,5 timer etter innokulering, var stammene kommet mye høyere i vekst, og på dette tidspunktet var det også *Pseudoalteromonas* RA 7-14 som hadde vokst mest. Best vekst for denne stammen var oppnådd på fordøyd fiskemel som proteinsubstrat, og fortsatt var den dårligste veksten oppnådd på Artemia som tilsetning. Når det gjaldt ufordøyd fiskemel, vokste RA 7-14 best på de høyeste konsentrasjonene av β -glukan; 1 og 3 g/L.

De patogene stammene; *V. anguillarum* HI 610 og *Marinomonas sp.* oppnådde generelt dårlig vekst på alle mediene, og den beste veksten for disse stammene ble oppnådd på ufordøyd fiskemel med β -glukan i konsentrasjonene 1 og 3 g/L, og på *Artemia* tilsatt β -glukan i konsentrasjonen 3 g/L. En oversikt over CFU/ml for stammene på de ulike mediene ved begge prøveuttakene er gitt i Figur 25.



Figur 25: CFU/ml av hver av stammene på de ulike proteinsubstratene; fordøyd fiskemel (F), ufordøyd fiskemel (FU) og *Artemia* tilsatt β -glukan i konsentrasjonene 0, 0,5, 1 og 3 g/L. **a)** Viser vekst av stammene på de ulike mediene ved første prøveuttak, 20,5 timer etter innokulering. **b)** Viser vekst av stammene på de ulike mediene ved andre prøveuttak, 44,5 timer etter innokulering.

3.8 Vekstforsøk i brønnplater med filterinnsats og felles reservoar

For å undersøke om de potensielt probiotiske stammene dyrket sammen med patogene stammer stimuleres eller hemmes av hverandre, ble de 4 potensielle stammene, i tillegg til de to patogene stammene; *V. anguillarum* HI 610 og *Marinomonas* sp. dyrket i brønnplate med filterinnsats og felles reservoar.

Stammene ble tilsatt brønnene i filterplaten og kontrollplaten som vist i Figur 26. I kontrollplaten ble stammene dyrket i adskilte brønner hvor de kun vokste i sitt eget medium, slik at vekst i renkultur i forhold til vekst når medium ble delt mellom stammene kunne sammenlignes.

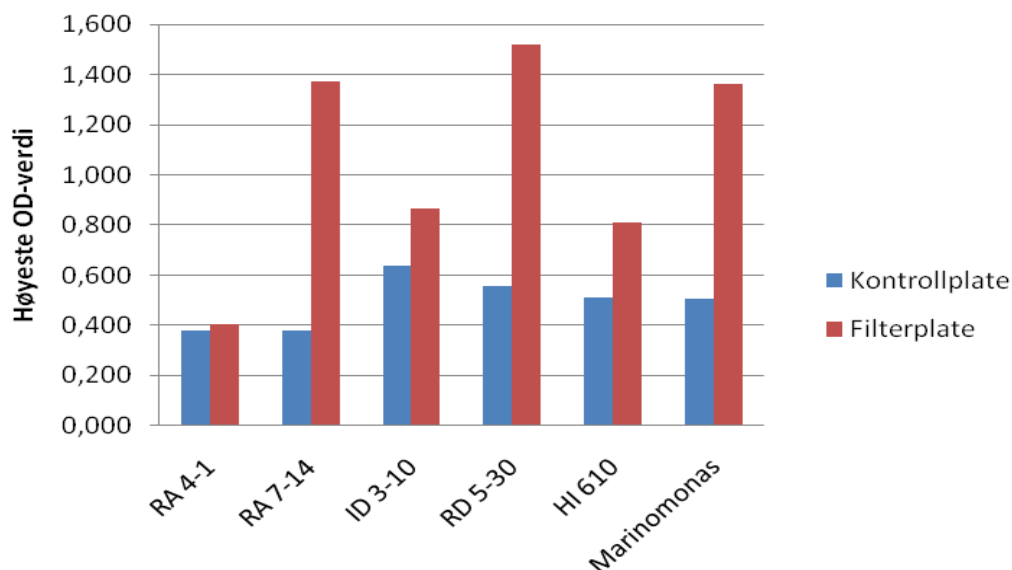
Oppsett plate

	1	2	3	4	5	6
A	Yellow	Green	Purple	Blue	Purple	Yellow
B	Pink	White	Blue	Green	Pink	White
C	White	Blue	Green	Purple	Yellow	Pink
D	Yellow	Pink	Purple	White	Green	Blue

Yellow	RA 4-1	White	RD 5-30
Pink	RA 7-14	Green	HI 610
Purple	ID 3-10	Blue	Marinomonas

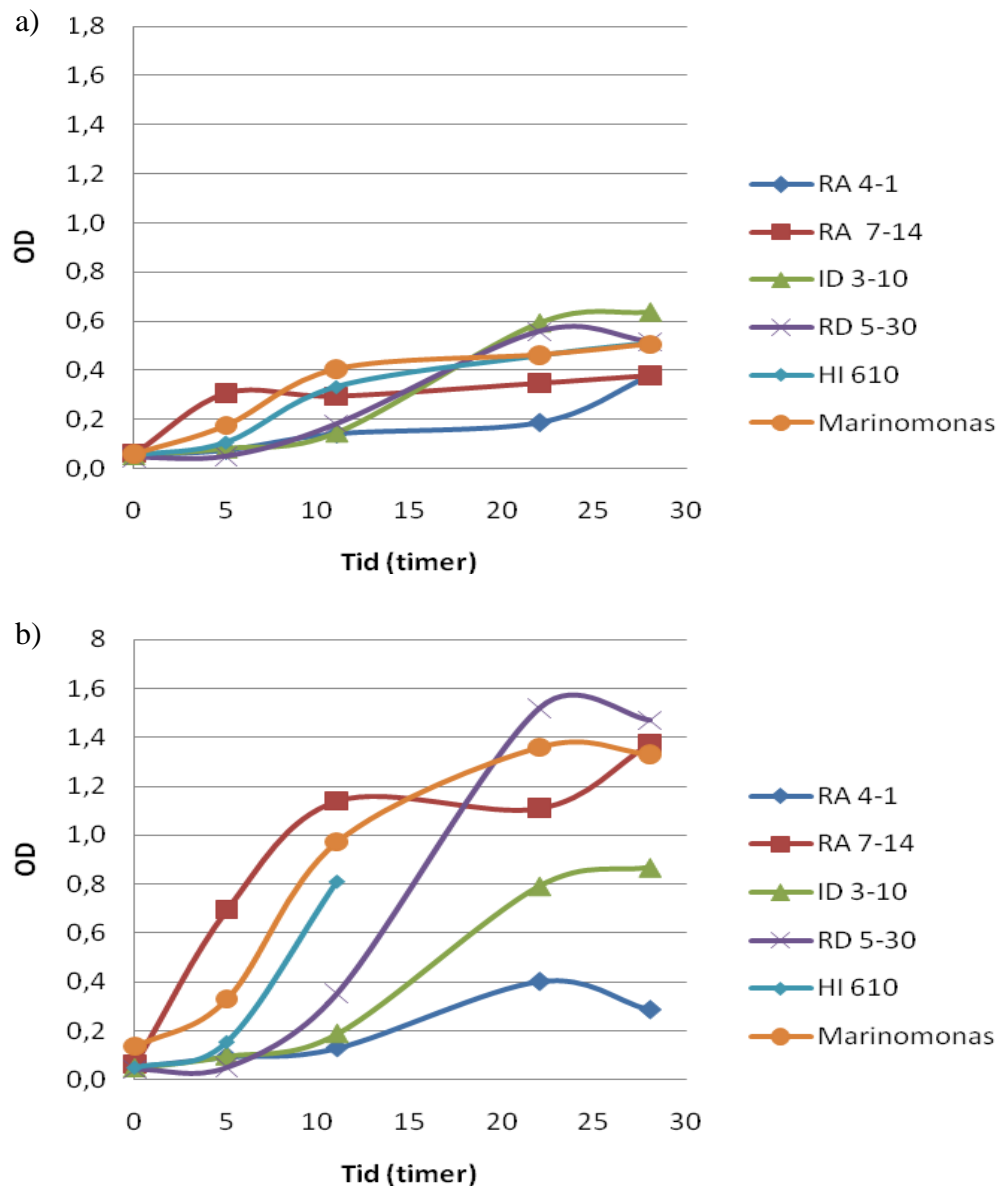
Figur 26: Viser oppsettet for stammene i filterplaten og kontrollplaten. Platen var inndelt i fire soner hvor de 6 bakteriestammene ble tilsatt i ulikt mønster.

Det viste seg at et par av stammene fikk en klar økning i vekst når de ble dyrket i filterplaten hvor mediet ble delt blant stammene, i forhold til vekst i eget medium på kontrollplaten. Dette kan skyldes at det ble mer tilgjengelig medium når det var et mediereservoar utenfor dyrkningskammeret. Det var mindre tilgjengelig volum for hver stamme i kontrollplaten. Figur 27 viser den høyeste oppnådde OD for stammene både i kontrollplaten og i filterplaten. Stammene som skilte seg ut var *Vibrio gallicus* RD 5-30, som oppnådde den høyeste OD-verdien av stammene i filterplaten, *Pseudoalteromonas* RA 7-14 og patogene *Marinomonas* sp., som alle vokste best i filterplaten. *Ruegeria* RA 4-1 var den stammen hvor det viste seg å være minst endring i OD fra dyrkning i filterplaten i forhold til kontrollplaten.



Figur 27: Oversikt over høyeste OD oppnådd for bakteriestammene, både i kontrollplaten og i filterplaten.

En oversikt over den gradvise stigningen i celletetthet for hver av stammene ved de ulike prøveuttakene er gitt i Figur 28. Figuren viser gjennomsnittlig OD for hver av stammene fra de 4 områdene de ble dyrket i, både i kontrollplaten og filterplaten. Av stammene dyrket i kontrollplaten var det *Microbacterium* ID 3-10 som oppnådde høyest OD. HI 610 ble kun målt frem til 10 timer etter innokulering i filterplaten fordi den på dette tidspunktet var blitt en tykk masse som det ikke gikk an å ta ut prøver fra. Resultatet på denne stammen ble dermed ufullstendig da man ikke kunne se det videre forløpet på veksten. Ut ifra vekstkurven i Figur 28 for filterplaten, kunne det se ut som at stammen var i eksponentiell vekst og sannsynligvis kunne man forventet en høyere OD også på denne stammen.



Figur 28: Oversikt over gjennomsnittlig vekstforløp for hver stamme, gitt med OD. Stammene ble dyrket i 4 ulike områder med ulike plasseringer i forhold til de andre stammene for hvert område, og figuren viser gjennomsnitts-OD for de 4 områdene for hver stamme. **a)** Vekstforløpet for stammene dyrket i kontrollplaten. **b)** Vekstforløpet for stammene dyrket i filterplaten. HI 610 ble kun målt frem til 10 timer etter innokulering.

3.9 Hemmeforsøk av enkeltstammer mot *V. anguillarum* HI 610

Bakteriestammene fra torskelarveforsøket ble undersøkt for evne til å hemme den patogene stammen *V. anguillarum* HI 610, både under aerobe og anaerobe dyrkningsforhold. *Shewanella* 1-8 C8 a ble ikke inkludert i forsøket da den ga lavest klekking av larver. *Pseudomonas* 1, 3-7 C4 a ble heller ikke inkludert da den ikke var vist å produsere interessante produkter, hverken under aerobe eller anaerobe forhold. I dette forsøket ble en stamme som ikke tidligere var benyttet i denne oppgaven inkludert. Dette var stamme 3-9 B8

b, som ble antatt å være forurensing ved undersøkelse for renhet av stammene (punkt 3.2). Denne stammen var blitt påvist av SINTEF til å være fermentativ.

Stammene ble i forsøket dyrket i Millipore-plater med filterinnsatser og separate reservoar. I dette forsøket ble to ulike vekstmedier benyttet; MB 2216 uten tilsetning, for å undersøke vekst med full mengde av protein, og redusert MB tilsatt 6,5 g/L glukose, for å undersøke vekst når mengde protein var redusert, og glukose var tilsatt. Dette for å undersøke vekst på glukose som tilsetning kontra protein. *Vibrio* 1-2 D12 og stamme 3-5 F9 b ble dyrket i Brain Heart Infusion tilsatt 15 g/L NaCl under forsøket, og da ble også HI 610 dyrket i dette mediet for å kunne dyrkes sammen med disse stammene. I dette forsøket ble det vekst i forkulturen på *Vibrio* 1-1 D8 og denne stammen ble dermed inkludert i dette forsøket.

For å påvise eventuelle forskjeller i vekst når stammene ble dyrket separert med et filter, i forhold til når stammene ble dyrket i renkultur, ble gjennomsnittlig vekst for hver stamme dyrket på innsiden og utsiden i filteret beregnet for dyrkning sammen med HI 610 og i renkultur. Denne veksten ble videre benyttet for å finne et forholdstall mellom dyrkning i renkultur i forhold til dyrkning sammen med HI 610. Verdier på forholdstall > 1 tilsvarte at bakteriestammen vokste bedre når mediet ble delt mellom stammene enn når stammen ble dyrket i renkultur. Motsatt tilsvarte verdier på forholdstall < 1 at bakteriestammen vokste dårligere når mediet ble delt mellom stammene enn når stammen ble dyrket i renkultur. Dette gjaldt også for anaerobe dyrkningsforhold. Forholdstallet ble beregnet ved å dividere gjennomsnittlig OD i blanding med gjennomsnittlig OD i renkultur for hver av stammene.

3.9.1 Aerobe dyrkningsforhold

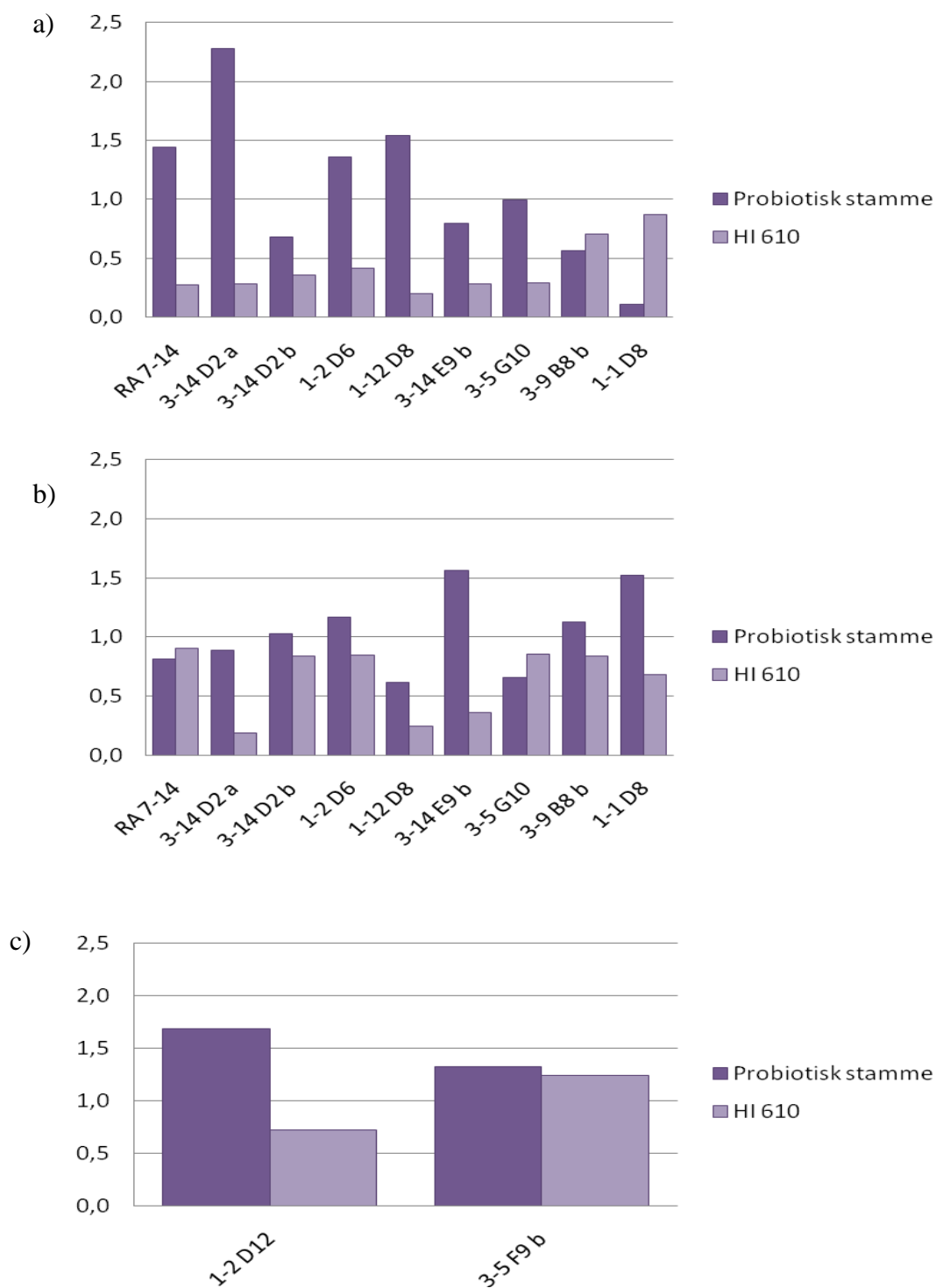
En oversikt over forholdstallet etter 22,5 timer for stammer dyrket i MB 2216 uten tilsetning, redusert MB tilsatt glukose (6,5 g/L) og BHI tilsatt NaCl (15 g/L) er gitt i Figur 29. Det ble tilsatt medium ved prøveuttak 22,5 og 36 timer etter innokulering, noe som førte til svingninger i vekstkurvene. Tidspunktet ved 22,5 timer ble derfor valgt ut fordi det representerte forholdet mellom stammene før innvirkning av tilsatt medium. Tidspunktet viste også stor forskjell mellom vekst hvor mediet ble delt i forhold til vekst i renkultur.

Ved dette tidspunktet var forskjellen i vekst hvor de probiotiske stammene vokste godt, samtidig som HI 610 vokste dårlig, oppnådd i det proteinrike mediet. I det glukoserike mediet økte derimot veksten for HI 610 betraktelig, samtidig som veksten ble redusert for de

probiotiske stammene. Selv om HI 610 vokste bedre i dette mediet, oppnådde den ikke et forholdstall > 1 , og var fortsatt hemmet i forhold til vekst i renkultur.

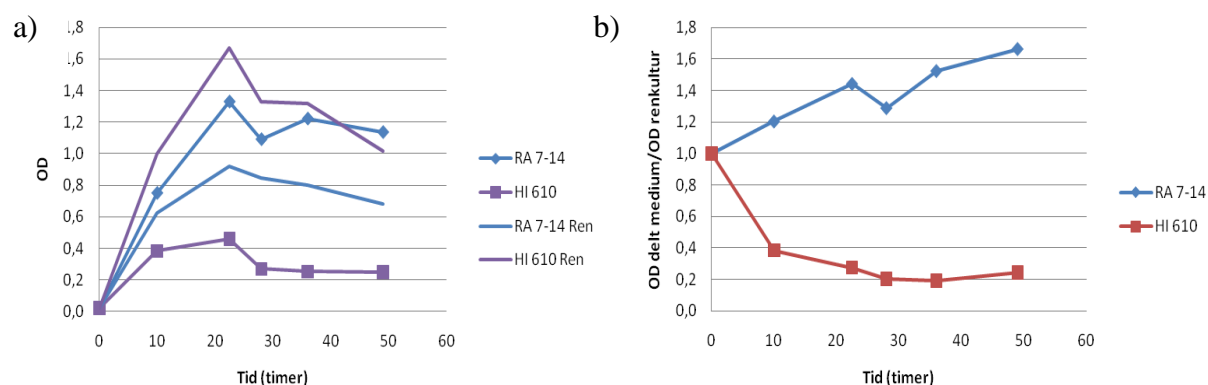
Bakteriestammene som oppnådde bedre vekst når mediet ble delt med HI 610, oppnådde forholdstall som var >1 . Dette ble påvist for *Pseudoalteromonas* RA 7-14, *Marinomonas* 3-13 D2 a, *Shewanella* 1-2 D6 og *Photobacterium* 1-12 D8, i det proteinrike mediet. I det glukoserike mediet var det *Shewanella* 1-2 D6, stamme 3-14 E9 b, stamme 3-9 B8 b og *Vibrio* 1-1 D8 som oppnådde bedre vekst når mediet ble delt med HI 610 enn i renkultur. *Marinomonas* 3-14 D2 a og *Photobacterium* 1-12 D8 var de eneste stammene som klarte å hemme veksten til HI 610 i begge mediene, selv om deres egen vekst ble dårligere i det glukoserike mediet. Motsatt ble observert for stamme 3-14 E9 b som hemmet veksten til HI 610 i begge mediene, men som vokste dårligere i det proteinrike mediet. *Vibrio* 1-1 D8 vokste dårligst av de probiotiske stammene i det proteinrike mediet delt med HI 610. Derimot ble veksten for stammen mye bedre i det glukoserike mediet.

Av stammene dyrket i Brain Heart Infusion (BHI) tilsatt 15 g/L NaCl var det *Vibrio* 1-2 D12 som ga dårligst vekst for HI 610, samtidig som det ble god vekst for den probiotiske stammen. Stamme 3-5 F9 b vokste like godt som HI 610 i dette mediet.



Figur 29: Forholdstall mellom stammene 22,5 timer etter innokulering under aerobe vekstvilkår, hvor forskjellen mellom stammene var størst. Forholdstallet er basert på gjennomsnittlig vekst for stammene både på innsiden og utsiden av filteret. Eksempler på vekstdiagrammer er gitt i Vedlegg E. Forholdstall for stammene > 1, tilsvarer at stammen vokste bedre i delt medium enn i renkultur, og motsatt, stammer med forholdstall < 1, tilsvarer at stammen vokste dårligere i delt medium enn i renkultur. **a)** Viser vekstforholdet for stammer dyrket i MB 2216, **b)** for stammer dyrket i redusert MB tilsatt glukose og **c)** for stammer dyrket i BHI tilsatt NaCl (15 g/L).

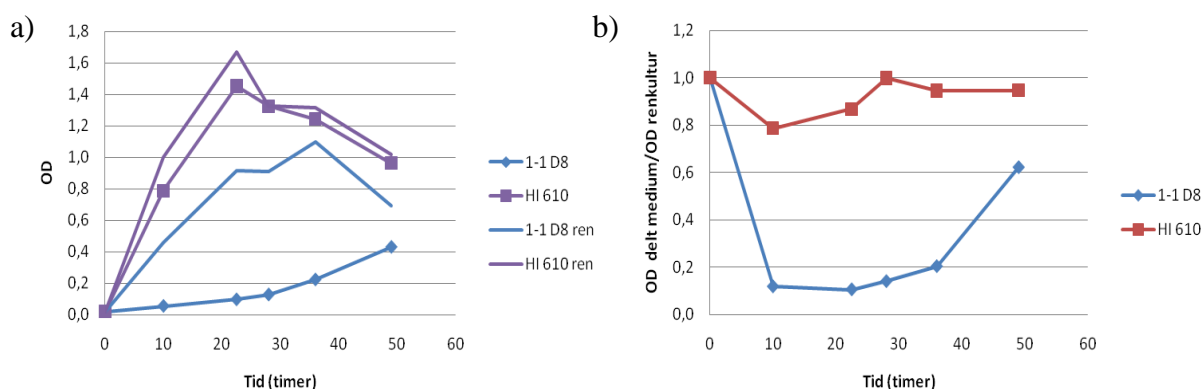
Probiotiske stammer som oppnådde bedre vekst når mediet ble delt med den patogene HI 610 enn i renkultur, ga vekstkurver som kunne sammenlignes med *Pseudoalteromonas* RA 7-14 dyrket i MB uten tilsetning (Figur 30). Til venstre i figuren ser man at veksten for HI 610 i renkultur ligger mye høyere i diagrammet enn i medium delt med RA 7-14. I tillegg ser man at veksten for RA 7-14 ligger litt høyere når stammen dyrkes i delt medium med HI 610 enn den gjør i renkultur. Diagrammet er som tidligere nevnt basert på gjennomsnittlig vekst av stammene dyrket både på innsiden og utsiden av filteret. Til høyre i figuren vises forholdstallene for hvert prøveuttak mellom *Pseudoalteromonas* RA 7-14 og HI 610 dyrket i MB uten tilsetning. For alle probiotiske stammer som oppnådde bedre vekst enn HI 610 når mediet ble delt mellom stammene, enn i renkultur, ble diagrammene for forholdstall mellom stammene seende ut slik som dette diagrammet. Figuren viser tydelig at stammene har lik vekst ved starten av forsøket, hvor forholdstallet ligger på 1, og deretter stiger eller synker forholdstallet avhengig av om veksten øker eller minker. Flere eksempler er gitt i Vedlegg E.



Figur 30: a) Vekstkurve for *Pseudoalteromonas* RA 7-14 dyrket mot *V. anguillarum* HI 610 i MB 2216 under aerobe forhold. Vekstkurven er basert på gjennomsnittlig vekst for hver stamme dyrket på innsiden og utsiden av brønner separert med filter. Kurven viser også vekst når stammene dyrkes i renkultur, dvs. at samme stamme er på innsiden og utsiden av filteret. b) Kurve for forholdstall mellom vekst i delt medium kontra vekst i renkultur for *Pseudoalteromonas* RA 7-14 og *V. anguillarum* HI 610 dyrket i MB 2216 under aerobe forhold. Forholdstallet er basert på OD i delt medium dividert på OD i renkultur. Kurven gir en oversikt over om stammene vokste bedre i delt medium eller i renkultur for hvert prøveuttak. Forholdstall > 1 , tilsvarer at OD var høyere i delt medium enn i renkultur, og forholdstall < 1 tilsvarer at OD-verdien var lavere i delt medium enn i renkultur av stammen.

Probiotiske stammer som oppnådde dårligere vekst når mediet ble delt med HI 610 ga vekstkurver som kan sammenlignes med *Vibrio* 1-1 D8 dyrket i MB uten tilsetning, som vist i Figur 31. Til venstre i figuren ser man at kurven for HI 610 i renkultur ligger hakket høyere i diagrammet enn når mediet var delt med *Vibrio* 1-1 D8. Kurven for vibrioen ligger i

diagrammet mye høyere i renkultur enn når stammen ble dyrket i medium delt med HI 610. Til høyre i figuren vises diagrammet for forholdstall mellom *Vibrio* 1-1 D8 og HI 610 dyrket i MB uten tilsetning. I dette tilfellet oppnådde ingen av stammene et forholdstall > 1 , og dermed har begge stammene dårligere vekst når mediet deles enn i renkultur. Allikevel ligger kurven for HI 610 høyere i diagrammet enn *Vibrio* 1-1 D8. For probiotiske stammer som oppnådde dårligere vekst når mediet ble delt med HI 610 enn i renkultur, kan diagrammene for forholdstall mellom stammene sammenlignes med dette diagrammet. Eksempler på flere vekstkurver er gitt i Vedlegg E.



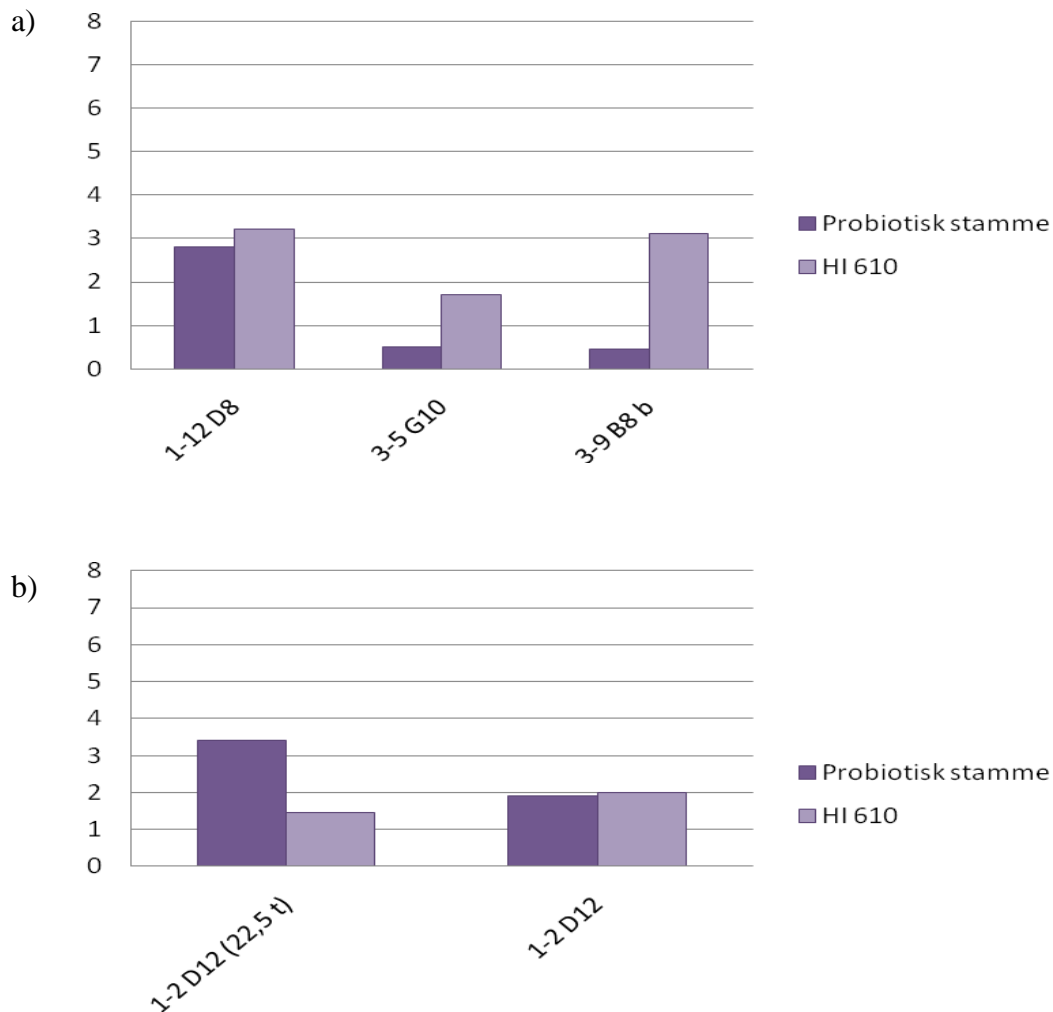
Figur 31: a) Vekstkurve for *Vibrio*1-1 D8 dyrket mot *V. anguillarum* HI 610 i MB 2216 under aerobe forhold. Vekstkurven er basert på gjennomsnittlig vekst for hver stamme dyrket på innsiden og utsiden av brønner separert med filter. Kurven viser også vekst når stammene dyrkes i renkultur, dvs. at samme stamme er på innsiden og utsiden av filteret. **b)** Kurve for forholdstall mellom vekst i delt medium kontra vekst i renkultur for *Vibrio* 1-1 D8 og *V. anguillarum* HI 610 dyrket i MB 2216 under aerobe forhold. Forholdstallet er basert på OD i delt medium dividert på OD i renkultur. Kurven gir en oversikt over om stammene vokste bedre i delt medium eller i renkultur for hvert prøveuttak. Forholdstall > 1 , tilsvarer at OD var høyere i delt medium enn i renkultur, og forholdstall < 1 tilsvarer at OD-verdien var lavere i delt medium enn i renkultur av stammen.

3.9.2 Anaerobe dyrkningsforhold

Den anaerobe delen av forsøket ble satt opp etter den aerobe delen, og av forkulturene til forsøket sluttet igjen *Vibrio* 1-1 D8 å vokse. Stammen ble dermed ikke tatt med i den anaerobe delen av dette forsøket.

En oversikt over forholdstallet etter 97,5 timer for stammer dyrket i MB 2216 uten tilsetning og i Brain Heart Infusion (BHI) tilsatt NaCl (15 g/L) er gitt i Figur 32. Dette tidspunktet ble valgt til å presentere resultatet av vekst i disse mediene, da det var dette tidspunktet hvor forskjellen mellom dyrkning hvor mediet ble delt og dyrkning i renkultur var størst. Ved dette tidspunktet var det ingen av de probiotiske stammene som dominerte og HI 610 hadde dermed

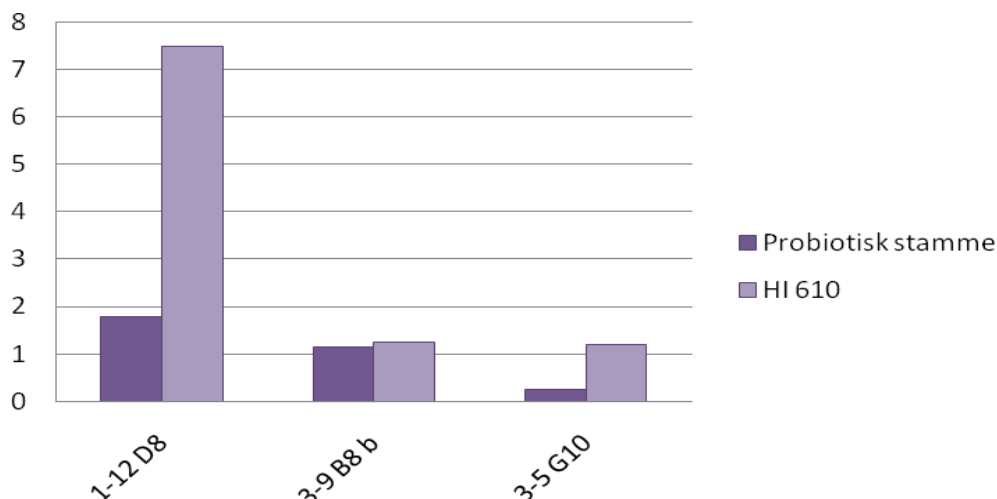
best vekst under disse forholdene. Vekstforholdet mellom HI 610 og *Vibrio* 1-2 D12 etter 22,5 timer i BHI ble tatt med i figuren. Dette fordi den probiotiske stammen dominerte ved dette tidspunktet, men var endret etter 97,5 timer, noe som kun skjedde for denne stammen under anaerobe vekstvilkår. *Photobacterium* 1-12 D8 i MB 2216 uten tilsetning, og *Vibrio* 1-2 D12 i BHI var de stammene som vokste best av de probiotiske stammene, og oppnådde en vekst tilsvarende lik HI 610.



Figur 32:Diagrammer for forholdstall mellom stammene 97,5 timer etter innokulering under anaerobe vekstvilkår, hvor forskjellen mellom stammene var størst. Forholdstallet er basert på gjennomsnittlig vekst for stammene både på innsiden og utsiden av filteret. Forholdstall for stammene > 1 , tilsvarer at stammen vokste bedre i delt medium enn i renkultur, og motsatt, stammer med forholdstall < 1 , tilsvarer at stammen vokste dårligere i delt medium enn i renkultur. **a)** Vekstforhold mellom stammer dyrket i MB 2216 uten tilsetning, **b)** vekstforhold for stammer dyrket i Brian Heart Infusion tilsatt NaCl (15 g/L).

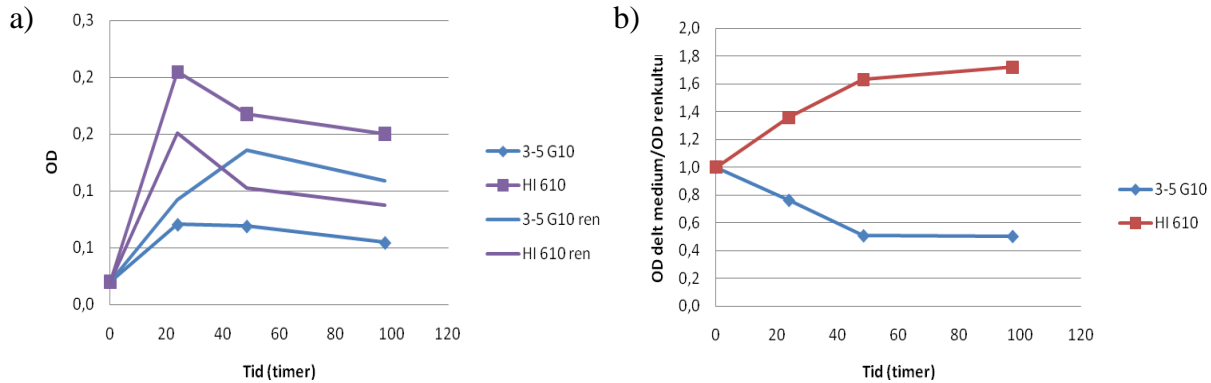
Resultatet når stammene ble dyrket i redusert MB tilsatt glukose er presentert etter 48,5 timer i Figur 33. Ingen av de probiotiske stammene dominerte over HI 610 i dette mediet. Kun *Photobacterium* 1-12 D8 og stamme 3-9 B8 b oppnådde et forholdstall som var > 1 , og tydet

på bedre vekst i medium delt med HI 610 enn i renkultur. Allikevel klarte ikke stammene å hemme HI 610. HI 610 oppnådde det høyeste forholdstallet etter 48,5 timer når den ble dyrket i medium delt med *Photobacterium* 1-12 D8, hvor den oppnådde et tall på over 7.



Figur 33: Diagram for forhold mellom dyrkning i delt medium kontra dyrkning i renkultur for stammene dyrket i red. MB tilsatt glukose (6,5 g/L) under anaerobe forhold. Forholdstallet er basert på gjennomsnittlig vekst for stammene både på innsiden og utsiden av filteret. Forholdstall for stammene > 1 , tilsvarer at stammen vokste bedre i delt medium enn i renkultur, og motsatt, stammer med forholdstall < 1 , tilsvarer at stammen vokste dårligere i delt medium enn i renkultur.

Under anaerobe vilkår oppnådde ingen av de probiotiske stammene bedre vekst enn HI 610 og diagrammer for gjennomsnittlig vekst og forholdstall kan sammenlignes med *Microbacterium* 3-5 G10 dyrket i MB uten tilsetning (Figur 34). I den venstre delen av figuren ser man at kurven for HI 610 i delt medium ligger mye høyere i diagrammet enn i renkultur. Kurvene for 3-5 G10 i renkultur ligger lavere enn kurven hvor mediet er delt. I den høyre delen av figuren vises også en oversikt over forholdstallet mellom 3-5 G10 når mediet ble delt med HI 610 dyrket i MB uten tilsetning. I figuren ser man at HI 610 oppnår et forholdstall > 1 ved alle prøveuttak, mens derimot den probiotiske stammen oppnår forholdstall < 1 ved alle prøveuttakene. Flere eksempler på vekstkurver er gitt i Vedlegg E.



Figur 34: a) Vekstkurve for *Microbacterium* 3-5 G10 dyrket mot *V. anguillarum* HI 610 i MB 2216 under anaerobe forhold. Vekstkurven er basert på gjennomsnittlig vekst for hver stamme dyrket på innsiden og utsiden av brønner separert med filter. Kurven viser også vekst når stammene dyrkes i renkultur, dvs. at samme stamme er på innsiden og utsiden av filteret. b) Kurve for forholdstall mellom vekst i delt medium kontra vekst i renkultur for *Microbacterium* 3-5 G10 og *V. anguillarum* HI 610 dyrket i MB 2216 under anaerobe forhold. Forholdstallet er basert på OD i delt medium dividert på OD i renkultur. Kurven gir en oversikt over om stammene vokste bedre i delt medium eller i renkultur for hvert prøveuttak. Forholdstall > 1, tilsvarer at OD var høyere i delt medium enn i renkultur, og forholdstall < 1 tilsvarer at OD-verdien var lavere i delt medium enn i renkultur av stammen.

3.9.3 Analysering av fermenteringsprodukt og sukker ved HPLC

Prøver til analysing ved HPLC ble tatt ut fra stammer dyrket i det glukoserike mediet under anaerobe vilkår. Dette ble utført for å undersøke om det ble produsert produkter som kunne ha en sammenheng med veksten for stammene. Prøvene ble også benyttet for å undersøke mengde omsatt glukose. Prøvene ble opparbeidet som beskrevet i materiale og metode for prøver med volum <1 ml (punkt 2.5.4).

I dette forsøket ble det kun påvist acetat og maursyre av produkter som ble ansett som interessante, og disse produktene ble påvist i alle prøvene. Ingen forskjeller i produkter som ble produsert i renkultur av stammene i forhold til dyrkning når mediet ble delt, ble påvist i dette forsøket.

Mengde omsatt glukose varierte mellom prøvene og en oversikt er gitt i Tabell 14. HI 610 omsatte all glukosen når den ble dyrket i renkultur. Ved dyrkning i delt medium ble det påvist forskjell i mengde glukose som ble omsatt avhengig av hvilken stamme HI 610 ble dyrket med. Når HI 610 ble dyrket i medium delt med stamme 3-9 B8 b og *Photobacterium* 1-12 D8 ble den minste mengden omsatt glukose blant alle stammene i forsøket oppnådd. Når HI 610 ble dyrket i delt medium med *Microbacterium* 3-5 G10 ble all glukosen omsatt allerede 24

timer etter innokulering. Ved dette tidspunktet sluttet stammene også å vokse, noe som kan tyde på at ingen av stammene vokste på andre komponenter i mediet. *Microbacterium* 3-5 G10 omsatte i likhet med HI 610 all glukosen i renkultur. For de andre stammene ble det påvist en økning i mengde glukose som ble omsatt for hvert prøveuttak.

Tabell 14: Oversikt over mengde omsatt glukose under anaerobe forhold av totalt 6,5 g/L, angitt i g/L for uttak etter 24, 48,5 og 97,5 timer etter innokulering.

Stamme	24 timer	48,5 timer	97,5 timer
<i>V.anguillarum</i> HI 610	6,5	6,5	6,5
Stamme 3-9 B8 b + HI 610	5,0	5,5	5,5
Stamme 3-9 B8 b	5,0	6,0	6,0
<i>Photobacterium</i> 1-12 D8 + HI 610	5,6	5,7	5,7
<i>Photobacterium</i> 1-12 D8	5,5	6,5	6,5
<i>Microbacterium</i> 3-5 G10 + HI 610	6,5	6,5	6,5
<i>Microbacterium</i> 3-5 G10	6,0	6,5	6,5

3.10 Undersøkelser av blandingskultur med DGGE-analyse

Bakteriestammene som kom best ut i hemmeforsøket mot *V. anguillarum* HI 610, ble valgt ut til å dyrkes i blandingskultur for å undersøke om et samspill mellom disse stammene kunne utkonkurrere HI 610. Stammene var følgende; *Marinomonas* 3-14 D2 a, stamme 3-14 D2 b, stamme 3-14 E9 b, *Vibrio* 1-2 D12, *Microbacterium* 3-5 G10, *Shewanella* 1-2 D6, *Pseudoalteromonas* RA 7-14 og *Photobacterium* 1-12 D8. Naturlig flora som var isolert fra torskeyngel ble også inkludert i forsøket for å undersøke hvilke stammer som kunne ha evne til å dominere ved naturlige forhold.

3.10.1 Testforsøk med DGGE for valg av stammer

Bestemmelse av stammer som eventuelt hadde evne til å hemme veksten av den patogene HI 610 skulle utføres ved analyse på denaturerende gradient gel elektroforese (DGGE). På bakgrunn av dette ble stammene som var valgt ut til forsøket analysert i renkultur på DGGE for å unngå å velge stammer med bånd som kunne være vanskelig å skille i gelen.

og på denne måten kunne anta når stammene vokste på fiskemelet fremfor basismediet. Vekst som økte etter 24 timer indikerte vekst på fiskemelet fremfor redusert MB.

Tabell 15: Oversikt over stammer i de 3 ulike blandingskulturene. Blanding 1 er basert på stammene som kom best ut i hemmeforsøket av enkeltkulturer mot *V. anguillarum* HI 610 (punkt 3.9). Blanding 2 består av de 3 beste fra samme hemmeforsøk, og blanding 3 er samme som blanding 2, men har også tilsatt naturlig flora fra torskeyngel.

Blanding 1	Blanding 2	Blanding 3*
<i>Pseudoaltermonas</i> RA 7-14	<i>Pseudoalteromonas</i> RA 7-14	<i>Pseudoalteromonas</i> RA 7-14
<i>Marinomonas</i> 3-14 D2 a	<i>Marinomonas</i> 3-14 D2 a	<i>Marinomonas</i> 3-14 D2 a
<i>Shewanella</i> 1-2 D6	<i>Photobacterium</i> 1-12 D8	<i>Photobacterium</i> 1-12 D8
<i>Photobacterium</i> 1-12 D8	<i>V.anguillarum</i> HI 610	<i>V.anguillarum</i> HI 610
Stamme 3-14 E9 b		Naturlig flora
<i>V.anguillarum</i> HI 610		
<i>Vibrio</i> 1-2 D12		

*Denne blandingen ble også benyttet til anaerobe vilkår.

Det ble tatt ut prøver til analysing på DGGE ved 24, 43 og 68 timer etter innokulering, både for aerobe og anaerobe vekstvilkår. Veksten til bakteriestammene på de ulike mediene ble vurdert visuelt ut ifra hvor kraftige bånd som ble påvist i gelen.

I blanding 1, som bestod av alle de utvalgte stammene vokste HI 610 dårligst på mediene tilsatt fiskemel og hvor redusert MB var basismediet. Dette gjaldt både fordøyd og ufordøyd fiskemel. HI 610 oppnådde også dårlig vekst på rent basismedium uten tilsatt fiskemel. Av de probiotiske stammene var det RA 7-14 som oppnådde best vekst på mediene tilsatt fiskemel. Resten av stammene hadde en generelt dårlig vekst på fiskemel som tilsetning. *Marinomonas* 3-14 D2 a oppnådde en middels god vekst på redusert MB uten tilsetning, men vokste dårlig når fiskemelet ble tilsatt. Nøyaktig vekst for stamme 3-14 E9 b på mediene med redusert MB som basismedium var vanskelig å bedømme da båndene for denne stammen på gelen skulle vært påvist i området hvor gelen ble dårlig. Rangering for vekst av stammene på fiskemel og redusert MB uten tilsetning er gitt i Tabell 16, 17 og 18.

Tabell 16: Blanding 1 dyrket i redusert MB tilsatt fordøyd fiskemel (6,5 g/L). Bakteriestammene er angitt med vekst fra en til tre prikker, hvor ● tilsvare lite vekst og ●●● tilsvare god vekst. Stammer hvor ingen vekst ble påvist ved visuell vurdering er angitt med —. Parentes tilsvare at veksten var litt dårligere enn angivelsen.

Stamme	Redusert MB tilsatt fordøyd fiskemel (6,5 g/L)		
	24 timer	43 timer	68 timer
<i>Pseudoaltermonas</i> RA 7-14	●●	●●●	●●●
<i>Marinomonas</i> 3-14 D2 a	—	●	●
<i>Shewanella</i> 1-2 D6*	●	●	—
<i>Photobacterium</i> 1-12 D8	●	●	—
Stamme 3-14 E9 b**			
<i>Vibrio</i> 1-2 D12	●	●	—
<i>V.anguillarum</i> HI 610	●●	●●	(●)

*Båndene til stammen i gelen befant seg i et område som var vanskelig å vurdere.

**Båndene til stammen befant seg i et område som ikke kunne vurderes.

Tabell 17: Blanding 1 dyrket i redusert MB tilsatt ufordøyd fiskemel (6,5 g/L). Bakteriestammene er angitt med vekst fra en til tre prikker, hvor ● tilsvare lite vekst og ●●● tilsvare god vekst. Stammer hvor ingen vekst ble påvist ved visuell vurdering er angitt med —. Parentes tilsvare at veksten var litt dårligere enn angivelsen.

Stamme	Redusert MB tilsatt ufordøyd fiskemel (6,5 g/L)		
	24 timer	43 timer	68 timer
<i>Pseudoaltermonas</i> RA 7-14	●●	●●●	●●●
<i>Marinomonas</i> 3-14 D2 a	—	—	—
<i>Shewanella</i> 1-2 D6*	●	●	—
<i>Photobacterium</i> 1-12 D8	●	●	—
Stamme 3-14 E9 b**			
<i>Vibrio</i> 1-2 D12	●	●	—
<i>V.anguillarum</i> HI 610	●●	●●	(●)

*Båndene til stammen i gelen befant seg i et område som var vanskelig å vurdere.

**Båndene til stammen befant seg i et område som ikke kunne vurderes.

Tabell 18: Blanding 1 dyrket i redusert MB uten tilsetning. Bakteriestammene er angitt med vekst fra en til tre prikker, hvor ● tilsvare lite vekst og ●●● tilsvare god vekst. Stammer hvor ingen vekst ble påvist ved visuell vurdering er angitt med —. Parentes tilsvare at veksten var litt dårligere enn angivelsen.

Stamme	Redusert MB uten tilsetning		
	24 timer	43 timer	68 timer
<i>Pseudoaltermonas</i> RA 7-14	●●●	●●●	●●●
<i>Marinomonas</i> 3-14 D2 a	●●	●●	●●
<i>Shewanella</i> 1-2 D6*	●	●	—
<i>Photobacterium</i> 1-12 D8	●	●	—
Stamme 3-14 E9 b**			
<i>Vibrio</i> 1-2 D12	●	●	—
<i>V.anguillarum</i> HI 610	●●	●●	●(●)

*Båndene til stammen i gelen befant seg i et område som var vanskelig å vurdere.

**Båndene til stammen befant seg i et område som ikke kunne vurderes.

I blanding 1, på mediene med startfôr oppnådde HI 610 god vekst. På disse mediene var det ingen av de probiotiske stammene som fikk god vekst. Middels god vekst ble oppnådd for *Marinomonas* 3-14 D2 a på begge mediene med startfôr, og for stamme 3-14 E9 b på startfôr tilsatt β -glukan. Rangering av vekst for stammene i blanding 1 på mediene tilsatt kommersielt startfôr er gitt i Tabell 19 og Tabell 20.

Tabell 19: Blanding 1 dyrket i kommersielt startfôr (6,5 g/L protein). Bakteriestammene er angitt med vekst fra en til tre prikker, hvor ● tilsvare lite vekst og ●●● tilsvare god vekst. Stammer hvor ingen vekst ble påvist ved visuell vurdering er angitt med —.

Stamme	Kommersielt startfôr (protein 6,5 g/L)		
	24 timer	43 timer	68 timer
<i>Pseudoaltermonas</i> RA 7-14	●	●	—
<i>Marinomonas</i> 3-14 D2 a	●●	●●	●●
<i>Shewanella</i> 1-2 D6*	●	●	—
<i>Photobacterium</i> 1-12 D8	●	●	—
Stamme 3-14 E9 b*	●	●	—
<i>Vibrio</i> 1-2 D12	●	●	—
<i>V.anguillarum</i> HI 610	●●●	●●●	●●●

*Båndene til stammen i gelen befant seg i et område som var vanskelig å vurdere.

Tabell 20: Blanding 1 dyrket i kommersielt startfôr (6,5 g/L protein) tilsatt β -glukan (1 g/L). Bakteriestammene er angitt med vekst fra en til tre prikker, hvor ● tilsvarer lite vekst og ●●● tilsvarer god vekst. Stammer hvor ingen vekst ble påvist ved visuell vurdering er angitt med —.

Stamme	Kommersielt startfôr (protein 6,5 g/L) tilsatt β -glukan (1 g/L)		
	24 timer	43 timer	68 timer
<i>Pseudoaltermonas</i> RA 7-14	●	●	—
<i>Marinomonas</i> 3-14 D2 a	●●	●●	●●
<i>Shewanella</i> 1-2 D6	●	●	—
<i>Photobacterium</i> 1-12 D8	●	—	—
Stamme 3-14 E9 b	●●	●●	●●
<i>Vibrio</i> 1-2 D12	●	●	●
<i>V.anguillarum</i> HI 610	●●●	●●●	●●●

I blanding 3, som bestod av *Pseudoalteromonas* RA 7-14, *Marinomonas* 3-14 D2 a, *Photobacterium* 1-12 D8, HI 610 og naturlig flora fra torskeyngel, vokste HI 610 godt på begge mediene med startfôr under anaerobe forhold. De probiotiske stammene vokste middels godt på begge mediene, med unntak av *Photobacterium* 1-12 D8 som vokste dårlig. Den naturlige floraen som var isolert fra torskeyngel oppnådde god vekst på begge mediene, og vokste dermed like godt som HI 610. Rangering av vekst for stammene under anaerobe vekstvilkår på mediene tilsatt kommersielt startfôr i er gitt i Tabell 21 og Tabell 22.

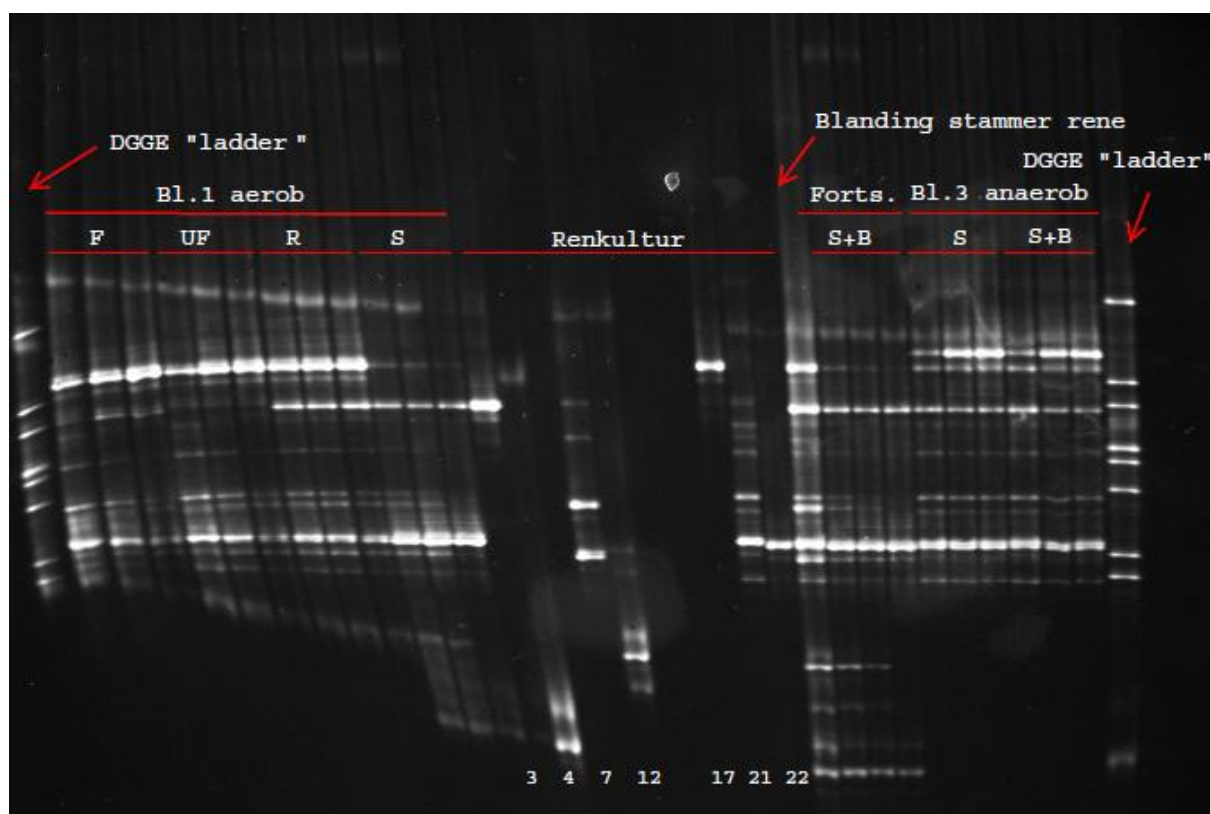
Tabell 21: Blanding 3 dyrket i kommersielt startfôr (6,5 g/L) under anaerobe vekstvilkår. Bakteriestammene er angitt med vekst fra en til tre prikker, hvor ● tilsvarer lite vekst og ●●● tilsvarer god vekst.

Stamme	Kommersielt startfôr (6,5 g/L protein) Anaerobt		
	24 timer	43 timer	68 timer
<i>Pseudoalteromonas</i> RA 7-14	●	●(●)	●(●)
<i>Marinomonas</i> 3-14 D2 a	●●	●●	●●
<i>Photobacterium</i> 1-12 D8	●	●	●
<i>V.anguillarum</i> HI 610	●●●	●●●	●●●
Naturlig flora	●	●●●	●●●

Tabell 22: Blanding 3 dyrket i kommersielt startfôr (6,5 g/L) protein tilsatt β -glukan (1 g/L) under anaerobe vekstvilkår. Bakteriestammene er angitt med vekst fra en til tre prikker, hvor • tilsvarer lite vekst og ●●● tilsvarer god vekst.

Stamme	Kommersielt startfôr (6,5 g/L protein) tilsatt β -glukan /1 g/L Anaerobt		
	24 timer	43 timer	68 timer
<i>Pseudoalteromonas</i> RA 7-14	•(•)	•(•)	•(•)
<i>Marinomonas</i> 3-14 D2 a	●●	●●	●●
<i>Photobacterium</i> 1-12 D8	•	•	•
<i>V.anguillarum</i> HI 610	●●●	●●●	●●●
Naturlig flora	•	●●●	●●●

Gelen som ble benyttet til å vurdere vekst av blanding 1 under aerobe vekstvilkår og blanding 3 under anaerobe vekstvilkår, er gitt i Figur 36.



Figur 36: Hovedforsøk på DGGE del 1. Av renkulturene tilsvarer prøve 3=*Marinomonas* 3-14 D2 a, prøve 4=stamme 3-14 E9 b, prøve 7=*Vibrio* 1-2 D12, prøve 12=*Shewanella* 1-2 D6, prøve 17= *Pseudoalteromonas* RA 7-14, prøve 21=*Photobacterium* 1-12 D8 og prøve 22=*V.anguillarum* HI 610. Blandingen av stammer består av alle stammene og ble laget ved å blande PCR-produkt fra renkulturer.

I blanding 2, som bestod av *Pseudoalteromonas* RA 7-14, *Marinomonas* 3-14 D2 a, *Photobacterium* 1-12 D8 og HI 610, vokste HI 610 middels godt i mediene tilsatt fiskemel og hvor redusert MB var benyttet som basismedium. Dette gjaldt både fordøyd og ufordøyd fiskemel. *Pseudoalteromonas* RA 7-14 var den av de probiotiske stammene som vokste best på mediene tilsatt fiskemel, og oppnådde god vekst både på fordøyd og ufordøyd fiskemel. Resten av de probiotiske stammene oppnådde generelt dårlig vekst på disse mediene. Rangering for vekst av stammene i blanding 2 på fiskemel er gitt i Tabell 23 og Tabell 24.

Tabell 23: Blanding 2 dyrket i redusert MB tilsatt fiskemel (6,5 g/L). Bakteriestammene er angitt med vekst fra en til tre prikker, hvor ● tilsvarende lite vekst og ●●● tilsvarende god vekst. Stammer hvor ingen vekst ble påvist ved visuell vurdering er angitt med —.

Stamme	Redusert MB tilsatt fordøyd fiskemel (6,5 g/L)		
	24 timer	43 timer	68 timer
<i>Pseudoalteromonas</i> RA 7-14	●●	●●●	●●●
<i>Marinomonas</i> 3-14 D2 a	—	●	●
<i>Photobacterium</i> 1-12 D8	●	●	●
<i>V.anguillarum</i> HI 610	●●	●●	●●

Tabell 24: Blanding 2 dyrket i redusert MB tilsatt ufordøyd fiskemel (6,5 g/L). Bakteriestammene er angitt med vekst fra en til tre prikker, hvor ● tilsvarende lite vekst og ●●● tilsvarende god vekst. Stammer hvor ingen vekst ble påvist ved visuell vurdering er angitt med —. Parentes tilsvarende at veksten var litt dårligere enn angivelsen.

Stamme	Redusert MB tilsatt ufordøyd fiskemel (6,5 g/L)		
	24 timer	43 timer	68 timer
<i>Pseudoalteromonas</i> RA 7-14	●●	●●●	●●●
<i>Marinomonas</i> 3-14 D2 a	—	—	●
<i>Photobacterium</i> 1-12 D8	●(●)	●	●
<i>V.anguillarum</i> HI 610	●●	●●	●●

I blanding 2, på mediene med startfôr, vokste HI 610 godt på begge mediene, men ved uttak 3, 68 timer etter innokulering, var derimot veksten til HI 610 dårlig på startfôr uten tilsatt β -glukan. På dette tidspunktet var veksten av *Pseudoalteromonas* RA 7-14 steget fra dårlig til god i samme medium. Veksten i mediet med tilsatt β -glukan var fortsatt dårlig for RA 7-14. RA 7-14 vokste dermed motsatt av HI 610 under alle prøveuttakene. Veksten av de andre

probiotiske stammene avtok for hvert prøveuttak, med unntak av *Marinomonas* 3-14 D2 a som holdt en middels god vekst ved tilsats av β -glukan. Rangering for vekst av stammene i blanding 2 på mediene med startfôr er gitt i Tabell 25 og Tabell 26.

Tabell 25: Blanding 2 dyrket i kommersielt startfôr (6,5 g/L protein). Bakteriestammene er angitt med vekst fra en til tre prikker, hvor • tilsvare lite vekst og ●●● tilsvare god vekst. Stammer hvor ingen vekst ble påvist ved visuell vurdering er angitt med —.

Stamme	Kommersielt startfôr (6,5 g/L protein)		
	24 timer	43 timer	68 timer
<i>Pseudoalteromonas</i> RA 7-14	•	•	●●●
<i>Marinomonas</i> 3-14 D2 a	●●	●●	•
<i>Photobacterium</i> 1-12 D8	•	•	—
<i>V.anguillarum</i> HI 610	●●●	●●●	•

Tabell 26: Blanding 2 dyrket i kommersielt startfôr (6,5 g/L protein) tilsatt β -glukan (1 g/L). Bakteriestammene er angitt med vekst fra en til tre prikker, hvor • tilsvare lite vekst og ●●● tilsvare god vekst. Stammer hvor ingen vekst ble påvist ved visuell vurdering er angitt med —.

Stamme	Kommersielt startfôr (6,5 g/L protein) tilsatt β -glukan 1 g/L		
	24 timer	43 timer	68 timer
<i>Pseudoalteromonas</i> RA 7-14	•	•	•
<i>Marinomonas</i> 3-14 D2 a	●●	●●	●●
<i>Photobacterium</i> 1-12 D8	•	•	—
<i>V.anguillarum</i> HI 610	●●●	●●●	●●●

I blanding 3, som bestod av *Pseudoalteromonas* RA 7-14, *Marinomonas* 3-14 D2 a, *Photobacterium* 1-12 D8, HI 610 og naturlig flora fra torskeyngel, vokste HI 610 godt på mediene tilsatt fiskemel og hvor redusert MB var benyttet som basismedium. I mediet tilsatt ufordøyd fiskemel, 68 timer etter innokulering, gikk veksten til HI 610 ned fra god til dårlig. For *Pseudoalteromonas* RA 7-14 steg samtidig veksten fra middels til god. Den naturlige floraen fra torskeyngel vokste ikke på mediene tilsatt fiskemel, hverken fordøyd eller ufordøyd. *Marinomonas* 3-14 D2 a oppnådde ikke vekst på ufordøyd fiskemel i denne blandingen, og vokste fra middels til dårlig på fordøyd fiskemel. *Photobacterium* 1-12 D8 vokste generelt dårlig og ved det tredje uttaket, 68 timer etter innokulering, var det ikke noen

påvisbar vekst for denne stammen på noen av mediene. Rangering for vekst av stammene i blanding 3 på fiskemel, er gitt i Tabell 27 og Tabell 28.

Tabell 27: Blanding 3 dyrket i redusert MB tilsatt fordøyd fiskemel (6,5 g/L). Bakteriestammene er angitt med vekst fra en til tre prikker, hvor ● tilsvare lite vekst og ●●● tilsvare god vekst. Stammer hvor ingen vekst ble påvist ved visuell vurdering er angitt med —. Parentes tilsvare at veksten var litt dårligere enn angivelsen.

Stamme	Redusert MB tilsatt fordøyd fiskemel (6,5 g/L)		
	24 timer	43 timer	68 timer
<i>Pseudoalteromonas</i> RA 7-14	●●●	●●●	●●●
<i>Marinomonas</i> 3-14 D2 a	●	●	●(●)
<i>Photobacterium</i> 1-12 D8	●(●)	●	●
<i>V.anguillarum</i> HI 610	●●	●●	●●
Naturlig flora	—	—	—

Tabell 28: Blanding 3 dyrket i redusert MB tilsatt ufordøyd fiskemel (6,5 g/L). Bakteriestammene er angitt med vekst fra en til tre prikker, hvor ● tilsvare lite vekst og ●●● tilsvare god vekst. Stammer hvor ingen vekst ble påvist ved visuell vurdering er angitt med —. Parentes tilsvare at veksten var litt dårligere enn angivelsen.

Stamme	Redusert MB tilsatt ufordøyd fiskemel (6,5 g/L)		
	24 timer	43 timer	68 timer
<i>Pseudoalteromonas</i> RA 7-14	●●	●●●	●●●
<i>Marinomonas</i> 3-14 D2 a	—	—	—
<i>Photobacterium</i> 1-12 D8	●(●)	●	—
<i>V.anguillarum</i> HI 610	●●●	●●●	●
Naturlig flora	—	—	—

I blanding 3, på mediene med startfôr, fikk HI 610 en avtagende vekst, både med og uten tilsatt β -glukan. Størst nedgang ble observert i mediet uten tilsatt β -glukan. Samtidig som veksten til HI 610 på mediene sank, økte styrken til enkelte bånd fra den naturlige floraen. Siden den naturlige floraen bestod av flere stammer, oppnådde den flere bånd i gelen. En generell vekst av floraen var derfor vanskelig å bedømme da noen bånd økte og noen bånd minket i styrke. De probiotiske stammene vokste generelt dårlig på mediene med startfôr og veksten avtok for hvert prøveuttak. Stammene som vokste dårligst i denne blandingen var *Pseudoalteromonas* RA 7-14 og *Photobacterium* 1-12 D8. Rangering for vekst av blanding 3 på startfôr er gitt i Tabell 29 og Tabell 30.

Tabell 29: Blanding 3 dyrket i kommersielt startfôr (6,5 g/L protein). Bakteriestammene er angitt med vekst fra en til tre prikker, hvor • tilsvare lite vekst og ●●● tilsvare god vekst. Stammer hvor ingen vekst ble påvist ved visuell vurdering er angitt med —.

Stamme	Kommersielt startfôr (6,5 g/L protein)		
	24 timer	43 timer	68 timer
<i>Pseudoalteromonas</i> RA 7-14	•	•	—
<i>Marinomonas</i> 3-14 D2 a	●●	•	•
<i>Photobacterium</i> 1-12 D8	•	•	—
<i>V.anguillarum</i> HI 610	●●●	●●●	•
Naturlig flora*			

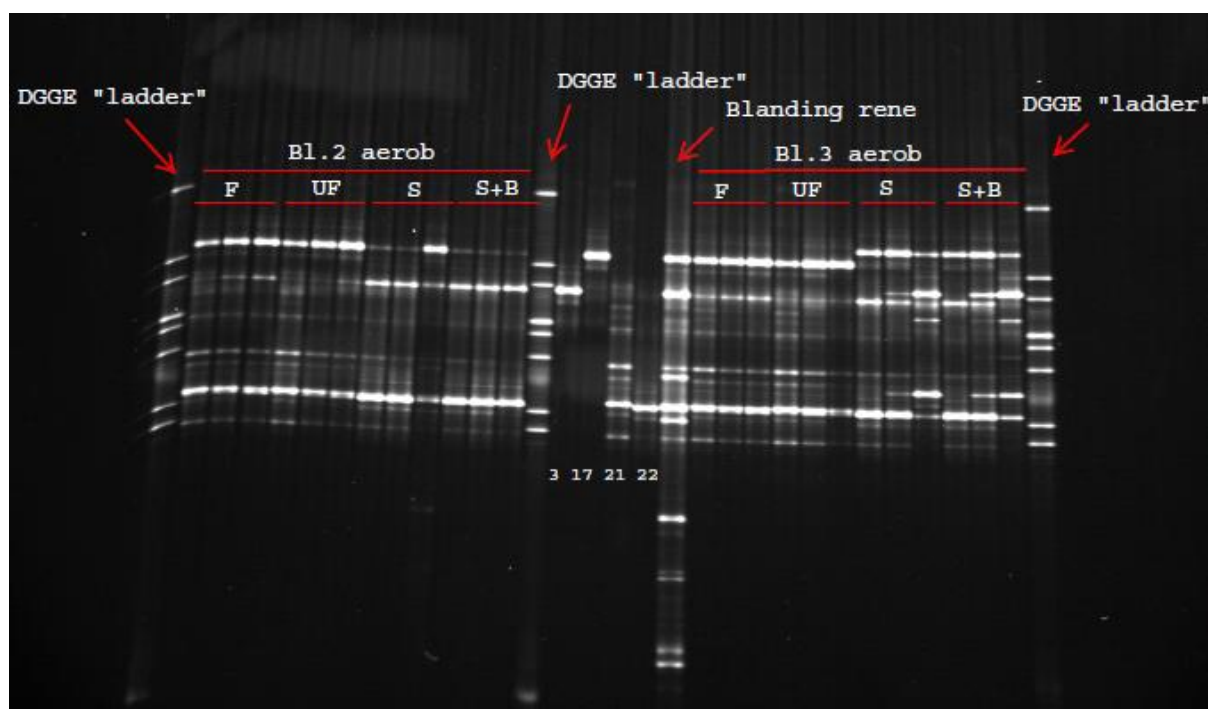
*Vekst for stammen kunne ikke vurderes generelt da den inneholdt en blanding av stammer som alle oppnådde ulike bånd i gelen. Det ble derimot observert at det dukket opp noen sterke bånd i gelen i denne blandingen ved 68 timer etter innokulering.

Tabell 30: Blanding 3 dyrket i kommersielt startfôr (6,5 g/L protein) tilsatt β -glukan (1 g/L). Bakteriestammene er angitt med vekst fra en til tre prikker, hvor • tilsvare lite vekst og ●●● tilsvare god vekst. Stammer hvor ingen vekst ble påvist ved visuell vurdering er angitt med —.

Stamme	Kommersielt startfôr (6,5 g/L protein) tilsatt β -glukan (1 g/L)		
	24 timer	43 timer	68 timer
<i>Pseudoalteromonas</i> RA 7-14	•	•	—
<i>Marinomonas</i> 3-14 D2 a	●●	●●	•
<i>Photobacterium</i> 1-12 D8	•	•	—
<i>V.anguillarum</i> HI 610	●●●	●●●	●●
Naturlig flora*			

*Vekst for stammen kunne ikke vurderes generelt da den inneholdt en blanding av stammer som alle oppnådde ulike bånd i gelen. Det ble derimot observert at det dukket opp noen sterke bånd i gelen i denne blandingen ved 68 timer etter innokulering.

Gelen som ble benyttet til å vurdere vekst av blanding 2 og 3 under aerobe vekstvilkår, er gitt i Figur 37.



Figur 37: Hovedforsøk på DGGE del 2. Av renkulturene tilsvarer prøve 3=*Marinomonas* 3-14 D2 a, prøve 17=*Pseudoalteromonas* RA 7-14, prøve 21=*Photobacterium* 1-12 D8 og prøve 22=*V.anguillarum* HI 610. Blandingen av rene stammer består av alle stammene, også de som kun var med i del 1 av gelen. Derfor er det flere bånd i blandingen som ikke kan identifiseres med de rene stammene på samme gel. Blandingen ble laget ved å blande PCR-produkt fra renkulturer.

3.10.3 Oppsummering av DGGE-analysen

Det viste seg at mediene som ga best vekst for den patogene stammen, *V.anguillarum* HI 610, var kommersielt startfôr med og uten tilsatt β -glukan. Dette var tilfelle både under aerobe og anaerobe forhold. På disse mediene var det kun den naturlige floraen som oppnådde god vekst, og under aerobe forhold økte bakteriene i denne floraen samtidig som vekst av HI 610 ble redusert. Av de potensielt probiotiske stammene var det *Marinomonas* 3-14 D2 a som oppnådde best vekst på disse mediene, og ble vurdert til å være middels god, altså ikke bedre enn HI 610. På mediene med fordøyd og ufordøyd fiskemel var det *Pseudoalteromonas* RA 7-14 som oppnådde best vekst og HI 610 som fikk dårlig vekst.

3.11 Sekvenseringsresultater

Stammene som ble påvist som forurenset (punkt 3.2), ble sendt inn til sekvensering for identifisering. Dette ble utført for å undersøke hvilke stammer som var forurensing og hvilke stammer som var den opprinnelige stammen, med større sikkerhet enn beskrivelsene fra Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Bergey et al. 2001) og mikroskopiundersøkelsen.

Sekvenseringsresultatene påviste at stammene med b-endelse, som ble antatt å være forurensing, virkelig var forurensing. De fleste påviste forurensingene ble vist å være identisk i sekvens med de originale stammene. Det viste seg også at begge *Marinomonas*-stammene (3-14 D2 a og 3-14 F8 a) fikk identisk sekvens. Sekvensering av deler av 16S rRNA-genet betyr nødvendigvis ikke at stammene er helt like. Derimot er det sannsynlig at bakterier av samme slekt kan ha like sekvenser i enkelte områder. Dette kan være årsak til at de to *Marinomonas*-stammene ble vist å ha identiske deler. Fire av de antatte forurensingene fikk identisk sekvens og viste seg å være *Microbacterium*. Dette gjaldt stamme 3-14 E9 b, stamme 3-14 D2 b, stamme 3-9 B8 b og stamme 3-7 C4 b. Stamme 3-14 E9 b og stamme 3-14 D2 b fikk også identiske bånd med *Microbacterium* 3-5 G10 ved analysing med DGGE. På bakgrunn av dette ble sekvensen til *Microbacterium* 3-5 G10 fra en tidligere sekvensering av SINTEF sammenlignet med sekvensen for de 4 stammene. Da disse resultatene og ble identisk, kan det være sannsynlig at stammene er *Microbacterium* 3-5 G10. Allikevel kan ikke dette sies med sikkerhet på bakgrunn av disse analysene. *Pseudomonas* 3-14 E9 a viste seg å være en *Pseudomonas*, noe som også ble påvist for stamme 3-14 F8 b. Disse to fikk også identisk sekvens, som kan være grunnet at begge tilhører *Pseudomonas*. Allikevel fikk ikke disse to stammene identisk sekvens med andre påviste *Pseudomonas*-stammer som ble sekvensert. Dette styrker antagelsen om at stammer med identisk sekvens etter sekvensering er en og samme stamme, men er ingen sikker påvisning. Stamme 1-8 C8 b ble etter sekvensering påvist å være *Photobacterium*, og hadde også lik sekvens som *Photobacterium* 1-12 D8.

Stammene med a-endelse, som ble antatt å være opprinnelig stamme, viste seg å være den originale stammen etter sekvensering. Antagelsene ved mikroskopering om at a-endelse var den originale og b-endelse var forurensing (punkt 3.2) viste seg dermed å være korrekt. Mest sannsynlig vil stammer som etter sekvensering ble vist å være identisk, være en og samme stamme som følge av forurensing. Allikevel kan dette ikke sies med sikkerhet. En oversikt over stammer både før og etter sekvensering er gitt i Tabell 31.

Tabell 31: Oversikt over sekvenseringsresultater for prøver som ble sendt inn. Tabellen gir en oversikt over antatt stamme før sekvensering, påvist stamme etter sekvensering, sekvenseringslikheten og eventuelle kommentarer for resultatene. Stammer som viste seg å ha identisk sekvens er markert med samme farge, og stammer som ikke har lik sekvens med andre stammer som ble sekvensert er uten fargemarkering.

Antatt stamme	Stamme etter sekvensering	Sekvenseringslikhet (%)	Kommentar
<i>Marinomonas</i> 3-14 D2 a	<i>Marinomonas</i>	100	Opprinnelig stamme
Stamme 3-14 D2 b*	<i>Microbacterium</i>	100	**
<i>Marinomonas</i> 3-14 F8 a	<i>Marinomonas</i>	100	
Stamme 3-14 F8 b*	<i>Pseudomonas</i>	100	
<i>Pseudomonas</i> 2,3-14 E9 a	<i>Pseudomonas</i>	100	Opprinnelig stamme
Stamme 3-14 E9 b*	<i>Microbacterium</i>	100	**
<i>Pseudomonas</i> 4,3-9 B8 a	<i>Pseudomonas</i>	100	Opprinnelig stamme
Stamme 3-9 B8 b*	<i>Microbacterium</i>	100	
<i>Pseudomonas</i> 1, 3-7 C4 a	<i>Pseudomonas</i>	100	Opprinnelig stamme
Stamme 3-7 C4 b*	<i>Microbacterium</i>	100	
<i>Shewanella</i> 1-8 C8 a	<i>Shewanella</i>	100	Opprinnelig stamme
Stamme 1-8 C8 b*	<i>Photobacterium</i>	100	Antas å være samme som <i>Photobacterium</i> 1-12 D8
Stamme 3-5 F9 b*	<i>Myroides</i>	100	Tilhører familien <i>Flavobacteriaceae</i>

*Stammen ble antatt å være forurensing

**Stammen fikk identisk bånd med *Microbacterium* 3-5 G10 ved analysering av renkulturer med DGGE.

4 Diskusjon

I denne oppgaven ble isolater av potensielle bakterier for bruk som probiotika til torskelarver karakterisert. Bakteriestammene hadde to ulike opprinnelser; stammer fra en samling fra SINTEF, isolert fra torskeyngel, og 4 stammer fra Anders J. Fjellheims doktoravhandling; "Selection and administration of probiotic bacteria to marine fish larvae" (Fjellheim 2006), som var lovende som probiotika. Bakteriestammene ble karakterisert med hensyn på aerob og anaerob vekst på karbonkilder og ulike prebiotiske substrat, undersøkt for eventuelle negative egenskaper som hemolyse og patogenitet mot torskelarver, og evne til å hemme den patogene *V. anguillarum* HI 610 under ulike vekstvilkår. Evne til å hemme HI 610 ble også undersøkt for blandingskulturer av de mest lovende stammene.

4.1 Vurdering av forsøkene

Til flere forsøk ble det i denne oppgaven benyttet sterile sentrifugerør med tilhørende skrukork. Generelt for disse forsøkene ble det ikke skapt 100 % aerobe betingelser. Rørene ble inkubert liggende i risteskap og ristingen førte da til at mediet skvulpet frem og tilbake i rørene, og ble ikke rotert rundt. Dette kan tenkes å føre til anaerobe områder i mediet, og derav dannelse av fermenteringsprodukt. Sentrifugerør ble benyttet i denne oppgaven da stammene vokste godt, i tillegg til at de krevde lite medium og tok mindre plass enn vanlige ristekolber.

Produkter som kun dannes ved anaerobe forhold, eksempelvis maursyre, ble påvist ved aerob dyrkning i sentrifugerør. Maursyre ble påvist hos stammer som hadde evne til fermentativ metabolisme, og kan dermed skyldes årsakene nevnt over med anaerobe områder i mediet. Acetat, som er et fermenteringsprodukt, ble også påvist i prøvene som var dyrket aerobt. Acetat er allikevel et vanlig produkt da det kan dannes ved ufullstendig aerob vekst fra acetyl-CoA i et enkelt steg (Berg et al. 2007). For å oppnå mer aerobe betingelser kunne en bedre sirkulering vært skapt ved eksempelvis å ha rørene på "rørsnurrer", eller det kunne ha vært benyttet ristekolber, som er vanlig ved aerob dyrkning. Et annet alternativ kunne vært å benytte erlendmeyerkolber med et volum på 50 ml på magnetplate. Dette alternativet ville opprettholdt volumet av medium og den lille okkuperingen av plass, samtidig som en bedre sirkulasjon kunne vært oppnådd.

For forsøkene i Hungate-rør, som ikke ble laget til anaerobt, følger en viss usikkerhet i resultatene grunnet at det da vil være oksygen tilstede i rørene. Oksygenet kan være med på å gi gode vekstvilkår for bakteriene frem til det brukes opp. Dette kan gi falske resultater i

begynnelsen av forsøksperioden da bakteriene fortsatt har oksygen å vokse på. Dette ble observert ved toppen tidlig i vekstkurvene for noen av stammene i mediet tilsatt glukose, men som fikk en rask nedgang. Stammene som fikk et slikt toppunkt på glukose hadde best evne til å utnytte aminosyrer under aerobe forhold. At det ikke ble observert en slik topp på aminosyrer, kan ha en sammenheng med at forkulturen var tilsatt glukose, og at stammene dermed var bedre adaptert til å vokse på glukose ved innokulering. Veksten på aminosyrer så ut til å ha en jevnere stigning, og det kan derfor tenkes at det tar lengre tid å omstille seg til aminosyrer etter forkultur med glukose. En topp på mediet tilsatt glukose kan også ses på de aerobe vekstkurvene for stammene hvor dette ble påvist anaerobt (se Vedlegg D for eksempel). Denne tendensen ble kun sett i første pulje av stammer som ble undersøkt, og det kan derfor tenkes at påvirkningen kan ha en sammenheng med glukoseløsningen som ble benyttet. Dette forsøket ble for disse stammene utført en stund før de andre stammene, og det ble derfor laget nye løsninger til de resterende forsøkene. Dette kan ha ført til at årsaken ble fjernet og dermed ikke ble observert for andre stammer.

Ved dyrkning i Millipore-plater med filterinnsatser og separate reservoar, ble det observert en forskjell i OD for stammene dyrket på innsiden i forhold til utsiden av filteret. Dette skal ikke ha noe å si, men allikevel så det ut til å ha en viss innvirkning på resultatet. Særlig da stammer begynte å danne en slimaktig konsistens ved dyrkning på innsiden av filteret. Dette kan tenkes å skyldes at noen stammer lager polymerer i forbindelse med filteret. Det kan også være mulig at filteret er lett å festes til for bakteriene slik at de kan danne biofilm, i forhold til hva plastikk gjør. I dette tilfellet ble det ikke mulig å få høy risting på platene når det førte til at mediet lett skvulpet over. Bedre risting kunne muligens hatt innvirkning på dannelsen av den slimaktige konsistensen. Dyrkning i Millipore-plater for å undersøke hemming ga i denne oppgaven kun mulighet for å undersøke konkurranse mellom stammene. Komponenter med inhiberende effekt produsert fra stammene, utenom organiske syrer som fermenteringsprodukt, ble ikke undersøkt ved denne dyrkningsmetoden.

Analysering av blandingskulturer ved DGGE ble vurdert visuelt ut ifra styrken på båndene. For å få en mer eksakt styrke på båndene til de ulike bakteriestammene kunne det vært benyttet programmer som er laget for analysering av DGGE. Eksempelvis er Gel2k (Svein Norland, Institutt for Biologi, Universitetet i Bergen) et program som kunne vært benyttet.

For noen stammer i renkultur ble det i gelen observert 2 bånd. Dette er vanlig ved DGGE og ingen sikker forklaring på dette eksisterer. Det kan derimot tenkes at sekundærstrukturer er

årsaken, eller at det forekommer ulike sekvenser i genkopier. Særlig kan dette forekomme i V3 regionen, som er veldig variabel (Ingrid Bakke, personlig kommunikasjon, april 2011).

Den patogene *V. anguillarum* HI 610 og *Photobacterium* 1-12 D8 ble vist å ha relativt like bånd i gelen, og det var dermed vanskelig å skille stammene når de ble dyrket i blanding. For dette tilfellet kunne analysering ved real-time PCR vært mer nyttig. Real-time PCR gir muligheten til å følge kvantitativ mengde av hver stamme, men dette er tidkrevende da det innebærer at det må designes spesifikke primere for hver stamme som undersøkes. Denne metoden kunne vært et alternativ for å utvide forsøket.

Hemming av den patogene HI 610 ble i denne oppgaven utført i flytende medium. Det er vanlig å undersøke hemming *in vitro* i fast medium (agarplater), og det finnes 4 metoder som vanligvis benyttes. Metodene er "the double layer method", "the well diffusion method", "the cross-streak method", og "the disc diffusion method" (Kesarcodi-Watson et al. 2008). "The double layer method" involverer at organismer som skal undersøkes podes ut på en agarplate, og videre tilføres et nytt lag med agar som inneholder organismen man ønsker å undersøke mot. "The well diffusion method" involverer at organismen man ønsker å undersøke podes ut på agarplate, og deretter stikkes det ut brønner i platen hvor organismen man vil undersøke mot tilsettes i flytende medium. "The cross-streak method" involverer at man lager en strek midt på en agarplate med organismen man ønsker å undersøke. Deretter inkuberes platen før organismen man ønsker å undersøke mot tilføres platen med en strek i 90 ° vinkel fra streken til den tidligere påførte organismen. "The disc diffusion method" involverer at organismen man ønsker å undersøke hemming mot tilføres i flytende medium over en hel agarplate og overskuddet helles av. Deretter blir runde papirbiter som er dyppet i kultur fra organismen man ønsker å undersøke plassert på agarplaten. Med alle disse metodene måler man hemming ut i fra hemmesoner som oppstår mellom bakteriekoloniene. Jo større hemmesone, jo bedre hemming. "Well diffusion method" er en vanlig metode og har blitt benyttet i flere forsøk (Fjellheim et al. 2010; Grossart et al. 2004; Hjelm et al. 2004; Long og Azam 2001; Makridis et al. 2005). Bruk av slike metoder i denne oppgaven kunne gitt en bedre indikasjon på om stammene hemmet, eller om det var mediets sammensetning som førte til resultatene.

4.2 Undersøkelser av enkeltstammer

Forurensingen som ble funnet blant bakteriestammene i denne oppgaven, ble antatt å være marine bakterier som et resultat av dårlig isolering av enkeltstammer. På bakgrunn av dette ble stammer som var antatt å være forurensing inkludert i oppgaven, og ble ikke sendt inn til

sekvensering før på slutten av oppgaven. Etter sekvensering ble flere stammer vist å være identisk i deler av 16S rRNA- genet, og det ville derfor tenkes at disse stammene hadde oppnådd sammenlignbare resultater gjennom oppgaven. Dette behandles nærmere underveis i diskusjonen.

4.2.1 Vekst på karbonkilder

Stammene fra SINTEF sin samling ble først dyrket både under aerobe og anaerobe forhold på ulike karbonkilder for å få en generell karakterisering med hensyn på forskjeller og likheter mellom stammene. Karbonkildene som ble benyttet var glukose for å undersøke evne til å utnytte karbohydrater, og alanin og natriumglutamat for å undersøke evne til å utnytte aminosyrer. Marine fisk i oppdrett føres med proteinrikt fôr som har et lavt innhold av karbohydrater, mens de fleste prebiotika som tilsettes er karbohydrater. Bakteriestammer som har best evne til å utnytte aminosyrer som C-kilde kan tenkes å ha liten effekt av karbohydratbaserte prebiotika, og stammer som har best evne til å utnytte kabohyrater som C-kilde kan tenkes å ha god effekt av karbohydratbaserte prebiotika.

Karbonkildene ble tilsatt i samme konsentrasjon (9 g/L) og hadde relativt likt innhold av C-kilde (alanin 40 %, natriumglutamat 35 % og glukose 40 %). Det kan derfor antas at det vil være mulig å sammenligne utnyttelse av karbonkildene mellom stammene ut ifra målt OD.

For stammer som viste seg å ha god evne til å utnytte både glukose og aminosyrer, kan det tenkes at god vekst vil kunne oppnås både på proteinrikt fôr (aminosyrer) og prebiotiske tilsetninger (karbohydrater). Stammer som hadde best evne til å utnytte enten glukose eller aminosyrer, oppnådde høy OD også på den karbonkilden som ikke så ut til å være lettest å utnytte (se Vedlegg B for høyeste OD på karbonkildene for alle stammene). Det kan derfor tenkes at også for disse stammene vil god vekst kunne oppnås både på proteinrikt fôr og karbohydratbaserte prebiotika. Derimot kan det tenkes at stammer som har best evne til å utnytte glukose, og dermed karbohydrater, oppnår bedre vekstvilkår når karbohydratbaserte prebiotika tilsettes. Dette kan gi stammene en fordel slik at de kan ha større sjanse for å dominere. Motsatt kan det tenkes at når karbohydratbaserte prebiotika tilsettes, vil stammer som har best evne til å utnytte aminosyrer få dårligere vekstvilkår og kan tenkes å undertrykkes.

4.2.2 Vekst på prebiotiske substrat

Tilsats av prebiotiske substrat favoriserer vekst av gunstige eller probiotiske bakterier, samtidig som det kan dannes ugunstige miljø for patogene stammer. Potensielle prebiotiske substrat som ble undersøkt for stammene var alginat, β -glukan, inulin og laminaran. Kun to av stammene viste seg å oppnå vekst på substratene, og kan tenkes å dra nytte av disse prebiotiske tilsetningene. *Pseudoalteromonas* RA 7-14 fra de 4 potensielle stammene og *Marinomonas* 3-14 D2 a fra SINTEF sin samling ble vist å vokse på henholdsvis β -glukan og laminaran, og alginat og β -glukan. Inulin er et av de vanligste prebiotiske substratene som benyttes til fisk nå til dags (Ringø et al. 2010), men ble ikke vist å gi god vekst for noen av stammene i denne oppgaven.

Det må ved denne undersøkelsen tas forbehold om at veksten for enkelte av stammene ble dårlig på alle substratene. Generelt lavere OD var forventet da analyseringen ble utført i brønnplate, som gir 1,5 ganger mindre OD enn i kyvette (punkt 2.5.2). Derimot da stammene ble undersøkt i kyvette på karbonkilder tidligere, som inkluderte glukose, ble det oppnådd høyere OD. Glukose ble inkludert i dette forsøket og kan dermed benyttes til sammenligning. Det kan derfor tenkes at en del av stammene kan ha bedre evne til å vokse på de prebiotiske substratene.

De patogene stammene som ble undersøkt så ikke ut til å vokse godt på de prebiotiske tilsetningene. Substratene som ble undersøkt kan dermed være aktuelle for å gi ugunstige forhold for disse patogene stammene. Veksten for de fleste stammene ble bedre på glukose enn de prebiotiske tilsetningene i dette forsøket, og det kan derfor se ut til at det er stor forskjell i vekst på ulike karbohydrater. Tanken om at karbohydratbaserte prebiotika passer bedre til stammer som har best evne til å utnytte glukose som karbonkilde, stemmer dermed nødvendigvis ikke. Eksempelvis hadde *Marinomonas* 3-14 D2 a best evne til å utnytte aminosyrer fremfor glukose ved undersøkelse av karbonkilder, men ved undersøkelse av de prebiotiske substratene, ga disse høyere OD enn glukose. Dårlig vekst på stammer som krevde Brain Heart Infusion (BHI) som medium burde vært undersøkt for vekst på de prebiotiske substratene med BHI som basismedium. Dette ble ikke utført, og en vurdering for disse stammene på de prebiotiske substratene ble da ikke påvist. Det blir derfor en mangel på karakterisering for disse stammene.

4.2.3 Undersøkelser for negative egenskaper

Eventuelle negative egenskaper for potensielt probiotiske stammer er viktig å undersøke for å utelukke skadelige bakterier. Hemolytiske egenskaper ble ikke påvist for noen av stammene som ble undersøkt i denne oppgaven. Begge *Vibrio*-stammene som ble undersøkt vokste ikke på blodagarplatene og ble dermed ikke undersøkt for hemolytisk aktivitet. Disse to stammene var generelt vanskelig å dyrke gjennom oppgaven, og blodagarplater med andre tilsetninger kan derfor være nødvendig. I denne oppgaven ble okseblod benyttet i blodagarplatene. Tidligere har det blitt vist at hemolytisk aktivitet blant bakterier kan uttrykkes forskjellig avhengig av hvilken organisme blodet er fra (Austin et al. 2005). Det kan derfor tenkes at bruk av fiskeblod istedenfor okseblod kunne gi andre resultater. Eventuelt kan det tenkes at stammene i denne oppgaven ikke påvirkes av hvilken organisme blodet stammer fra.

Tidligere har det blitt vist at hemolytiske bakterier er forbundet med levende fôr (Olsen et al. 1999), som fisk livnærer seg på ved larvestadiet. Etter overgangen til startfôr blir ikke dette et problem lengre og hemolytiske stammer kan eventuelt vaskes ut. Bakteriene som ble undersøkt i denne oppgaven var isolert fra torskeyngel, som føres med startfôr. Det kan derfor tenkes at det var mindre sannsynlig å finne hemolytiske bakterier blant disse stammene. I et lignende forsøk ble det påvist hemolytiske bakterier fra stammer isolert fra torskelarver (Fjellheim et al. 2010), og dette kan støtte opp om at hemolytiske bakterier i større grad er å finne på larvestadiet.

Ved *in vivo* undersøkelse for patogenitet av bakteriestammene mot torskelarver ble ingen av bakteriestammene vist å være patogene, til sammenligning med den negative kontrollen *V. anguillarum* HI 610. Larvene i den negative kontrollen fikk stor nedgang i overlevelse på dag 3 etter klekking, som kan sammenlignes med Anders J. Fjellheim sitt forsøk (Fjellheim et al. 2010), hvor larvene døde på dette tidspunkt ved tilsats av den samme negative kontrollen.

Adhesjon til mukus er relatert til patogene stammers virulens (punkt 1.2.4), men også probiotiske stammer bør ha evne til å adhere til mukus for å kunne etableres og oppholde seg i tarmen. Ved at stammene i denne oppgaven var valgt ut ifra et kriterium om adhesjon til mukus (punkt 2.1.1), risikerte man også å få inkludert patogene stammer. Som sagt ble ingen av stammene påvist å være patogene for torskelarvene. Stammene som ble undersøkt mot torskelarvene ble i et forsøk utført av SINTEF påvist å ha evne til å danne biofilm (SINTEF Fiskeri og havbruk, upubliserte resultater). Dette kan tyde på god evne for mukusadhesjon, og at stammene i tillegg ikke ble vist å være patogene er positivt.

Undersøkelse for eventuelle probiotiske egenskaper ble undersøkt ved sammenligning med den positive kontrollen. De siste dagene av forsøket viste det seg at % overlevelse av torskelarver var høyere på en del av stammene i forhold til den positive kontrollen. Det kan dermed se ut til at disse stammene kunne ha probiotisk effekt. Derimot må det tas med i betraktning at torskelarvene ikke ble fôret under forsøket, og at larvene dermed kan ha benyttet bakteriene som næring. Det har blitt vist at rekellarver levde lengre når de ble fôret kun på bakterier (Thompson et al. 1999). Selv om overlevelse var høyere på enkelte stammer de siste dagene, døde larvene på forventet dag når de ikke fôres (14 dager etter klekking). Larvene har da ikke mer næring fra plommesekken å livnære seg på, og ville dermed dø av sult.

Stammen *Shewanella* 1-8 C8 a viste seg å ha negativ effekt når det gjaldt klekking av eggene. Denne stammen ga lavest klekking (65 %), og hadde også lavere klekking enn den negative kontrollen (86 %). Prosent klekkede egg kan være tilfeldig da eggene plasseres tilfeldig i brønnene, men denne stammen utmerket seg med et særdeles høyt antall egg som ikke klekket på alle parallellene. Det så allikevel ikke ut til at stammen var patogen for torskelarvene når overlevelse resten av forsøksperioden ble holdt stabil.

Torskeeggene ble i forsøket desinfisert to ganger med glutaraldehyd. Vanligvis blir eggene desinfisert en gang, når de legges inn i klekkeinkubatorene. Siden eggene ble tatt ut fra inkubatoren etter noen dager, var det nødvendig å desinfisere på nytt for å være sikker på at eggene ikke var dekket av andre bakterier som kunne påvirke forsøket. Det så ut til at eggene tålte å desinfiseres to ganger, men det kan tenkes at det har påvirket klekkingen. Dobbelt desinfisering med glutaraldehyd har vist å gi mindre klekking en enkel desinfisering (Forberg et al. 2011). Tidligere ble det i et lignende forsøk med enkel desinfisering vist en overlevelse på 86-100 % klekking for bakteriestammene (Fjellheim et al. 2010), som er høyere andel enn dette forsøket (65 – 94 %). En klekking på 92,9 % for marine fisk har blitt oppgitt etter behandling med glutaraldehyd 400 ppm i 10 minutter (Salvesen og Vadstein 1995), samme behandling som ble benyttet i denne oppgaven. Bare 4 av stammene som ble undersøkt i denne oppgaven hadde en klekking > 90 % (Figur 21 punkt 3.6).

4.2.4 Hemmeforsøk

I brønnplate

Pseudoalteromonas RA 7-14 ble undersøkt for evne til å hemme de to patogene stammene; *V. anguillarum* HI 610 og *Marinomonas* sp. Dette ble utført på fôringredienser som var fordøyd

og ufordøyd fiskemel, i tillegg til Artemia, som er en saltvannsreke. Hemming av de patogene stammene så ikke ut til å være tilfelle når dette forsøket viste at de patogene stammene generelt vokste dårlig på fôringrediensene, både i renkultur og i blandingskultur. Ufordøyd fiskemel inneholdt komponenter som fordøyes av vertsorganismen og vil dermed ikke fungere som vekstsubstrat for bakteriene. Dersom veksten for stammene hadde blitt best på ufordøyd fiskemel i forhold til fordøyd fiskemel, ville dette kunne antyde at vekstsubstratene for bakteriene bare finnes i fôret før det har blitt tilsatt torskelarvene. Dermed ville de ikke ført til gode vekstforhold for bakteriene i torskelarvene.

I dette forsøket ble derimot veksten best for RA 7-14 på det fordøyde fiskemelet. Det fordøyde fiskemelet inneholder teoretisk ikke komponenter som ikke finnes i det ufordøyde. Heller er komponenter fjernet i det fordøyde fiskemelet som følge av fordøyelsesprosessen. Veksten kan da være et resultat av at dialyseringen ikke har fjernet alle lavmolekylære komponenter, som dermed har blitt lettere tilgjengelig etter behandlingen med fordøyelsesenzymmer. Da fordøyelsesprosessen ikke ble utført naturlig kan dette føre til at resultatene ikke blir like optimal som ved naturlig fordøyelse.

Artemia som vekstsubstrat var også fordøyd og ga en generelt dårlig vekst for alle stammene i forsøket. Artemia benyttes som levende fôr når larvene er 4 uker. Hjuldyr (rotatorier) benyttes som fôr før Artemia, og dyrkes i store mengder. Artemia må derimot kjøpes som innkapslede egg (cyster) som høstes fra saltsjøer. Mengden cyster som høstes inn varierer, noe som videre fører til store variasjoner i prisen for Artemia (Karlsen og Meeren 2003). Man ønsker derfor å redusere bruken av Artemia. Vekst for stammene på Artemia blir av liten betydning dersom Artemia fjernes som fôr.

Brønnplate med filterinnsatser og felles reservoar

De 4 potensielt probiotiske stammene fra Anders J. Fjellheims doktoravhandling (Fjellheim 2006) sammen med de to patogene stammene *V. anguillarum* HI 610 og *Marinomonas sp.*, ble undersøkt for evne til å hemme eller stimulere veksten til hverandre. Størst forskjell mellom dyrkning i medium separert med filter, i forhold til kontrollplaten, ble oppnådd for *Pseudoalteromonas* RA 7-14 og *Vibrio gallicus* RD 5-30, etterfulgt av den patogene *Marinomonas sp.* Endringer i vekst kan skyldes at mer medium ble tilgjengelig i filterplaten hvor et felles reservoar var fylt med 20 ml medium utenfor brønnene. Stammene med høyest OD i filterplaten kan tenkes å være stammer som raskest utnytter næringen fra mediet. God evne til å hemme de patogene stammene kunne tenkes å være tilfelle dersom de potensielt

probiotiske stammene var de raskeste til å utnytte mediet. Dette ble ikke oppnådd da den patogene *Marinomonas sp.* var en av stammene med evne til rask utnyttelse. Om stammene ble stimulert eller hemmet av komponenter produsert under vekst er vanskelig å si. For å undersøke dette måtte andre dyrkningsmåter vært utført. Eksempelvis har evne til hemming av en *Vibrio* i flytende medium blitt utført i et forsøk (Makridis et al. 2005) etter en metode av Gram, Melchiorson, Spanggaard, Huber og Nielsen (Gram et al. 1999). Metoden ble basert på at supernatanten etter sentrifugering av kulturer med potensielle bakterier, tilsettes i en 96-brønnsplate sammen med kultur av den patogene stammen som ønskes å hemmes. Denne metoden kunne vært aktuell for å påvise hvilke av stammene som hemmet eller stimulerte hverandre.

Brønnplate med filterinnsatser og separate reservoar

Ved undersøkelse for evne av enkeltstammer til å hemme HI 610, var det *Pseudoalteromonas* RA 7-14, *Marinomonas* 3-14 D2 a, stamme 3-14 D2 b, *Shewanella* 1-2 D6, *Photobacterium* 1-12 D8, stamme 3-14 E9 b og *Microbacterium* 3-5 G10 som viste størst hemming ved dyrkning i proteinrikt medium (MB 2216).

RA 7-14 har tidligere blitt påvist å være antagonistisk mot HI 610 ved dyrkning på agarplater hvor hemmesoner undersøkes (Fjellheim et al. 2010), men sonene ble vist å være litt utydelige. Allikevel er det studier hvor flere stammer av *Pseudoalteromonas* har vist seg å ha antibakterielle egenskaper (Holmström et al. 2002; McCarthy et al. 1994), noe som kan tyde på at stammen er godt egnet for hemming. *Marinomonas* 3-14 D2 a ble vist i forsøkene utført av SINTEF (punkt 2.1.1) å vise antagonisme mot HI 610, utført på agarplater av MB 2216. Da SINTEF utførte disse forsøkene var 3-14 D2 a forurenset med en stamme som etter sekvenseringen ble vist å være *Microbacterium*. Dette fører til en usikkerhet angående om hemmingen påvist av SINTEF skyldes *Marinomonas* eller *Microbacterium*. Allikevel ble det i dette forsøket påvist at HI 610 hemmes i flytende medium med begge disse stammene.

Shewanella 1-2 D6 ble i dette forsøket vist å hemme HI 610 i flytende MB 2216, og har tidligere bare vist å hemme *Marinomonas sp.*, utført av SINTEF på agarplate av MB 2216. Hemming i fast medium (agarplate) kan dermed tenkes å gi andre resultater enn flytende medium. Stammer av *Shewanella* har i et forsøk med undersøkelse av hemming mot gram-negative og gram-positive bakterier vist seg å ha evne til hemming (Ivanova et al. 2003), og tyder på at dette kan tenkes å være en egenskap for stammen som ble undersøkt i denne oppgaven.

Microbacterium 3-5 G10 viste seg å hemme HI 610 og har tidligere vist seg å bare hemme *Marinomonas* sp. på agarplate, utført av SINTEF. Dette kan derfor også gi antydning til forskjell mellom fast og flytende medium med hensyn på hemming. *Photobacterium* 1-12 D8 viste hemming av HI 610 også i det glukoserike mediet (reduisert MB tilsatt glukose). Hemming i det glukoserike mediet ble også vist for *Marinomonas* 3-14 D2 a og *Vibrio* 1-1 D8. 1-1 D8 ble i renkultur tidligere vist å oppnå høyest OD på aminosyrer fremfor glukose, men i dette forsøket ble veksten best i det glukoserike mediet. Denne stammen har gjennom hele oppgaven vært vanskelig å dyrke og har stoppet å vokse flere ganger. Dette kan være årsak til at resultatene for denne stammen ikke blir reproducerbar. Flere stammer av *Vibrio* har allikevel vist å inhibere vekst av HI 610 (Wietz et al. 2010), slik at en nærmere undersøkelse av stammen kan være aktuell.

HI 610 vokste generelt bedre i mediet tilsatt glukose, både i renkultur og delt medium, noe som tidligere i oppgaven også ble påvist (punkt 3.4). Det kan se ut som at det er få stammer som klarer å hemme HI 610 i medier hvor den har påvist god vekst i renkultur.

Selv om både *Photobacterium* 1-12 D8 og *Marinomonas* 3-14 D2 a så ut til å hemme HI 610 i begge mediene, ble veksten for de to stammene dårligst i det glukoserike mediet. Begge disse stammene ble vist å få høyest OD på natriumglutamat, og dermed aminosyrer, ved undersøkelse av karbonkilder. Dette kan være årsaken til at veksten for disse stammene ble best på det proteinrike mediet, i forhold til det glukoserike mediet hvor proteininnholdet var redusert. Andre stammer fikk også påvist dårligere vekst i det glukoserike mediet i forhold til det proteinrike. I disse tilfellene økte også veksten av HI 610, noe som kan forklare nedgangen i vekst for stammene.

Da veksten til HI 610 ble holdt hemmet i delt medium med både *Photobacterium* 1-12 D8 og *Marinomonas* 3-14 D2, kan det tyde på at de på en eller annen måte hemmer veksten av HI 610. Særlig da veksten til HI 610 ble hemmet når stammene selv vokste dårlig. Hemmingen kan tenkes å skyldes andre årsaker enn konkurranse for karbonkilder da stammene foretrekker ulike kilder. Fermenteringsprodukt ble analysert for stammene og det ble ikke funnet organiske syrer som varierte mellom renkultur og delt medium for noen av stammene i dette forsøket. Det kan derfor tenkes at hemmingen kan skyldes produksjon av andre komponenter som antibiotika, bakteriosiner, sideroforer, lysozymer, proteaser og/eller hydrogen peroxid (punkt 1.2.4).

En stamme av *Marinomonas*; *Marinomonas mediterranea*, har tidligere blitt vist å syntetisere et antibakterielt protein, marinocine, som har vist seg å ha antibakteriell aktivitet både mot gram-positive og gram-negative bakterier, og vise betydelig resistens mot mange hydrolytiske enzymer (Lucas-Elio et al. 2005). En stamme av *Photobacterium*; *Photobacterium halotolerans* har tidligere blitt vist å inhibere den patogene *V. anguillarum* ved å produsere en antibakteriell komponent kalt holomycin, et antibiotikum som forstyrrer RNA syntese. Det studiet var det første som påviste produksjon av dette antibiotikumet i en gram-negative heterotrof bakterie (Wietz et al. 2010). Det kan derfor tenkes at *Marinomonas* og *Photobacterium* som ble undersøkt i denne oppgaven også kan ha evne til å produsere antibakterielle komponenter. Dette ble ikke undersøkt i denne oppgaven, og dermed blir det kun antagelser angående dette.

Når *Pseudoalteromonas* RA 7-14 og *Shewanella* 1-2 D6 ble dyrket i det glukoserike mediet, vokste stammene dårligere og veksten for HI 610 økte. Allikevel var HI 610 fortsatt hemmet i forhold til vekst i renkultur. RA 7-14 var imidlertid den stammen som oppnådde størst nedgang i vekst fra det proteinrike til det glukoserike mediet. 1-2 D6 oppnådde bare en liten nedgang. Ved undersøkelse av vekst på karbonkildene fikk 1-2 D6 ikke påvist stor forskjell mellom vekst på glukose og natriumglutamat, henholdsvis 1,7 i OD på glukose og 2,3 i OD på natriumglutamat (Vedlegg B). Noe som dermed kan forklare den lille nedgangen i vekst fra det proteinrike til det glukoserike mediet. RA 7-14 er ikke testet for vekst på aminosyrer, kun for vekst på glukose, og en sammenligning fra tidligere undersøkelser kan dermed ikke utføres for denne stammen.

Stamme 3-14 D2 b, stamme 3-14 E9 b og stamme 3-9 B8 b ble vist å være identisk etter sekvensering og å være *Microbacterium*. Selv om sekvensering av deler av 16S rRNA-genet viser seg å være identisk for stammer, trenger ikke dette å bety at de vil være like. Derimot kan det tenkes at egenskapene blir relativt like, noe som ble vist for disse stamme ved undersøkelse på karbonkilder. I det forsøket ble vekstkurvene like for stammene, men ved undersøkelse for hemming av stammene, ble det oppnådd ulike resultater. Det så ut til at 3 av stammene var omtrentlig lik, men at en av stammene skilte seg ut. Det viste seg å ikke være samme stamme som skilte seg ut. Stamme 3-9 B8 b skilte seg ut i det proteinrike mediet og stamme 3-14 E9 b skilte seg ut i det glukoserike mediet. Dersom stammene er den samme, kan det tenkes at forskjellene i vekst skyldes forstyrrelser. Særlig da det ble tilført nytt medium til brønnene ved prøveuttak 2 og 4.

Ved dyrkning i BHI tilsatt NaCl ble det ikke påvist noen særlig stor forskjell i vekst for HI 610 i renkultur i forhold til vekst i delt medium. Det ble allikevel en liten økning i vekst i delt medium med stamme 3-5 F9 b i forhold til renkultur. Denne forskjellen var allikevel så liten at den sannsynligvis ikke skyldes at 3-5 F9 b stimulerer vekst av HI 610. Det kan heller tenkes at stammene ikke påvirker hverandre. Denne stammen ble etter sekvensering vist å være *Myroides* og tilhøre familien *Flavobacteriaceae*. 4 stammer av *Flavobacterium* har vist seg å ha antibakteriell aktivitet ved dyrkning i fast medium (agarplate) (Zheng et al. 2005). Det kan dermed tenkes at *Flavobacterium* kan være en interessant stamme å undersøke med hensyn på probiotisk effekt, selv om ikke stammen som ble undersøkt i denne oppgaven ble vist å ha noen effekt. *Vibrio* 1-2 D12 så derimot ut til å ha evne til å hemme HI 610 i BHI. Flere stammer av *Vibrio* har som tidligere nevnt blitt vist å hemme HI 610 (Wietz et al. 2010). Veksten for 1-2 D12 økte fra renkultur til delt medium, og kan dermed tyde på at stammen ble stimulert av HI 610. Det kan også tenkes at økningen i vekst skyldes at 1-2 D12 "vinner" i en eventuell konkurranse for næring mellom disse stammene.

Under anaerobe forhold var veksten for HI 610 best, og så ut til å være bedre i delt medium enn i renkultur. Det så derfor ikke ut til at noen av stammene hemmet HI 610 under anaerobe forhold. Dette kan tenkes å skyldes at stammene generelt vokser dårlig under anaerobe forhold og at HI 610, som vokser godt i delt medium, har blitt stimulert av stammene. *Photobacterium* 1-12 D8 var eneste stamme i MB-mediene som oppnådde bedre vekst i delt medium med HI 610, enn i renkultur. *Photobacterium* 1-12 D8 og HI 610 omsatte all glukosen i mediet i renkultur, men i delt medium ble bare 5,7 av 6,5 g/L glukose omsatt (Tabell 14 i punkt 3.9.3). Det kan dermed tyde på at stammene har konkurrert om den tilgjengelige glukosen, og at ingen av stammene har klart å utnytte all glukosen. Det kan tenkes at når stammene vokser i delt medium blir det en konkurranse mellom stammene som blir ufordelaktig for begge (James et al. 1995). En annen mulighet kan tenkes å være at begge stammene produserer noe som hemmer den andre.

4.3 Undersøkelse av blandingskulturer

Stammene som hadde best evne til å hemme HI 610 enkeltvis, så ikke ut til å hemme HI 610 i blandingskulturer. På mediene med fiskemel så det ikke ut til at det oppstod noen endring i vekst for HI 610 mellom de ulike blandingsene, og *Pseudoalteromonas* RA 7-14 var den av de probiotiske stammene som vokste best. Som vist tidligere var veksten for HI 610 dårlig på fiskemel, og veksten for RA 7-14 var god (punkt 3.7). Det så heller ikke ut til at veksten til HI 610 kunne skyldes hemming, da ingen av de andre stammene så ut til å vokse noe særlig. Om

veksten til stammene generelt var dårlig på fiskemel, eller om de ble hemmet, var vanskelig å vurdere da de ikke var dyrket i renkultur på mediene.

På redusert MB uten tilsetning ble veksten for stammene mye lik veksten på fiskemelene, med unntak av *Marinomonas* 3-14 D2 a som fikk bedre vekst uten fiskemel. Det kan derfor tenkes at det var fiskemelet som var årsaken til dårlig vekst for denne stammen.

Både *Pseudoalteromonas* RA 7-14, *Marinomonas* 3-14 D2 a, *Shewanella* 1-2 D6, stamme 3-14 E9 b og *Photobacterium* 1-12 D8 vokste godt og hemmet HI 610 i proteinrikt medium som enkeltstammer. At de ikke fikk god vekst i blandingskultur kan da tenkes å skyldes at mediet var redusert for protein. Stammene vokser godt på aminosyrer (protein) og når mengden reduseres, i tillegg til at alle stammene har samme karbonkilde, kan det tenkes at det blir dårlige vekstvilkår for stammene.

Vibrio 1-2 D12 trengte BHI som medium for å vokse og kan tenkes å være årsaken til dårlig vekst for denne stammen i blandingskultur. I blanding med alle stammene var det vanskelig å vurdere veksten til *Shewanella* 1-2 D6 og stamme 3-14 E9 b på fiskemel og redusert MB uten tilsetning. Dette fordi at båndene til stammene befant seg i et område av gelen som var dårlig. Allikevel kan det antas at det kunne vært antydning til sterkere bånd dersom det hadde vært bedre vekst for disse stammene. Dette fordi at det ble observert sterkere bånd for stammene når de var dyrket i renkultur. Båndene fra renkultur var ikke utført i samme medium, men viste allikevel hvor sterkt bånd som kan oppnås for stammene.

Ved dyrkning på det kommersielle startfôret så det heller ikke ut til at HI 610 ble hemmet, hverken aerobt eller anaerobt. Tilsetning av naturlig flora isolert fra torskeyngel så derimot ut til å kunne ha evne til å hemme HI 610. Samtidig som HI 610 fikk en drastisk nedgang i vekst, ble det påvist sterke bånd i gelen fra den naturlige floraen.

Fiskemel er en av ingrediensene i startfôr, og at veksten for stammene ble bedre i fiskemel enn i startfôret, kan tenkes å skyldes andre komponenter i mediene som hemmer eller stimulerer veksten av de ulike stammene. At fiskemelene ble løst i redusert MB og startfôret ble løst i RO-vann kan også ha hatt en innvirkning på forskjellen i vekst på disse mediene. Selv om startfôret er rikt på næringsstoffer, kan det finnes komponenter i redusert MB som stimulerer veksten av stammene. Generelt burde vekst for alle stammene i renkultur på mediene undersøkes for å finne ut om det er noe i mediene som hemmer/stimulerer de, eller om det kan tenkes å være påvirkning fra de andre stammene.

Pseudoalteromonas RA 7-14 og *Marinomonas* 3-14 D2 a er av stammer som teoretisk ikke har fermentativ metabolisme (Bergey et al. 2001), men ble inkludert under anaerobe forhold for å ha samme blanding i aerobe som i anaerobe forhold, og dermed en direkte sammenligning. Det ble derimot påvist middels god vekst for disse stammene under anaerobe forhold, noe som teoretisk ikke skal være mulig. At båndene ble så tydelig i gelen kan tenkes å være forårsaket av at DNA for disse stammene finnes i prøvene, og at PCR-amplifisering har dannet nok kopier til at de synes i gelen. Dette kunne vært undersøkt ved at en 0-prøve hadde blitt inkludert i forsøket. Da kunne det blitt observert om båndet var like sterkt ved starten av forsøket, hvor stammen ikke har vokst, i forhold til resten av uttakene. Naturlig flora ble inkludert under anaerobe forhold og ga god vekst på begge mediene, med økning for hvert prøveuttak. Det så ikke ut til at HI 610 ble hemmet under anaerob vekst i dette forsøket heller, slik som resultatene ble for enkeltstammene (punkt 4.2.4).

Ingen av stammene som ble valgt ut til å hemme HI 610 i blanding så ut til å ha den evnen under forholdene som ble undersøkt, men det kan tenkes at de kan ha evne til å hemme ved andre betingelser. I tillegg kan det tenkes at de kan ha evne til å hemme andre patogene stammer. Stammer som viser antagonisme *in vitro* viser ikke nødvendigvis hemming *in vivo* (Kesarodi-Watson et al. 2008; Verschuere et al. 2000). I tillegg er det vist at stammer som ikke hemmer *in vitro* hemmer *in vivo* (Raida et al. 2003). Dette fører til at stammene som ikke så ut til å ha evne til å hemme HI 610 i disse forsøkene, kan ha evne til dette *in vivo*.

4.4 Forslag til videre arbeid

Videre arbeid kan inkludere en videre karakterisering på stammene, særlig for å undersøke om egenskapene påvist *in vitro* i denne oppgaven også påvises *in vivo*. Også en karakterisering med hensyn på andre egenskaper kan være aktuell, eksempelvis produksjon av antibakterielle komponenter og inhiberende effekt mot andre patogene stammer.

Pseudomonas var en stamme blant de som ble valgt ut til å undersøkes i denne oppgaven, men som etter sekvensering ble vist å ikke ha vært inkludert i oppgaven. Dette var i stor grad forårsaket av at kun b-versjoner, som var antatt å være forurensing, ble inkludert fra *Pseudomonas*-stammene. Hemming mot HI 610 av *Pseudomonas* ble dermed ikke undersøkt i denne oppgaven. En marin *Pseudomonas* er vist å ha antibakteriell evne både mot gram-positive og gram-negative bakterier (Ahmed et al. 2008; Nair og Simidu 1987) og i tillegg ha evne til å hemme HI 610 (Gram et al. 1999). 10 stammer av *Pseudomonas* ble også vist å ha antibakteriell aktivitet ved undersøkelse av hemming på agarplater (Zheng et al. 2005).

Stammene som ikke ble karakterisert i denne oppgaven kan dermed være aktuelle for å undersøke hemming av HI 610 og andre patogene stammer.

Stammene som ble undersøkt i hemmeforsøket mot HI 610, skulle egentlig også testes for hemming mot den patogene stammen *Marinomonas sp.*, som var inkludert i denne oppgaven. Dette ble ikke gjennomført da det ble for mange paralleller av prøver dersom hemming mot denne stammen skulle vært undersøkt samtidig som HI 610. Det kan derfor være aktuelt å undersøke isolatene mot denne stammen. I tillegg skulle en tredje patogen stamme være inkludert i denne oppgaven; *V.logei*, men denne stammen vokste ikke opp i mediet, og ble derfor ekskludert allerede ved starten av oppgaven. Denne stammen kan også være aktuell for de samme undersøkelsene som ble utført i denne oppgaven.

Det siste forsøket som ble utført i denne oppgaven; hemming av HI 610 med blandingskulturer, kan bli utført med andre blandinger enn de som ble benyttet i denne oppgaven. Dette for å undersøke samspillet mellom flere ulike kombinasjoner av bakterier. Forsøket kan også utføres under anaerobe forhold kun med stammer som har evne til fermentativ metabolisme. *Vibrio gallicus* RD 5-30 fra Anders. J Fjellheims doktoravhandling (Fjellheim 2006) var fermentativ og kunne vært aktuell for undersøkelser under anaerobe forhold, med hensyn på hemming av patogene stammer. Denne stammen ble vist å oppnå god vekst på glukose som karbonkilde (Figur 18 punkt 3.4), og kan derfor være en god kandidat med hensyn på evne til å hemme HI 610 i glukoserike medier, både aerobt og anaerobt.

5 Oppsummering og konklusjon

In vitro studier er nyttig for å velge probiotiske kandidater som kan undersøkes videre *in vivo*. Potensielle kandidater kan ikke undersøkes for alle egenskaper *in vivo* da det vil utgjøre for store ressurser og kostnader. *In vitro* studier tilsvarende de som er gjort i denne oppgaven er derfor hensiktsmessig for innledende screening av et større antall stammer.

Ved dyrkning på prebiotiske substrat var det kun to av stammene som ble vist å oppnå god vekst; *Pseudoalteromonas* RA 7-14 (β -glukan og laminaran) og *Marinomonas* 3-14 D2 a (alginat og β -glukan).

Evne for enkeltstammer til å hemme den patogene *V. anguillarum* HI 610 var best under aerobe forhold i proteinrikt medium. Det ble også påvist hemming i glukoserikt medium og i Brain Heart Infusion, men i mindre grad enn i proteinrikt medium. Stammene som hadde best evne til hemming var *Photobacterium* 1-12 D8, *Marinomonas* 3-14 D2 a, *Pseudoalteromonas* RA 7-14, *Vibrio* 1-2 D12 og *Shewanella* 1-2 D6. Under anaerobe forhold viste ingen stammer evne til å hemme HI 610.

Ved undersøkelse av blandingskulturer ble ikke HI 610 hemmet av stammene. Veksten til stammene var generelt dårlig, men om det skyldtes hemming fra HI 610 eller at mediene var basert på føringredienser og startfôr, var vanskelig å si. Dette fordi vekst for stammene i renkultur ikke var undersøkt på mediene. Den naturlige floraen fra torskeyngel så derimot ut til å hemme HI 610 ved dyrkning på kommersielt startfôr.

Ingen av stammene som ble undersøkt i denne oppgaven kan påstås å være probiotiske ut ifra forsøkene som er utført. Det ville krevd flere undersøkelser, og forsøk i naturlige omgivelser der effekten av disse stammene spesifikt undersøkes. Det kan kun bli foreslått stammer som potensielt kan være aktuelle. *Photobacterium* 1-12 D8 er stammen som ser ut til å være den beste kandidaten. Denne stammen har både evne til mukusadhesjon og vekst under anaerobe forhold, som er viktig for langsiktig etablering og vekst i tarmen til torsk. Stammen hadde evne til å hemme *V. anguillarum* HI 610 i medium som gir god vekst for den patogene stammen i renkultur. *Photobacterium* var også den stammen som ga best overlevelse av torskelarver ved *in vivo* undersøkelse. *Pseudolateromonas* RA 7-14 og *Marinomonas* 3-14 D2 a er også probiotiske kandidater, men gjerne på larvestadiet da de ikke er fermentativ. 3-14 D2 a har evne til mukusadhesjon, som er positivt for etablering i tarmkanalen. *Vibrio* 1-2 D12 kan også være en aktuell kandidat da den har evne til mukusadhesjon og vekst under anaerobe

forhold. Den er derimot ikke undersøkt for evne til hemolyse, som potensielt kan være negativt. *Shewanella* 1-2 D6 har i likhet med *Vibrio* 1-2 D12 evne til vekst under anaerobe forhold, men det er ikke påvist evne til mukusadhesjon. Stammen kan derfor være en aktuell kandidat for å bedre miljøet torskelarver lever i.

Basert på det som er nevnt ovenfor, blir hovedkonklusjonen at det ble påvist probiotiske egenskaper hos stammene som ble undersøkt i denne oppgaven, *in vitro*. Egenskapene inkluderte evne til vekst på prebiotiske substrat, evne til å konkurrere med eller hemme patogene stammer, evne til adhesjon til mukus og vekst under anaerobe forhold. Ikke alle stammene fikk påvist alle egenskapene. Det er ikke alltid at *in vitro* studier gjengis *in vivo*, og motsatt. Det bør derfor utføres *in vivo* forsøk på de beste kandidatene for å bekrefte at de virkelig er probiotiske.

6 Referanser

- Ahmed, N., Uzair, B., Ayaz, S., and Uddin, V. (2008). "Antibacterial activity of marine bacteria from Arabian Sea of Pakistan." *The Internet Journal of Microbiology*, 4(2).
- Austin, B., Austin, D., Sutherland, R., Thompson, F., and Swings, J. (2005). "Pathogenicity of vibrios to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and *Artemia* nauplii." *Environmental Microbiology*, 7(9), 1488-1495.
- Austin, B., Stuckey, L. F., Robertson, P. A. W., Effendi, I., and Griffith, D. R. W. (1995). "A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*." *Journal of Fish Diseases*, 18(1), 93-96.
- Balcazar, J. L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., and Muzquiz, J. L. (2006). "The role of probiotics in aquaculture." *Vet Microbiol*, 114(3-4), 173-86.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., and Stryer, L. (2007). *Biochemistry*, New York: W. H. Freeman and Company.
- Bergey, D. H., Holt, J. G., and Krieg, N. R. (2001). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*: Williams & Wilkins.
- Bergh, Ø. (1995). "Bacteria associated with early life stages of halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., inhibit growth of a pathogenic *Vibrio* sp." *Journal of Fish Diseases*, 18(1), 31-40.
- Direkbusarakom, S., Yoshimizu, M., Ezura, Y., Ruangpan, L., and Danayadol, Y. (1998). "*Vibrio* spp. the dominant flora in shrimp hatchery against some fish pathogenic viruses." *Journal of Marine Biotechnology*, 6(4), 266-267.
- Fjellheim, A., J. (2006). *Selection and administration of probiotic bacteria to marine fish larvae*, Doctoral thesis, Norwegian University of Science and Technology, Trondheim.
- Fjellheim, A. J., Klinkenberg, G., Skjermo, J., Aasen, I. M., and Vadstein, O. (2010). "Selection of candidate probiotics by two different screening strategies from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae." *Vet Microbiol*, 144(1-2), 153-9.
- Forberg, T., Arukwe, A., and Vadstein, O. (2011). "A protocol and cultivation system for gnotobiotic Atlantic cod larvae (*Gadus morhua* L.) as a tool to study host microbe interactions." *Aquaculture*, 315(3-4), 222-227.
- Fuller, R. (1989). "Probiotics in man and animals." *J Appl Bacteriol*, 66(5), 365-78.
- Gildberg, A., and Mikkelsen, H. (1998). "Effects of supplementing the feed to Atlantic cod (*Gadus morhua*) fry with lactic acid bacteria and immuno-stimulating peptides during a challenge trial with *Vibrio anguillarum*." *Aquaculture*, 167(1-2), 103-113.
- Gismondo, M. R., Drago, L., and Lombardi, A. (1999). "Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora." *Int J Antimicrob Agents*, 12(4), 287-92.
- Gómez, R., Geovanny, D., Balcázar, J. L., and Shen, M. A. (2007). "Probiotics as control agents in aquaculture." *Journal of Ocean University of China (English Edition)*, 6(1), 76-79.
- Gram, L., Melchiorson, J., Spanggaard, B., Huber, I., and Nielsen, T. F. (1999). "Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a Possible Probiotic Treatment of Fish " *Applied and environmental microbiology*, 65(3), 969-973.
- Grossart, H.-P., Schlingloff, A., Bernhard, M., Simon, M., and Brinkhoff, T. (2004). "Antagonistic activity of bacteria isolated from organic aggregates of the German Wadden Sea." *FEMS Microbiology Ecology*, 47(3), 387-396.
- Hjelm, M., Bergh, Ø., Riaza, A., Nielsen, J., Melchiorson, J., Jensen, S., Duncan, H., Ahrens, P., Birkbeck, H., and Gram, L. (2004). "Selection and Identification of Autochthonous

- Potential Probiotic Bacteria from Turbot Larvae (*Scophthalmus maximus*) Rearing Units." *Systematic and Applied Microbiology*, 27(3), 360-371.
- Holmström, C., Egan, S., Franks, A., McCloy, S., and Kjelleberg, S. (2002). "Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species." *FEMS Microbiology Ecology*, 41(1), 47-58.
- Ivanova, E. P., Sawabe, T., Hayashi, K., Gorshkova, N. M., Zhukova, N. V., Nedashkovskaya, O. I., Mikhailov, V. V., Nicolau, D. V., and Christen, R. (2003). "Shewanella fidelis sp. nov., isolated from sediments and sea water " *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 577-582.
- James, G. A., Beaudette, L., and Costerton, J. W. (1995). "Interspecies bacterial interactions in biofilms." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 15(4), 257-262.
- Karlsen, Ø., and Meeren, T. v. d. (2003). "Oppdrett av torsk". City: Bergen: Havforskningsinstituttet.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M. J., and Gibson, L. (2008). "Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes." *Aquaculture*, 274(1), 1-14.
- Kozasa, M. (1986). "Toyocerin (*Bacillus toyoi*) as growth promotor for animal feeding." *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, 4, 121-135.
- Long, R. A., and Azam, F. (2001). "Antagonistic Interactions among Marine Pelagic Bacteria " *Applied and Environmental Microbiology*, 67(11), 4975-4983.
- Lucas-Elio, P., Hernandez, P., Sanchez-Amat, A., and Solano, F. (2005). "Purification and partial characterization of marinocine, a new broad-spectrum antibacterial protein produced by *Marinomonas mediterranea*." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1721(1-3), 193-203.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., and Clark, D. P. (2009). *Brock Biology of Microorganisms*: Pearson Education.
- Maier, R. M., Pepper, I. L., and Gerba, C. P. (2009). *Environmental Microbiology*: Elsevier Inc.
- Makridis, P., Martins, S., Tsalavouta, M., Dionisio, C. L., Kotoulas, G., Magoulas, A., and Dinis, M. T. (2005). "Antimicrobial activity in bacteria isolated from Senegalese sole, *Solea senegalensis*, fed with natural prey." *Aquaculture Research*, 36, 1619-1627.
- McCarthy, S. A., Johnson, R. M., and Kakimoto, D. (1994). "Characterization of an antibiotic produced by *Alteromonas luteoviolacea* Gauthier 1982,85 isolated from Kinko Bay, Japan." *Journal of Applied Microbiology*, 77(4), 426-432.
- Moat, A. G., Foster, J. W., and Spector, M. P. (2002). *Microbial Physiology*: Wiley-Liss, Inc.
- Muyzer, G., de Waal, E. C., and Uitterlinden, A. G. (1993). "Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA." *Applied and environmental microbiology*, 59(3), 695-700.
- Nair, S., and Simidu, U. (1987). "Distribution and Significance of Heterotrophic Marine Bacteria with Antibacterial Activity." *Applied and Environmentally Microbiology*, 53(12), 2957-2962.
- Nayak, S. K. (2010). "Role of gastrointestinal microbiota in fish." *Aquaculture Research*, 41(11), 1553-1573.
- Olafsen, J. A. (2001). "Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture." *Aquaculture*, 200(1-2), 223-247.
- Olsen, A. I., Attramadal, Y., Jensen, A., and Olsen, Y. (1999). "Influence of size and nutritional value of *Artemia franciscana* on growth and quality of halibut larvae

- (Hippoglossus hippoglossus) during the live feed period." *Aquaculture*, 179(1-4), 475-487.
- Raida, M. K., Larsen, J. L., Nielsen, M. E., and Buchmann, K. (2003). "Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus2B)." *Journal of Fish Diseases*, 26(8), 495-498.
- Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., and Menasaveta, P. (2000). "Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiotic bacterium (*Bacillus S11*)." *Aquaculture* 191, 271-288.
- Ringø, E., Olsen, R. E., Gifstad, T. Ø., Dalmo, R. A., Amlund, H., Hemre, G. I., and Bakke, A. M. (2010). "Prebiotics in aquaculture: a review." *Aquaculture Nutrition*, 16(2), 117-136.
- Ruiz, C. M., Román, G., and Sánchez, J. L. (1996). "A marine bacterial strain effective in producing antagonisms of other bacteria." *Aquaculture International*, 4(3), 289-291.
- Sahu, M., Swarnakumar, N., Sivakumar, K., Thangaradjou, T., and Kannan, L. (2008). "- Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives." (- 0973-7715 (Electronic)).
- Sakai, M., Yoshida, T., Atsuta, S., and Kobayashi, M. (1995). "Enhancement of resistance to vibriosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), by oral administration of *Clostridium butyricum* bacterin." *Journal of Fish Diseases*, 18(2), 187-190.
- Salvesen, I., and Vadstein, O. (1995). "Surface disinfection of eggs from marine fish: evaluation of four chemicals." *Aquaculture International*, 3(3), 155-171.
- Skjermo, J., Salvesen, I., Øie, G., Olsen, Y., and Vadstein, O. (1997). "Microbially matured water: a technique for selection of a non-opportunistic bacterial flora in water that may improve performance of marine larvae." *Aquaculture International*, 5(1), 13-28.
- Skjermo, J., and Vadstein, O. (1999). "Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae." *Aquaculture*, 177(1-4), 333-343.
- Strøm, E., and Ringø, E. (1993). "Changes in the bacterial composition of early developing cod, *Gadus morhua* (L.) larvae following inoculation of *Lactobacillus plantarum* into the water." *Physiology and Biochemical Aspects of Fish Development*, 226-228.
- Thompson, F. L., Abreu, P. C., and Cavalli, R. (1999). "The use of microorganisms as food source for *Penaeus paulensis* larvae." *Aquaculture*, 174(1-2), 139-153.
- Tinh, N. T. N., Dierckens, K., Sorgeloos, P., and Bossier, P. (2007). "A Review of the Functionality of Probiotics in the Larviculture Food Chain." 10,1-12 (2008).
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., and Verstraete, W. (2000). "Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture." *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 655-+.
- Vine, N. G., Leukes, W. D., and Kaiser, H. (2006). "Probiotics in marine larviculture." *FEMS microbiology reviews*, 30(3), 404-27.
- Wietz, M., Mansson, M., Gotfredsen, C. H., Larsen, T. O., and Gram, L. (2010). "Antibacterial Compounds from Marine Vibrionaceae Isolated on a Global Expedition." *Marine Drugs*, 8(12), 2946-2960.
- Yasuda, K., and Taga, N. (1980). "A mass culture method for *Artemia salina* using bacteria as food." *La Mer (Bull. Soc. Franco-Jpn. Oceanogr.)*, 18, 53-62.
- Zheng, L., Han, X., Chen, H., Lin, W., and Yan, X. (2005). "Marine bacteria producing antibacterial compounds isolated from inter-tidal invertebrates." *Annals of Microbiology*, 55(2), 119-124.

Vedlegg

Vedlegg A: Oversikt over medietilsetninger og enzymer	b
Vedlegg B: Aerob vekst på glukose og aminosyrer	d
Vedlegg C: Anaerob vekst på glukose og aminosyrer	e
Vedlegg D: Vekstkurver fra dyrkning på glukose og aminosyrer	f
Vedlegg E: Vekstkurver fra hemmeforsøk.....	g
Vedlegg F: Beregninger av HPLC-resultater	h
Vedlegg G: Fremgangsmåte for blanding av kulturer.....	i
Vedlegg H: Fremgangsmåte for fortynning av kulturer	j
Vedlegg I: Beregning av CFU/ml og fortynning til larveforsøk	k
Vedlegg J: Prosedyre for DNA-ekstrahering	m
Vedlegg K: Prosedyre for DGGE.....	n
Vedlegg L: Agarosegelelektroforese.....	r
Vedlegg M: Fermenteringsprodukt	s
Vedlegg N: HPLC-utskrift	t

Vedlegg A: Oversikt over medietilsetninger og enzymer

Tabell A-1: Tillaging av glukose og aminosyrer som karbonkilder

Komponent	Merke	Kat.nr	Kons. g/L
Glukose	Apotekerproduksjon	07A026/1	30
Alanin	Sigma-Aldrich	A7627	12
Natriumglutamat	Sigma-Aldrich	G1626	30

Karbonkildene ble laget hver for seg i 100 ml RO-vann. pH på natriumglutamat ble justert til 7,5. Løsningene ble autoklavert ved 120 °C i 20 minutter. Til redusert MB ble karbonkildene tilsatt til sluttkonsentrasjon 9 g/L.

Tabell A-2: Tillaging av prebiotiske substrater og glukose i redusert MB

Komponent	Merke	Kat.nr	Kons.(g/L)
Alginat	FMC Biopol.	GP 3350	6,5
β-glukan	Megazyme	90501a	6,5
Glukose	Apotekerproduksjon	07A026/1	6,5
Inulin	BeneoHPX	Infi1	6,5
Laminiran	Sigma-Aldrich	L9634	6,5

Substratene ble laget direkte som egne løsninger i redusert MB. For hvert av substratene ble det laget 30 ml. 30 × 5 ml redusert MB ble veid ut og tilsatt i 5 erlendmeyerkolber (100 ml) satt på røring. Substratene ble veid ut og tilført mediet til stoffene var løst opp. Alginat og β-glukan ble satt til røring på varme til de ble løst opp. Videre ble alginat og β-glukan autoklavert ved 120 °C i 20 minutter, mens glukose, inulin og laminiran ble sterilfiltrert før oppbevaring.

Tabell A-3: Komponenter i vitaminkonsentrat benyttet til dyrkning av *Vibrio* 1-2 D12 i Brain Heart Infusion (BHI) (CM1135, Oxoid, UK) tilsatt 15 g/L NaCl (Apotekerproduksjon, Norge) og spormineraler.

Komponent	Merke	Kons.(mg/L)
Pyridoxine HCL	Sigma Aldrich	10
Thiamine HCL	Sigma Aldrich	5
Riboflavin	Sigma Aldrich	5
Niacinamide	Sigma Aldrich	5
D-Ca-pantothenate	Sigma Aldrich	5
p-amino-benzoic-acid	Sigma Aldrich	5
Na-lipoic-acid	Sigma Aldrich	5
Biotin	Sigma Aldrich	2
Folic acid	Sigma Aldrich	2
Vitamin B ₁₂	Sigma Aldrich	5
2-Mercaptoethane sulfuric acid	MP Bio-medicals	5

Tabell A-4: Oversikt over enzymene som ble benyttet til behandling av fiskemel og Artemia, gitt med navn, kat.nr og merke.

Enzym	Kat.nr	Merke
Pepsin	P7012	Sigma
Trypsin	T0303	Sigma
Chymotrypsin	C4129	Sigma
Pankreatin	P1625	Sigma

Vedlegg B: Aerob vekst på glukose og aminosyrer

Tabell B-1: Oversikt over aerob vekst på karbonkilder. Høyeste OD på de ulike karbonkildene er gitt i tabellen, samt hvilket døgn etter innokulering denne verdien ble nådd. Veksten er gitt med trekanter, og en forklaring for antall trekanter er gitt nederst i tabellen. pH i de ulike mediene ved avslutning av forsøket, er også gitt i tabellen.

Stamme	Substrat	Høyeste OD	Døgn med høyest OD	Vekst	pH avslutning
<i>Pseudomonas</i> 3-1 C11	Alanin	2,225	6	▲▲▲	7,38
	Glukose	4,625*	8	▲▲▲▲	6,77
	Na-glutamat	3,875	7	▲▲▲▲	7,60
<i>Vibrio</i> 1-2 D12	Alanin	3,600*	8	▲▲▲▲	7,29
	Glukose	3,075	2	▲▲▲	5,30
	Na-glutamat	5,550*	8	▲▲▲▲	7,51
<i>Microbacterium</i> 3-5 G 10	Alanin	6,375*	8	▲▲▲▲	7,40
	Glukose	3,775	1	▲▲▲▲	5,46
	Na-glutamat	7,350*	8	▲▲▲▲	7,61
<i>Photobacterium</i> 1-12 D8	Alanin	3,500*	8	▲▲▲	7,29
	Glukose	3,025	1	▲▲▲	5,38
	Na-glutamat	4,225*	8	▲▲▲▲	7,48
<i>Vibrio</i> 1-1 D8	Alanin	3,650*	8	▲▲▲▲	7,30
	Glukose	2,575	3	▲▲▲	5,65
	Na-glutamat	5,800*	8	▲▲▲▲	7,48
<i>Shewanella</i> 1-8 C8 a	Alanin	4,125	5	▲▲▲▲	7,45
	Glukose	2,725	4	▲▲▲	7,05
	Na-glutamat	2,950	4	▲▲▲	7,43
<i>Shewanella</i> 1-2 D6	Alanin	1,055	6	▲▲	7,44
	Glukose	1,725	2	▲▲▲	7,39
	Na-glutamat	2,325	4	▲▲▲	7,36
Stamme 3-14 E9 b	Alanin	4,000	7	▲▲▲▲	7,34
	Glukose	7,600	8	▲▲▲▲	6,17
	Na-glutamat	4,775	7	▲▲▲▲	7,50
<i>Pseudomonas</i> 2, 3-14 E9 a	Alanin	3,120	8	▲▲▲	7,35
	Glukose	3,765	8	▲▲▲▲	6,92
	Na-glutamat	1,990	3	▲▲▲	7,42
<i>Pseudomonas</i> 1, 3-7 C4 a	Alanin	3,928	7	▲▲▲▲	7,28
	Glukose	3,760	7	▲▲▲▲	6,69
	Na-glutamat	6,070	6	▲▲▲▲	7,46
<i>Pseudomonas</i> 4, 3-9 B8 a	Alanin	4,375	10	▲▲▲▲	7,59
	Glukose	2,975	10	▲▲▲	6,72
	Na-glutamat	4,780	7	▲▲▲▲	7,44
<i>Marinomonas</i> 3-14 D2 a	Alanin	3,450	10	▲▲▲	7,45
	Glukose	4,043	9	▲▲▲▲	6,59
	Na-glutamat	5,878	9	▲▲▲▲	7,69
Stamme 3-14 D2 b	Alanin	4,315	7	▲▲▲▲	7,28
	Glukose	7,630	6	▲▲▲▲	5,92
	Na-glutamat	5,775	9	▲▲▲▲	7,58
<i>Marinomonas</i> 3-14 F8 a	Alanin	3,443	9	▲▲▲	7,45
	Glukose	4,010	9	▲▲▲▲	6,55
	Na-glutamat	6,030	9	▲▲▲▲	7,73
Stamme 3-14 F8 b	Alanin	3,600	10	▲▲▲	7,48
	Glukose	7,050	10	▲▲▲▲	6,73
	Na-glutamat	2,105	3	▲▲▲	7,40
<i>Flavobacterium</i> 3-5 F9 a	Alanin	4,048	7	▲▲▲▲	7,29
	Glukose	4,120	6	▲▲▲▲	6,73
	Na-glutamat	5,983	6	▲▲▲▲	7,50
Stamme 3-5 F9 b	Alanin	4,050	10	▲▲▲▲	7,54
	Glukose	7,283	7	▲▲▲▲	6,33
	Na-glutamat	5,550	10	▲▲▲▲	7,63

*=Bakteriene vokste fortsatt da forsøket ble avsluttet
 ▲▲=0,6-1,59
 ▲▲▲=1,6-3,59
 ▲▲▲▲=3,6-7,350

Vedlegg C: Anaerob vekst på glukose og aminosyrer

Tabell C-1: Oversikt over anaerob vekst på karbonkilder. Høyeste OD oppnådd på de ulike karbonkildene, er gitt i tabellen, samt hvilket døgn etter innokulering denne verdien ble nådd. Veksten er gitt med trekanter, og en forklaring på antall trekanter er gitt nederst i tabellen. pH ved avslutning av forsøket i de ulike mediene er også gitt i tabellen.

Stamme	Substrat	Høyeste OD	Døgn med høyest OD	Vekst	pH avslutning
<i>Vibrio</i> 1-2 D12	Basismedium	0,555	3	▲	7,24
	Alanin	0,535	2	▲	7,20
	Glukose	1,455	2	▲▲	5,42
	Na-glutamat	0,485	2	▲	7,25
<i>Microbacterium</i> 3-5 G 10	Basismedium	0,700	7	▲▲	7,28
	Alanin	0,415*	8	▲	7,31
	Glukose	1,710	1	▲▲▲	5,29
	Na-glutamat	0,735*	8	▲▲	7,24
<i>Photobacterium</i> 1-12 D8	Basismedium	0,500	4	▲	7,25
	Alanin	0,285	2	▲	7,29
	Glukose	1,610	1	▲▲▲	5,40
	Na-glutamat	0,485	2	▲	7,27
<i>Vibrio</i> 1-1 D8	Basismedium	0,855*	8	▲▲	7,31
	Alanin	0,324	7	▲	7,28
	Glukose	0,377*	8	▲	7,27
	Na-glutamat	0,535*	8	▲	7,28
<i>Shewanella</i> 1-8 C8 a	Basismedium	1,040	5	▲▲	7,75
	Glukose	0,995	7	▲▲	7,73
<i>Shewanella</i> 1-2 D6	Basismedium	0,680	5	▲▲	7,61
	Glukose	0,880	6	▲▲	7,53

*=bakteriene vokste fortsatt da forsøket ble avsluttet

▲=0-0,59

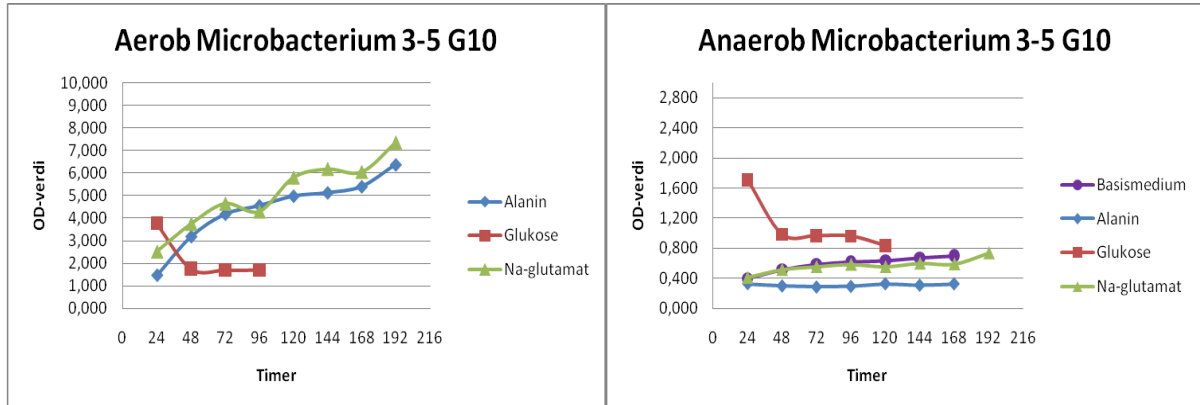
▲▲=0,6-1,59

▲▲▲=1,6-2,5

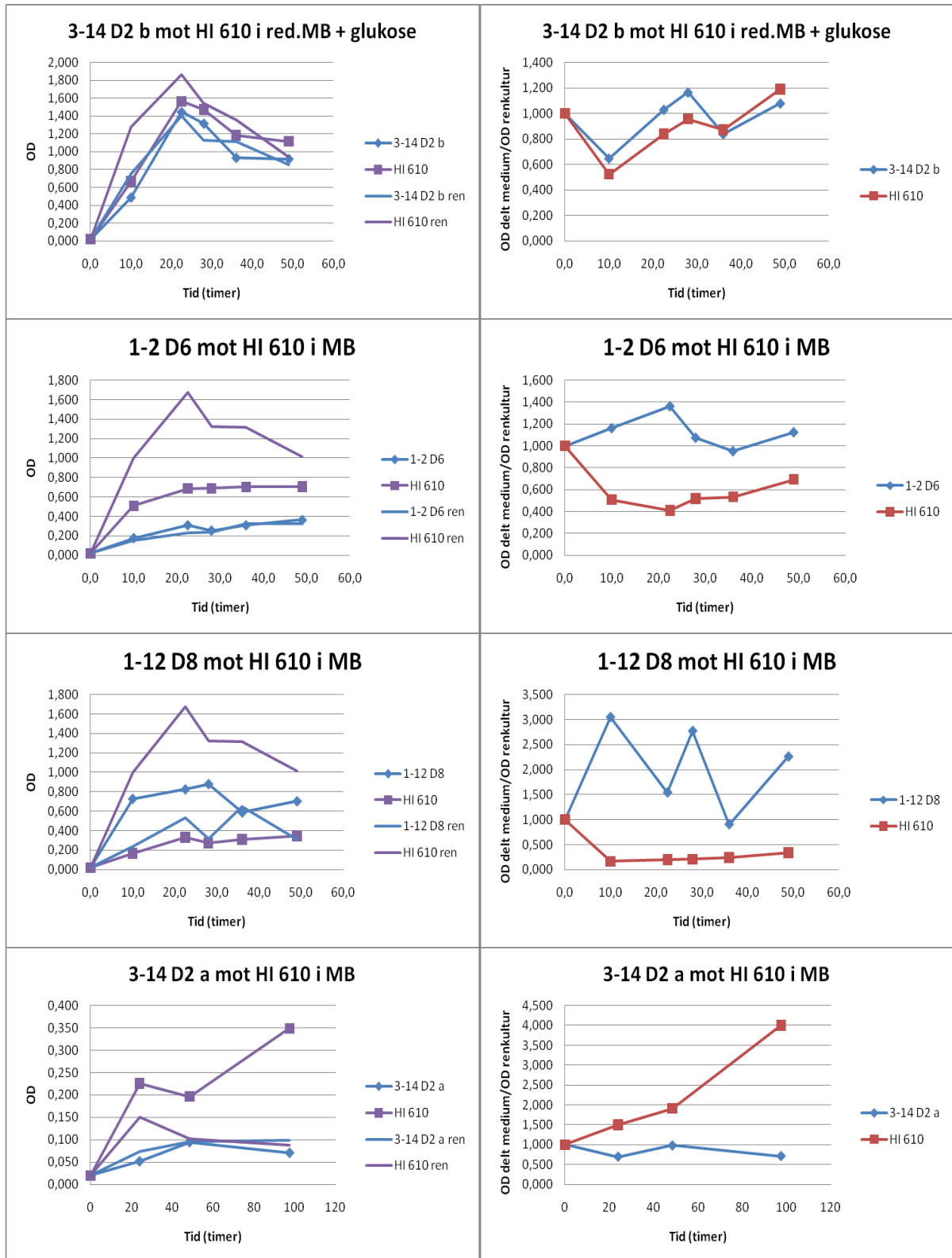
▲▲▲▲=2,6-

Vedlegg D: Vekstkurver fra dyrkning på glukose og aminosyrer

Eksempler på vekstkurver hvor det ble observert en topp i mediet tilsatt glukose tidlig i vekstforløpet.



Vedlegg E: Vekstkurver fra hemmeforsøk



Figur E-1: Eksempler på vekstkurver fra hemmeforsøket mot HI 610 i ulike medier. De 6 øverste kurvene er fra aerobe forhold, og de 2 nederste er fra anaerobe forhold.

Vedlegg F: Beregninger av HPLC-resultater

Beregning av glukose i mediet ved avslutning av forsøket ble beregnet ut ifra følgende formel:

$$\mathbf{Kons. \textit{prøve} = (\textit{prøveareal/standardareal}) \times kons. \textit{standard}}$$

Standarden for glukose ble analysert i flere paralleller ved hver kjøring av HPLC, og gjennomsnittet for arealet av standarden for hver kjøring av prøver ble benyttet til utregning av konsentrasjonen av glukose i prøvene. Konsentrasjonen på standarden var 4,5 g/L i prøver med volum >1 ml, og 10 g/L i prøver med volum >1 ml.

Resultatet på kons. i prøver beregnet ut ifra formelen gitt over, gir en indikasjon på glukose som var igjen i prøvene. For å finne glukose omsatt ble denne konsentrasjonen trukket fra konsentrasjonen av glukose tilsatt ved start av forsøket, som var på 9 g/L i prøver med volum >1 ml, og 6,5 g/L i prøver med volum <1 ml.

Vedlegg G: Fremgangsmåte for blanding av kulturer

Tabell G-1: Blandingsforhold til dyrkning i brønnplate beskrevet under punkt 3.7.

Stamme	OD/ml	%-andel	ml uttak	OD e/uttak
HI 610	1,720	32,7	3,0	5,2
<i>Marinomonas sp.</i>	1,315	25,0	4,0	5,3
RA 7-14	2,225	42,3	2,4	5,3
SUM	5,260	100,0	9,4	15,7
GJ. SNITT	1,753	33,3	3,1	5,2

Tabell gir en oversikt over tillaging av blandingskultur til dyrkning i brønnplate. Renkulturene ble blandet sammen i et forhold slik at man fikk en OD som tilsvarte gjennomsnitts-OD for alle stammene i blandingskulturen. Da HI 610 tilsvarte ca. 1/3 av den totale OD-verdien, ble denne stammen benyttet som utgangspunkt for mengde uttak av de to andre stammene. Et sluttvolum på blandingskulturen på ca. 10 ml ble satt som utgangspunkt og da 1/3 av 10 tilsvarer ca. 3, ble 3 ml tatt ut som volum for HI 610. Videre ble ml uttak for de to andre stammene beregnet ved forholdet OD HI 610/OD for stammen og deretter multiplisert med 3 ml (HI 610 sin mengde). Eks. *Marinomonas sp.*: $(1,720/1,315) * 3 = 4,0$ ml. OD etter uttak ble beregnet ved å multiplisere uttak ml med OD/ml.

Vedlegg H: Fremgangsmåte fortynning av kulturer

Fortynning av stammene til OD tilsvarende 0,1 ble utført ved bruk av fortynningsformelen:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

C1-konsentrasjonen man har (i dette tilfellet OD)

V1-ukjent volum (i dette tilfellet)

C2-konsentrasjonen man ønsker (i dette tilfellet OD)

V2-volumet man ønsker

Ønsket OD (0,1) ble derfor multiplisert med ønsket volum og deretter dividert på OD for hver stamme. Volum å ta ut fra kulturen ble da funnet. Dette volumet ble videre trukket fra det ønskede volumet for å finne ut hvor mye medium som skulle tilsettes.

Denne fremgangsmåten ble benyttet i alle forsøk hvor stammene ble fortynnet til OD tilsvarende 0,1.

Eksempel:

Marinomonas hadde i en forkultur OD 1,990 (C1) når kulturen ble målt. Den ønskede OD-verdien var 0,1 (C2) og det totale volumet skulle bli 10 ml (V2). Stammen ble da fortynnet ved å ta ut 0,50 ml kultur og 9,50 ml medium til 0,105 i OD.

Vedlegg I: Beregning av CFU/ml og fortynning til larveforsøk

Beregning av CFU/ml:

Når koloniene var synlige ble CFU/ml beregnet ved å summere antall kolonier på alle fortynninger og paralleller, og deretter dividere summen på 3,33, dersom alle parallellene på de tre fortynningene ble benyttet. Dette tallet ble videre multiplisert med den minste fortynningen det ble talt fra, altså den platen hvor konsentrasjonen var størst. Ved denne beregningsmetoden vektlegges kolonier på de minst fortynnede platene, der det er flest kolonier. Plater med kolonier >300 ble ikke talt.

Beregning til larveforsøket:

For å finne en sammenheng mellom antall CFU/ml i forhold til OD, ble stammene dyrket opp i MB 2216 tilsatt 5 g/L glukose og veksten ble nøye fulgt med OD-måling. Prøver fra kulturene ble tatt ut ved to OD-intervaller; OD 0,5-0,8 og OD 1-2, hvor det ble sådd ut til kimtall (punkt 2.5.3). Deretter ble CFU/ml dividert på OD-verdien hvor utsåingen var tatt fra, for å finne et forholdstall mellom CFU/ml og OD.

For å kunne fortynne forkulturene til $2,1 \times 10^7$ CFU/ml, og dermed $2,1 \times 10^6$ CFU/ 100 μ l, som er den konsentrasjonen som skulle tilsettes brønnene, var et forhold mellom CFU/ml og OD dermed nødvendig å finne. Forholdstallet ble benyttet når kulturene ble dyrket opp til larveforsøket, og kulturene ble fortynnet til den gitte konsentrasjonen. HI 610 var ikke undersøkt på forhånd med hensyn på CFU/ml, men på grunnlag av at den er en *Vibrio*, ble det antatt at den har omtrent samme CFU/ml som den andre vibrioen som ble tatt med i forsøket.

Fortynning til den angitte konsentrasjonen ble utført ved å ta ut en gitt mengde kultur, sentrifugere den i 10 minutter ved 4 000 rpm og 15 °C i Eppendorf centrifuge 5810R. Videre ble supernatanten pipettert av og pelletten ble resuspendert i sterilt 80 % sjøvann til et gitt volum. Disse mengdene for hver kultur er angitt i Tabell I-1. Som kontroll på at rett fortynning var oppnådd ble det sådd ut til kimtall fra de fortynnede prøvene (punkt 2.5.3).

Tabell I-1: Oversikt fortytning av stammene til forsøket beskrevet under punkt 3.6. Kolonnen med OD tilsvarer OD når prøver ble tatt ut til kintall, angitt i kolonnen CFU/ml. Kolonnen med OD/CFU tilsvarer forholdet som ble benyttet til å beregne tallene i kolonnen CFU/ml v/forsøk ved måling av OD v/forsøk. Ønsket konsentrasjon er gitt i kolonnen fort.til, og uttak ml tilsvarer volumet som måtte tas ut fra hver kultur for å sentrifugeres, og senere tilsettes volumet i kolonnen resusp. til for å ende opp med $2,1 \times 10^7$ CFU/ml.

Stamme	OD	CFU/ml	Forhold OD/CFU	OD v/forsøk	CFU/ml v/forsøk	Fort. til	Uttak ml	Resusp. til
3-14 D2 a	0,715	$1,1 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	0,342	$5,2 \cdot 10^7$	$2,1 \cdot 10^7$	5,0	12,4
3-14 D2 b	0,790	$1,9 \cdot 10^9$	$2,4 \cdot 10^9$	0,505	$1,2 \cdot 10^9$	$2,1 \cdot 10^7$	0,5	28,6
1-8 C8 a	0,540	$3,7 \cdot 10^8$	$6,9 \cdot 10^8$	1,055	$7,2 \cdot 10^8$	$2,1 \cdot 10^7$	1,0	34,3
1-2 D6	0,530	$2,8 \cdot 10^8$	$5,3 \cdot 10^8$	0,371	$2,0 \cdot 10^8$	$2,1 \cdot 10^7$	2,0	19,0
1-12 D8	0,705	$6,1 \cdot 10^8$	$8,7 \cdot 10^8$	0,610	$5,3 \cdot 10^8$	$2,1 \cdot 10^7$	1,0	25,0
1-2 D12	0,770	$3,3 \cdot 10^8$	$4,3 \cdot 10^8$	3,200	$1,4 \cdot 10^9$	$2,1 \cdot 10^7$	0,5	33,0
3-7 C4 a	0,505	$6,9 \cdot 10^8$	$1,4 \cdot 10^9$	0,070	$9,6 \cdot 10^7$	$2,1 \cdot 10^7$	5,0	22,8
3-14 E9 b	0,715	$1,6 \cdot 10^9$	$2,3 \cdot 10^9$	0,625	$1,5 \cdot 10^9$	$2,1 \cdot 10^7$	0,5	35,7
3-5 G10	1,360	$2,1 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	0,760	$1,1 \cdot 10^8$	$2,1 \cdot 10^7$	2,5	13,1
3-5 F9 b	0,415	$1,1 \cdot 10^9$	$2,7 \cdot 10^9$	1,195	$3,2 \cdot 10^9$	$2,1 \cdot 10^7$	0,25	38,1
HI 610	—	—	$(4,3 \cdot 10^8)$	1,075	$4,6 \cdot 10^8$	$2,1 \cdot 10^7$	1,0	21,9

Vedlegg J: Prosedyre for DNA-ekstrahering

NTNU: DNA extraction with Dneasy, modified protocol

1. Add 180 µl enzymatic lysis buffer (20 mg/ml) to sample (see Dneasy protocol; lysozyme added)
2. Incubate ½ h at 37 °C.
3. Add 40 µl proteinase K and 180 µl ATL buffer, vortex, incubate at 55 °C for ½ h.
4. Add 200 µl AL buffer, vortex, and incubate at 70 °C for 10 min.
5. Add 300 µl 96 % etanol and vortex.
6. If the sample is not completely lyzed, spin down precipitates before transfer to columns (step 7).
7. Transfer the solution to the Dneasy column (placed in a 2 ml tube) and centrifuge at 8000 rpm in 1 min. Discharge the filtrate.
8. Add 500 µl AW 1 buffer and centrifuge at 8000 rpm for 1 min. Discharge filtrate.
9. Add 500 µl AW 2 buffer and centrifuge at full speed (13-15 000 rpm) for 3 min.
10. Transfer the column to an eppendorf tube, add 100 µl AE buffer (or DNA free water) directly on the membrane, incubate for 1 min at room temperature and centrifuge at 8000 rpm for 1 min.
11. Quantify amount of DNA with Nanodrop.

Enzymatic lysis buffer (20 mg/ml):

Lysis b:

20 mM TRIS

10 mM EDTA

1,2 % Triton

Fluka:

Lysozyme, from chicken egg white

Til eksempelvis 6 ml buffer: 6 ml Lysis b. + 120 mg Lysozyme

Vedlegg K: Prosedyre for DGGE

DGGE protocol for Ingeny

Don't use ethanol for cleaning of plastic parts like spacers and combs.

Mounting of glass plates

- 1 Wash the two glass plates, the spacer, and comb, using Deconex soap and hot tap water. Finally rinse well with water to remove any traces of soap. Polish one side of each glass plate using 96% ethanol and Kimwipe paper.
- 2 Assemble the glass plates and spacer, and place it all in the gel box. Assure that the spacer is aligned to the lower edge of the glass plates. Tighten the screws.
- 3 Loosen the two uppermost screws, mount the comb, and then tighten the screws again.

Preparation of DGGE solutions

- 1 Determine the acrylamide percent and the denaturing gradient of the gel (for recipes of solutions, -see below).
- 2 Make acrylamide solutions with the desired denaturing percentages in two 50 ml tubes (total volume in each tube will be 24 ml; see table below for volumes of 0% and 80% denaturing solutions)
- 3 The 0% denat. acrylamide solution can be added to the 50 ml tubes without sterile filtration. The 80% denat. acrylamide solution needs to be filtered upon addition.
- 4 Prepare a 50 ml tube with 8 ml 0% denat. acrylamide solution ("stacking gel" for the top part of the gel).
- 5 When ready to pour the gel, add 16 μ l TEMED to the 24 ml gel solutions, and 10 μ l TEMED til the 8 ml "stacking gel" solution.
- 6 Directly prior to pouring the gel, add 87 μ l APS (10% Ammonium persulphate) in both 24 ml gel solutions (for the stacking gel, add 40 μ l APS, but not until the stacking gel is ready for pouring).

Casting the gel

- 1 Rinse the gradient mixer and the tubes by pumping MilliQ water through the system.
- 2 Turn off the pump, close the valve between the chambers of the gradient mixer, and put the gradient mixer on magnetic stirring.
- 3 Pour the gel solution with low denat. percentage in the "left" chamber. Quickly open and close the valve to remove any air bubbles in the channel between the chambers. Use a pipette to remove the small amounts of gel solution from the "right" chamber.
- 4 Pour the gel solution with high denat. percentage in the "right" chamber.
- 5 Start the pump, wait a few seconds until the gel solution from the "right" chamber has migrated ~6-7 cm out in the tube. Then open the valve between the chambers. Assure stirring in both chambers.
- 6 Place the syringe between the glass plates (assure that no water from the washing step is left in the tube).

- 7 When the gel reaches approximately 1 cm below the comb, remove stop the pump, remove the syringe, and empty leftovers from the mixing chambers and the flexible tubes. Rinse the system with a small amount of MilliQ water.
- 8 When the mixing chambers are empty from water, close the valve and stop the pump. Add APS to the “stacking gel” solution, mix, and pour into the “right” chamber.
- 9 Start the pump again. When the glass plates are completely filled with the stacking gel, turn off the pump, and press the comb down to the correct position. Tighten the screws.
- 10 Leave the gel for polymerization for at least two hours.
- 11 Pump MilliQ water through the system to avoid gel polymerization in the tubes.

Preparations and addition of samples

- 1 Make 20 l of 0.5 x TAE (200ml 50 x TAE + 20 l MilliQ) and add appr. 17 l to the buffer tank (the buffer may be used for 3 runs). Turn on the instrument to heat the buffer to 60⁰C.
- 2 Carefully remove the comb from the gel. Loosen all screws, and carefully push down the spacer. Tighten the screws at the sides of the glass plates (the screws at the bottom should be loos throughout the electrophoresis).
- 3 Place the gel system in the buffer tank. Avoid air bubbles beneath the gel.
- 4 Attach cables and tube, turn on the recirculation. Use a syringe with buffer to rinse the wells. Turn on the power (100 Volts; should result in approximately 30-40 mA) and let run while preparing the samples.
- 5 Add 4µl loading dye to 15 µl PCR sample. When all samples are ready for loading, turn of the recirculation and the push the “low voltage” button. Apply the samples to the wells. Avoid using the 2-3 outermost wells on each side due to”smiling effects”.

Running the gel

- 1 Turn on the ”high voltage button”, set the voltage to 100. Run 5-10 min without recirculation.
- 2 Turn on the recirculation and run for 17-18 hours.

Staining and vizualization

- 1 Turn off the instrument; lift the gel system over to the blue box.
- 2 Loosen the screws, and lift out the gel. Carefully separate the glass plates (use the small red plastic equipment).
- 3 Transfer the gel to a plastic foil sheet, and place it in the dark blue box.
- 4 Prepare the staining solution: 30ml MilliQ + 3µl SYBR Gold + 600µl 50 x TAE in a 50 ml tube.
- 5 Distribute the staining solution on the gel, put the lid on the box, and leave for 1-2 hours.
- 6 Carefully take out the gel, rinse with MilliQ water. Carefully let the water run of the gel, use a paper towel at the edges of the gel to remove excess water.

- 7 Wash the UV plate of the "gel doc" with distilled water and ethanol. Use Kimwipe paper, and take care to avoid dust and particles on the UV plate (easier to avoid dust if the plate is not allowed to dry). Finally distribute MilliQ water on the plate (this makes it possible to move the gel on the UV plate).
- 8 Carefully transfer the gel from the plastic foil to the UV plate (by turning the plastic foil "upside down"). Before removing foil, position the gel at the plate.
- 9 Photograph the gel at different exposures, and save the pictures in original file format, and e.g. pdf or other formats.

Eluation of bands for sequencing

- 1 Print out a picture of the gel, and number the bands that are to be sequenced.
- 2 Add 20µl sterile MilliQ water to eppendorf tubes, and number the tubes according to the numbering of bands.
- 3 Pull out the UV plate, and pull on the UV screen. Cover the wrists to protect from UV radiation. Use the blue 1 ml pipette tips to stick out material from the bands. Take care to avoid touching other bands. Use a pipette to blow out the material in the eppendorf tube with water (it should be possible to see whether there is material in the pipette tip when transferring it to the water).
- 4 Place the tubes in the fridge over night.
- 5 Use 2.5µl of the eluate as template in a 50µl PCR reaction.

Recipes

For all solutions, add distilled water to obtain the final volume.

50 x TAE-buffer

Per liter:

Tris base	242g
Glacialacetic acid	57,1ml
0.5 M EDTA (pH 8,0)	100ml

Autoclave the buffer.

Deionized formamide:

Deionize 200 ml formamide by adding 7,5g DOWEX RESIN AG 501X8, and stirr for 1 hour at room temperature.

Acrylamid solution (0% denaturing):

8% acrylamide in 0,5 x TAE (per 250 ml):

40% acrylamide solution (BioRadLab Inc., Ca., USA)	50 ml
50 x TAE	2.5 ml

Store the solution at 4 °C, protect from light.

Denaturing acrylamide solution (80% denaturing):

8% acrylamide, 5,6M urea, 32% formamide i 0,5 x TAE (per 250 ml):

40% acrylamide solution (BioRadLab Inc., Ca., USA)	50 ml
50 x TAE	2,5 ml
Urea	84 g
Deionized formamide	80 ml

Store the solution at 4 °C, protect from light. This solution **must** be sterile filtered before pouring the gel.

Composition of low and high denaturing solutions:

Denaturing %	0%	80%	TEMED + 10% APS	Total volume
15	19,5ml	4,5ml	16µl + 87µl	24ml
25	16,5ml	7,5ml	16µl + 87µl	24ml
30	15 ml	9 ml	16µl + 87µl	24ml
40	12 ml	12 ml	16µl + 87µl	24ml
45	10,5ml	13,5ml	16µl + 87µl	24ml
50	9ml	15ml	16µl + 87µl	24ml
55	7,5ml	16,5ml	16µl + 87µl	24ml
60	6 ml	18 ml	16µl + 87µl	24ml
75	1,5ml	22,5ml	16µl + 87µl	24ml

0% “Stacking gel”:

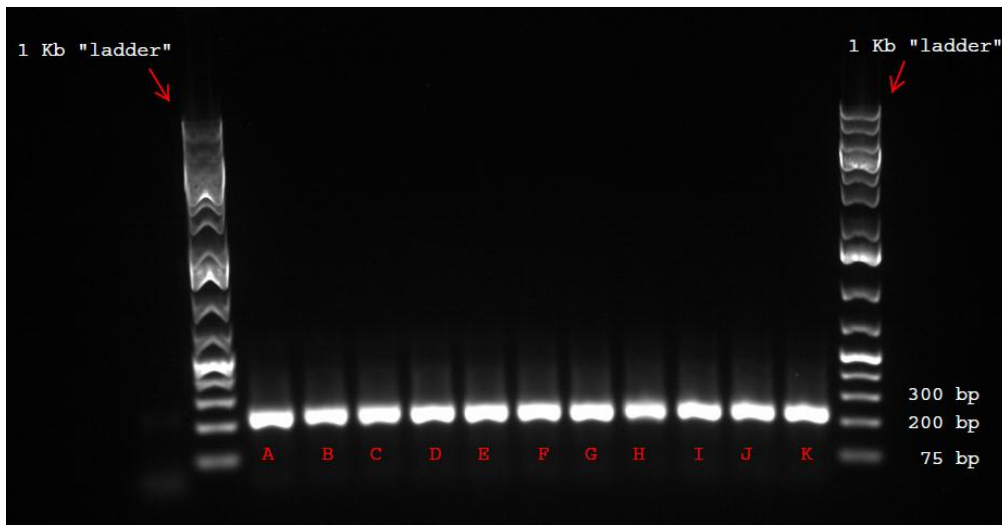
8 ml 0% acrylamide solution, 40µl 10% APS og 10µl TEMED.

10% APS (ammonium persulfate):

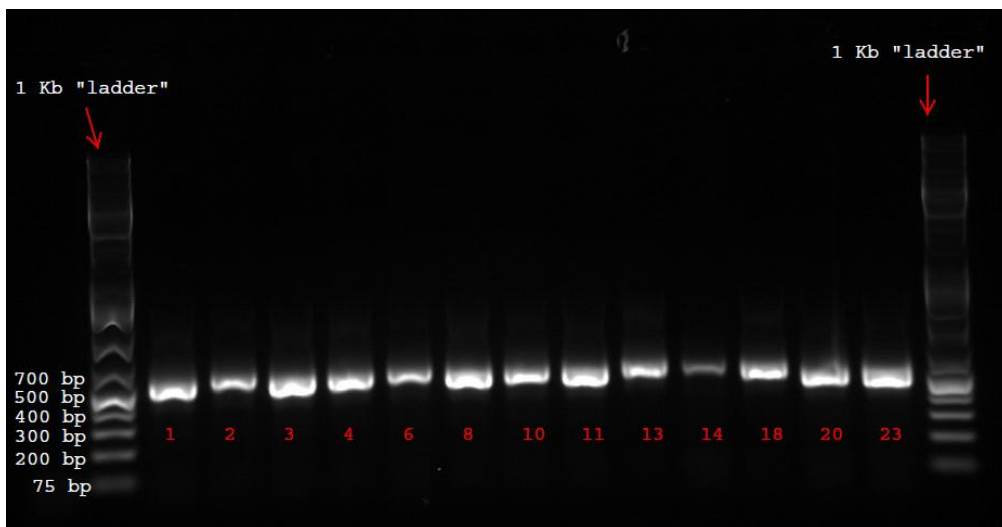
10 g ammonium persulfate dissolved in 100ml dH₂O

Sterile filter the solution, distribute in eppendorf tubes (e.g. 250µl in each), and keep frozen.

Vedlegg L: Agarosegelelektroforese

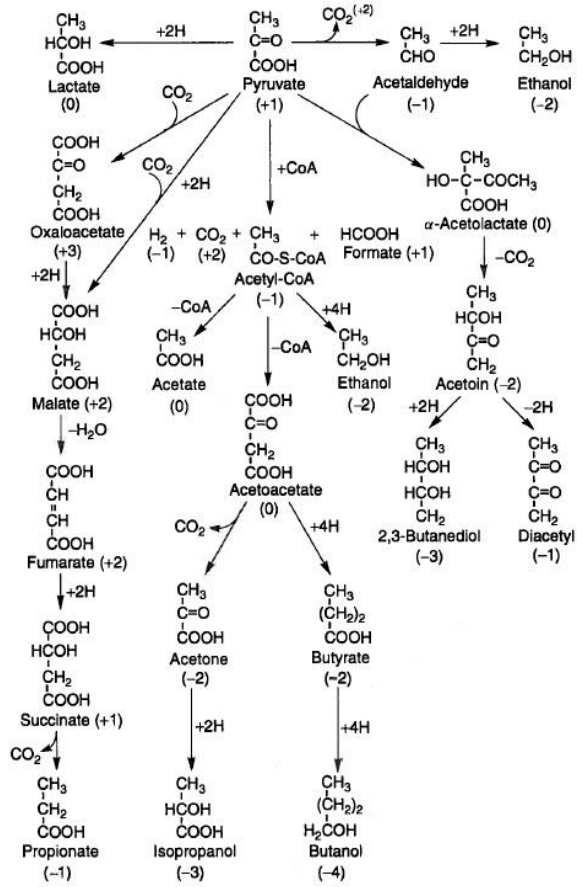


Figur L-1: Eksempel på agarosegel kjørt med prøver til analysering ved DGGE. Negativ kontroll ble inkludert, og ble applisert i brønn utenfor ”ladder”. Ingen bånd var synlig der, og dermed var det ikke DNA fra andre kilder enn prøvene under amplifiseringen.



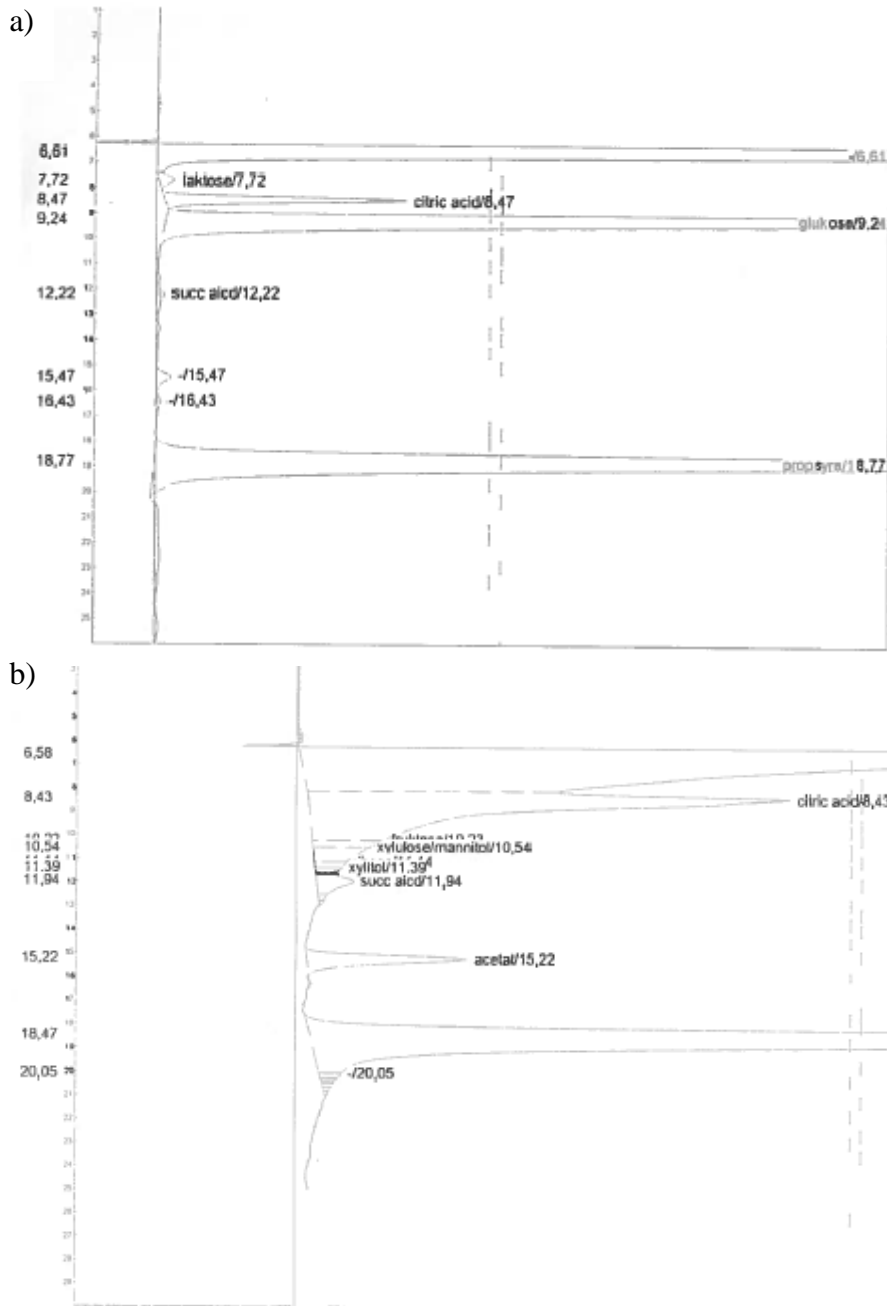
Figur L-2: Eksempel på agarosegel kjørt med prøver som ble sendt inn til sekvensering. Prøver med svake bånd (ses på prøve 14), ble amplifisert på nytt med flere sykluser i PCR-programmet og på nytt undersøkt ved agarosegelelektroforese. Negativ kontroll ble inkludert, og ble applisert i brønn utenfor ”ladder”. Ingen bånd var synlig, og dermed var det ikke DNA fra andre kilder enn prøvene under amplifiseringen.

Vedlegg M: Fermenteringsprodukt



Figur M-1: Oversikt over fermenteringsprodukt (Moat et al. 2002).

Vedlegg N: HPLC-utskrifter



Figur N-1: Eksempel på HPLC utskrift hvor produksjon av syre har påvirket pH i ulik grad. Ulike retensjonstider ble observert for samme komponent i figuren da analysene ble utført på ulike tidspunkt. **a)** *Shewanella* 1-2 D6 dyrket på glukose under aerobe forhold. Stammen hadde pH 7,5 ved avslutning av forsøket i mediet tilsatt glukose, og den lille toppen man ser av acetal (retensjonstid 15,47) har dermed påvirket pH i liten grad. **b)** stamme 3-14 D2 b dyrket på glukose under aerobe forhold. Stammen fikk pH 5,9 i mediet tilsatt glukose ved avslutning av forsøket i mediet tilsatt glukose, og den store toppen av acetal har dermed påvirket pH i stor grad.