

Kjemisk desinfisering av egg til copepoden *Acartia tonsa*

Katrine Singaas

Marine Coastal Development

Innlevert: mai 2014

Hovedveileder: Yngvar Olsen, IBI

Medveileder: Jan Ove Evjemo, Sintef/NTNU
Kari Attramadal, IBI

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Institutt for biologi

Forord

Masteroppgaven ble skrevet ved institutt for biologi, ved NTNU, Trondheim. Det praktiske arbeidet ble utført ved NTNU Sealab og SINTEF Sealab. Jeg vil takke ansvarlig veileder Yngvar Olsen og faglig veileder Jan Ove Evjemo for god veiledning under prosessen. Jeg vil også takke medveileder Kari Attramadal for god veiledning under både planleggingen og den praktiske gjennomførelsen.

Jeg vil takke Merethe Selnes fra SINTEF for innføring i laboratorieutstyr og prosedyrer på SINTEF laboratoriene og Werner Storøy for praktisk orientering ved produksjon av copepoder og alger. En stor takk til Dag Altin for utlån av utstyr og nyttige diskusjoner underveis. Jeg ønsker også å takke Olav Vadstein for interessante diskusjoner under planleggingsfasen.

Takk til medstudentene for det gode miljøet på lesesalen. Takk til min samboer, Tor Erik Leistad, for diskusjonene angående statistikk og for korrektur.

Sammendrag

Copepoder har god næringsverdi og er en viktig førkilde for marine fiskelarver i havet. Ved oppdrett av mange marine fiskearter er copepoder et godt alternativ til de tradisjonelle førorganismene; *Artemia* og rotatorier. *Acartia tonsa* produserer egg som kan høstes og lagres til senere bruk. Dette kan benyttes i kommersiell sammenheng, men det er da viktig å ha kontroll over bakterieinnhold og forhindre overføring av patogener. Dette kan forhindres ved desinfisering av copepodeeggene.

I denne oppgaven ble copepodeegg desinfisert med varierende styrker av Pyceze, glutaraldehyd, natriumhypokloritt og Buffodine. Den desinfiserende effekten ble vurdert ut fra antall egg med bakterievekst på brønnplater fylt med Marin agar, TCBS agar og *Pseudomonas* agar. Eggens klekkesuksess ble estimert ved å registrere prosent klekte nauplier etter 48 timer og de klekte nauplienes vitalitet ble vurdert ut ifra antall nauplier som hadde spist alger etter 3,5 døgn. Antall egg med bakterievekst og klekkesuksess ble også registrert for egg desinfisert med glutaraldehyd (200 mg/L) lagret i sjøvann med og uten oksygen og egg desinfisert med en kombinasjon av glutaraldehyd (200 mg/L) og Buffodine (1600 mg/L). Lagringsperioden var 31 dager på 2 - 4°C i mørket.

Samtlige av desinfeksjonsmidlene hadde bakteriereduserende effekt ved høyere doser, men graden varierte ut fra hvilke midler som var benyttet. Ved bruk av Pyceze var andelen egg med bakterievekst lavere enn 40 % på Marine agar ved doser over 200 mg/L med en lav men signifikant nedgang på klekkesuksess ved enkelte dosestyrker. Desinfisering med glutaraldehyd resulterte i overflatesterile egg ved en dose på 200 mg/L på Marine agar uten å redusere klekkesuksess. Ved desinfisering med natriumhypokloritt var den bakteriereduserende effekten signifikant allerede ved en dose på 50 mg/L og eggene var overflatesterile ved 400 mg/L. Klekkesuksessen var signifikant lavere ved doser på 100 mg/L og høyere. Buffodine hadde ingen signifikant effekt på klekkesuksessen, med unntak av eggene som var desinfisert i dosestyrke på 100 mg/L og den laveste dosen som ga signifikant bakteriereduserende effekt på eggene etter 21 dager på Marine agar var 400 mg/L.

Desinfisering med høyeste dosestyrke på 1600 mg/L resulterte i lavest andel egg med bakterievekst (3,33 %) på Marine agar.

Under lagring hadde andel egg med bakterievekst økt for alle behandlingene. Copepodeeggene som ble desinfisert i glutaraldehyd før lagring i vann med og uten oksygen i 31 dager hadde alle bakterievekst på Marine agar og en nedgang i klekkesuksess, men gruppen som var lagret i anoksisk vann hadde en mindre nedgang enn gruppen som var lagret i oksygenrikt vann. Fra gruppen som var desinfisert i både glutaraldehyd og Buffodine var andelen egg med bakterievekst 70 % på Marine agar, men klekkesuksessen var den laveste av samtlige både før og etter lagring.

Abstract

Copepods have good nutritional value and are an important source of feed for marine fish larvae in their natural habitat. In aquaculture copepods are a good alternative compared with the more traditional first feeding organisms; rotifers and *Artemia*. *Acartia tonsa* produces eggs that can be harvested and stored under the right conditions for several months before hatching. The unhatched eggs can be sold commercially, but to do this, it is important that the bacteria associated with the eggs are under control. Disinfection of the copepod eggs can prevent transfer of potential pathogens.

In this thesis copepod eggs were disinfected with different concentrations of Pyceze, glutaraldehyde, sodium hypochlorite and Buffodine. The disinfectants were evaluated by the number of egg with growth of bacteria in wells filled with Marine agar, TCBS agar and Pseudomonas agar. The hatching success of the copepod eggs were determined by calculating percentage of hatched nauplii after 48 hours and the viability of the nauplii were estimated from the number of individuals who had traces of algae's in their guts after 3,5 days. The amount of eggs with growth of bacteria and the hatching success was also registered for disinfected eggs that were stored for 31 days. These eggs were all disinfected in glutaraldehyd (200 mg/L) before receiving one of three different treatments; storage in sea water, storage in anoxic sea water or another disinfection with Buffodine (1600 mg/L) before storage in anoxic sea water.

All of the disinfectants reduced the amount of eggs with bacteria on high concentrations, but the degree varied amongst the different disinfectants. Pyceze reduced the amount of egg with bacteria growth to less than 40 % on Marin agar with the use of concentrations above 200 mg/L, but with a low, but significant reduction in hatching success on some concentrations. Disinfection with glutaraldehyd (200 mg/L) resulted in surface sterile eggs on Marine agar without reduction of the eggs hatching success. The bacteria reducing effect of sodium hypochlorite was already significant with the use of concentrations as low as 50 mg/L and the eggs were considered surface sterile when disinfected with 400 mg/L. The eggs hatching success however was significantly lower when disinfected in 100 mg/L and higher

concentrations of disinfectants. Disinfection with Buffodine did not affect the eggs hatching success negatively with the exception of eggs that were disinfected with 100 mg/L. The lowest concentration of Buffodine who gave a significant reduction on the amount of bacteria on Marine agar was 400 mg/L, while the highest concentration (1600 mg/L) result in the lowest amount of eggs with bacteria among the Buffodine groups on Marine agar.

The amount of disinfected eggs with bacteria had increased after storage and there were 100 % eggs with bacteria on Marine agar from the groups who where disinfected in glutaraldehyde. The hatching success decreased for eggs from all treatments. The eggs which were stored in anoxic seawater after being disinfected with glutaraldehyde had a lower decrease in hatching success compared with the eggs stored in normal seawater after being disinfected with glutaraldehyd. The eggs that were disinfected with both glutaraldehyde and Buffodine before storage had 70 % eggs with bacteria on Marine agar, but the eggs hatching success was the lowest amongst the groups, both before and after storage.

Innholdsfortegnelse

1	Introduksjon	1
1.1	Akvakultur	1
1.2	Levende fôrorganismer	2
1.3	Copepoder og copepodeegg	4
1.4	Mikrobiologi og desinfeksjon	5
1.4.1	Natriumhypokloritt	6
1.4.2	Buffodine®	7
1.4.3	Glutaraldehyd	8
1.4.4	Pyceze	8
1.5	Mål med oppgaven	8
2	Material og metode.....	10
2.1	Produksjon av copepodeegg og mikroalger	10
2.1.1	Dyrking av <i>A. tonsa</i>	10
2.1.2	Dyrking av <i>Rhodomonas baltica</i>	11
2.2	Eksperimentelt oppsett	12
2.2.1	Desinfisering og desinfiseringsmidler	13
2.2.2	Forbredelse av bakterieagar	15

2.2.3	Bakterietester	15
2.2.4	Klekkesuksess hos nauplier	16
2.2.5	Viabilitet av nauplier (<i>A.tonsa</i>)	17
2.3	Lagringsforsøk	17
2.3.1	Vannbehandling	19
2.4	Statistikk	20
3	Resultater	21
3.1	Desinfisering av copepodeegg med Pyceze	21
3.1.1	Klekkesuksess hos nauplier fra egg desinfisert med Pyceze	24
3.1.2	Viabilitet hos nauplier fra egg desinfisert i Pyceze	27
3.2	Desinfisering av copepodeegg med glutaraldehyd	29
3.2.1	Klekkesuksess hos nauplier fra egg desinfisert i Glutaraldehyd	31
3.2.2	Viabilitet hos nauplier fra egg desinfisert i Glutaraldehyd	32
3.3	Desinfisering av copepodeegg med natriumhypokloritt	33
3.3.1	Klekkesuksess hos nauplier fra egg desinfisert med natriumhypokloritt	36
3.3.2	Viabilitet hos nauplier fra egg desinfisert i natriumhypokloritt	37
3.4	Desinfisering av copepodeegg med Buffodine	38
3.4.1	Klekkesuksess hos nauplier fra egg desinfisert i Buffodine	41

3.4.2	Viabilitet hos nauplier fra egg desinfisert i Buffodine	42
3.5	Lagringsforsøk av desinfiserte copepodeegg.....	43
3.5.1	Sammenligning av bakterieeffektene av de ulike behandlingene under lagringsforsøket.....	47
3.5.2	Klekkesuksess hos nauplier fra lagringsforsøk	48
4	Diskusjon.....	50
4.1	Desinfisering av copepodeegg og bakterieforsøk	50
4.2	Copepodeegg og klekkesuksess.....	51
4.3	Viabilitet av copepoder	53
4.4	Lagringsforsøk	55
4.5	Sammenligning med andre studier.....	55
4.6	Sammenligning av desinfeksjonsmidlene.....	57
4.7	Konklusjoner.....	61
4.8	Spørsmål ut fra data i denne oppgaven	61
5	Referanser	62

1 Introduksjon

1.1 Akvakultur

Sjømatprodukter er en viktig kilde til protein og 16,6 % av verdens befolknings inntak av dyreproteiner i 2009 bestod av fisk. Fisk inneholder en rekke viktige næringsstoffer, samtidig som at den vanligvis inneholder lite mettet fett, karbohydrater og kolesterol. Fiskeri og akvakultursektoren står også for inntektene til en betydelig andel av verdens befolkning da 55 millioner mennesker er involvert i den primære sektoren av fiskeproduksjon i 2010, hvorav 7 millioner er estimert til å være fiskere og fiskeoppdrettere (FAO 2012).

Fiskeri og akvakultursektoren forsynte verden med omtrent 148 millioner tonn fisk i 2010. Den globale mengden av fangst fra fiskeri har vært stabil på rundt 90 millioner tonn de siste årene, samtidig som akvakulturproduksjonen har økt. Den globale produksjonen av fisk fra akvakultur var 59,9 millioner tonn i 2010, noe som var en økning på 7,5 % fra 2009. Omtrent 30 % av fiskebestandene er overbeskattet og produserer lavere utbytte enn potensialet. De siste års nedgang i global marin fangst og økning av overbeskattede fiskebestander har resultert i en forverring innen verdens marine fiskerier og har en negativ innvirkning på produksjonen av fisk. Dette har ført til negative økologiske konsekvenser og redusert den naturlige produksjonen i havet, noe som igjen har ført til negative sosiale og økonomiske konsekvenser. Samtidig er den globale populasjonen av mennesker økende og for å vedlikeholde dagens inntak av fisk vil verden trenge 23 millioner tonn mer fisk per år innen 2020. Dette må i hovedsak komme fra akvakultur (FAO 2012).

Fiskens egg kan være enten pelagiske eller demersale. De fleste arter i ferskvann og noen i saltvann gyter demersale egg som generelt er større enn pelagiske fiskeegg. Larver fra demersale egg er generelt mer utviklet ved klekking, sammenlignet med larver fra pelagiske egg, og klekking kan være utsatt til plommesekken er absorbert og larvene er klare for exogen føring. De fleste marine fiskearter gyter pelagiske egg som ofte er mindre enn demersale egg. Disse har generelt mindre plomme hvor larvene ved klekking er i en lite utviklet tilstand. De får næring fra plommesekken fram til sansesystem, muskler, sirkulasjonssystem og

fordøyelsessystem er nok utviklet til at larvene kan leve på plankton (Kendall 1984, Ahlstrom og Moser 1980).

Hos "altricial"e larver er fordøyelsessystemet rudimentær, det mangler mage og mye av proteinsyntesen foregår i baktarmens epitelceller (Govoni *et al.* 1986). Et slikt fordøyelsessystem ser ut til ikke å være i stand til å prosessere formulert fôr godt nok og slike larver har dermed behov for levendefôrorganismer i den første fasen etter klekking. Levende fôrorganismer svømmer i vannkolonnen og er dermed tilgjengelig for fiskelarven i motsetning til formulert fôr som raskt synker mot bunnen. Denne bevegelsen kan også se ut til å stimulere fiskelarvens fôrrespons (Støttrup 2003).

Marine fiskelarver har behov for de essensielle fettsyrene Docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n - 3), Eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n - 3) og Arachidonic acid (ARA, 20:4n - 6). Forholdet mellom disse flerumettede fettsyrene (PUFA, poly unsaturated fatty acids) er av betydning for optimal vekst, overlevelse og metamorfose (Sargent *et al.* 1999). Fôret til larvene er kilden til dette og supplementet gjennom fôrorganismer og forskjellige anrikningsprotokoller basert på fiskeoljer, alger og kommersielle produkter som er rike på en eller flere av de essensielle flerumettede fettsyrene DHA, EPA og ARA (Sargent *et al.* 1997).

1.2 Levende fôrorganismer

De mest brukte fôrorganismene er rotatorier og *Artemia*. Rotatorier har vært brukt som fôrorganisme for marine fiskelarver i nesten 50 år. De er planktonisk, tolerant til forskjellige miljøforhold og har høy produksjonsrate (FAO 1996). De kan produseres i svært høy tetthet og det kreves derfor ikke store volumer. *Brachionus rotundiformis* kan produseres ved en tetthet på 5000 – 8000 individer/ml og med rett utstyr er det mulig å øke tettheten til 20 000 individer/ml (Hagiwara *et al.* 2001, Yoshimura *et al.* 1997). Rotatorier reproduseres raskt og stor mengde levendefôr kan bygges opp på kort tid (FAO 1996).

Rotatorier er ikke naturlig rike på n-3 HUFA og for å brukes som fôrorganisme bør næringsinnholdet være tilfredsstillende. Dette oppnås ved å tilføre rotatoriene de ønskede lipidene og fettsyrene gjennom fôret, også kalt anrikning. Forskjellig anrikning kan gi forskjeller i totalt lipidinnhold og sammensetning av fettsyrer. (Rodríguez *et al.* 1996, Garcia

et al. 2008). Rotatoriens næringskvalitet synker raskt ved sult, noe som kan forekomme i larvetankene. Eksempelvis resulterte 4 dagers sult ved 18 - 20 °C i tap av 40 - 50 % kroppsmasse hos *brachionus plicatilis* (Makridis og Olsen 1999).

Artemia danner cyster som kan høstes, prosesseres og selges i beholdere og dermed klekkes ved behov (FAO 1996). Cystene som er metabolsk inaktive settes i gang igjen metabolsk under visse miljøforhold og utviklingen er stoppet så lenge cystene er tørre. Overføres de til sjøvann blir cystene hydrerte og embriøet opptar metabolismen. Selve klekkingen kan forbedres noe ved dekapsering av men normalt klekker cystene etter 24 timer ved 25 °C (Støttrup 2003, FAO 1996). Etter 24 timer inkubasjonen i sjøvann klekkes fritt svømmende *Artemia* nauplier som kan brukes som fôr med engang, noe som gjør at *Artemia* til en beleielig og lite arbeidsom levende fôrorganisme (FAO 1996).

I 1970 årene skjøt det fart i akvakulturproduksjonen og etterspørselen av *Artemia* ble større enn tilbudet. Det ble gjort forsøk på å produsere *Artemia* i utvikingsland, men store deler av markedet består av cyster høstet fra "Great Salt Lake" i USA. Dette gjør at markedet er sårbart, noe som ble illustrert ved den lave cyste innhøstingen på midten av 90 tallet og som også bidro til svært høy pris på cystene (FAO 1996).

Evjemo og Olsen (1997) sammenlignet lipidinnholdet i anriket *Artemia*, anrikete rotatorier og copepoder. Anriket *Artemia* inneholdt mest lipider av de tre fôrorganismene, men copepoder inneholdt naturlig et høyt innhold av n-3 høyumettete fettsyrer (highly unsaturated fatty acids, HUFA) og da spesielt DHA som utgjorde mellom 40 og 45 % av totale fettsyrer. Til sammenligning inneholder anriket *Artemia* 15 -22 %. Rotatorier hadde lavest innhold av lipider av samtlige fôrorganismer, men dette kan forandres ved å endre fôringsregimet for kulturen og vekstraten. Copepodene hadde naturlig et høyt forhold av DHA og EPA (Evjemo og Olsen 1997).

Selv om anrikning av *Artemia* gjør at innholdet av DHA blir høyere, reduseres mengden raskt etter anrikning ettersom *Artemia* selektivt kataboliserer DHA til EPA (Evjemo *et al.* 1997, Navarro *et al.* 1999).

1.3 Copepoder og copepodeegg

Copepoder er planktoniske organismer som finnes både i saltvann og ferskvann. Det er funnet 11500 copepodearter og det er 10 ordener av copepoder. Artene som er oftest brukt i akvakultur tilhører som regel en av de tre ordenene; Calanoida, Harpacticoida og Cyclopoida (Humes 1994, Boxshall og Jaume 2000). Calanoide copepoder er oftest pelagiske og kan opptre i hele vannkolonnen, selv om det også finnes arter som er bentiske. De har antennuler som tilsvarer kroppslengden eller lengre (Huys og Boxshall 1991, Dussart og Defaye 2001). Calanoide copepoder har en viktig rolle i det marine økosystemet da mange arter er en link mellom phytoplankton og pelagiske fisk som f.eks sardiner og sild (Mauchline et al. 1998).

Copepoder gyter egg rett ut i vannkolonnen og det finnes flere eggtyper. Normale copepodeegg ("subitaneous" egg, SE) har normal metabolisme og klekker raskt etter gyting, men hvis omstendighetene er ufordelaktige kan utviklingen hos enkelte egg ("quiescence" egg) stanse og egget forbli i denne tilstanden for en periode (Alekseev *et al.* 2007, Drillet *et al.* 2011).

Hvileegg ("diapause" egg) styres av hormoner som induseres av biotiske og abiotiske faktorer. Klekking er ikke mulig selv før en viss tid har gått og når denne perioden er over kan eggene enten klekke eller forbli quiescent inntil miljøforholdene er gode nok (Alekseev *et al.* 2007). En annen kategori er forsinket klekkete egg ("delayed hatching" egg, DHE). Disse eggene er ulike dem i de andre kategoriene da de ikke klekkes raskt nok for å bli betegnet som vanlige egg eller ikke klekker sakte nok for å bli betegnet som ekte hvileegg (Drillet *et al.* 2011).

Drillet *et al.* (2011) fant at *Acartia tonsa* fra Tyskland og Danmark normalt hadde vanlige egg, men det ble i tillegg produsert egg med forsinket klekking. Andelen hvileegg som ble produsert økte med lavere fôr konsentrasjoner.

Copepoder har vært i bruk ved kultivering av marine arter i flere tiår, og da eksempelvis ved å høstes fra naturen og brukt enten direkte som levendefôr eller prosessert for senere bruk i en formulert diett. Det har vært gjort forsøk med å kultivere copepodearter intensivt siden starten på 1990 tallet (Støttrup 2003).

Copepoder er et naturlig bytte for mange typer fiskelarver. De har høye nivåer av HUFA som DHA og EPA i den dominerende formen av fosfolipider og høy andel av DHA/EPA (McEvoy *et al.* 1998, Støttrup *et al.* 1999, Bell *et al.* 2003, Støttrup 2003). Flere studier viser at marine fiskelarver som har et fôrregime som inkluderer copepoder har bedre overlevelse, vekst og pigmentering (McEvoy *et al.* 1998, Næss og Lie 1998, Støttrup *et al.* 1999, Bell *et al.* 1999, Payne og Rippingale 2000).

1.4 Mikrobiologi og desinfeksjon

I copepodekulturer kan bakterieveksten være ukontrollert og flere bakteriegrupper, som *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp, *Arcobacter* spp. og *E-coli*, er funnet sammen med dyreplankton i naturen (Støttrup. 2003, Maugeri *et al.* 2004). Bakteriesammensetninger som er i laboratoriekulturer av dyreplankton har sterke likhetstrekk med bakterisammensetningen som er i fôret og i vannet som benyttes i kulturen (Skjeremo og Vadstein 1993). Skjeremo og Vadstein (1993) fant at antallet bakterier økte 50 -150 % etter foring av rotatorier med akkarmel. Det tok 3 dager ved 6 °C før bakterieantallet var på samme nivå som før fôring og innholdet av bakterier var også mer likt i vann og i rotatorier etter 3 døgn.

Sochard *et al.* (1979) hentet copepoder fra lokaliteter i Mexico gulfen, Atlanterhavet og fra Naval Research Laboratory. Bakterieprøver fra copepodenes overflate og tarmflora ble dyrket på marine agar, TCBS agar og sopp agar. I deres prøver var den mest dominante bakteriegruppen fra genus *Vibrio* og de fant flere bakterier på copepodene enn i prøver tatt fra frie vannmasser. Det ble funnet færre bakterier fra prøvene av copepodenes tarm enn fra deres overflate. *Vibrio* spp. var den dominante bakteriegruppen hos copepoder fra de pelagiske lokalitetene og *Pseudomonas* spp. var mest dominant i copepodene fra laboratoriet (Sochard *et al.* 1979).

Næss og Bergh (1994) desinfiserte egg fra copepodene *Acartia clausi* og *Euryteora affinis* som var samlet fra sedimentet i sjøen i Vest Norge med Fam-30, Buffodine og glutaraldehyd. De fant at Buffodine ikke hadde god nok desinfiserende effekt, men at middelet ikke hadde signifikant effekt på klekkeprosent og overlevelse. Fam-30 hadde noe negativ effekt mot egg fra *A.clausi*, da klekkesuksess var omtrent 4 % lavere enn kontroll, men forårsaket svært lav klekkeprosent hos *E.affinis* samt ingen overlevelse av nauplier over 5 dager. glutaraldehyd

hadde ingen signifikant effekt på klekkeprosent, men samtlige nauplier døde før 5 dager var omme. Det var ingen signifikant effekt på klekking av *E.affinis* ved desinfisering av glutaraldehyd, selv om en negativ tendens i klekkeprosent og overlevelse ble observert. Fam-30 og glutaraldehyd ga mest bakteriereduksjon (Naess og Bergh).

1.4.1 Natriumhypokloritt

Hypokloritter er blant de mest brukte desinfiseringsmidlene og er godt kjent som blekemiddel. Det har høyere kostnad enn klorgass, men innehar lavere ulykkesrisiko. Hypoklorittion kan kombineres med flere kationer, men natrium har lav kostnad og er enkel å håndtere (Simpson og Sofos 2009).

Den antimikrobielle aktiviteten i vannløsning av hypokloritt forårsakes av molekylært klor (Cl_2), hypoklorittion (OCl^-) og underklorert syre (HOCl), men sistnevnte er den største bidragsyteren (McDonnell 2007). HOCl er elektrokjemisk nøytralt, har liten størrelse, lav molekylærvækt og disse egenskapene gjør at molekylet kan penetrere celleveggen (Simpson og Sofos 2009). Den antimikrobielle aktiviteten er avhengig av pH, konsentrasjon og temperatur. Økning i temperatur eller konsentrasjon øker aktiviteten. HOCl dominerer ved en pH ved 4 -7 og ved høyere pH verdier produseres OCl^- (McDonnell 2007). Klor er svært reaktiv mot organisk materiale, men den utfordringen kan til en viss grad løses ved å bruke høyere konsentrasjoner av desinfeksjonsmiddel (Simpson og Sofos 2009). Hypoklorittene er mer aktive i en sur løsning enn i en basisk løsning og virkningen vil derfor være påvirket av pH (Naidu og Khanna 2000). Kommersielle løsninger av natriumhypokloritt inneholder opptil 15 % tilgjengelig klor i løsningen. Høyere konsentrasjoner forårsaker problemer med renhet grunnet bunnfall (Naidu og Khanna 2000). Konsentrasjonen av klor i løsning avtar over tid. Løsninger på 1 – 2 % som lagres i gjennomskinnelige beholdere vil ha en konsentrasjon på 40 - 50 % av den opprinnelige konsentrasjonen etter 30 dager (Rutala *et al.* 1998). Tapet øker ved eksponering for lys og ved høye temperaturer. Løsninger bør derfor oppbevares mørkt og ved lave temperaturer. Tilstedeværelse av tungmetaller, organisk materiale og løsningens pH påvirker stabiliteten (Dychdala 1983, Simpson og Sofos 2009).

Hypokloritter viser antimikrobielle mekanismer som ligner på dem for molekylært klor (Naidu og Khanna 2000). Klorforbindelser er generelt effektive mot gram-positive og gram-

negative bakterier, syrefaste bakterier, sopp, alger, sporer og virus (Dychdala 1983, McDonnell og Russel 1999, Naidu og Khanna 2000).

Den antimikrobielle effekten er ikke fullt kartlagt, men det er generelt antatt at den antimikrobielle effekten er forårsaket av oksidering (Naidu og Khanna 2000). Effekten virker å være mot strukturelle og funksjonelle proteiner (McDonnell 2007, Knox et al. 1948). Bakterieaggregater er mer motstandsdyktige mot klor enn frie bakterier, men dette er avhengig av styrken av klor og av kontaktiden (Herson *et al.* 1987).

1.4.2 Buffodine®

Buffodine brukes mye ved desinfisering av lakseeegg og inneholder Jod som det aktive virkestoffet. Løsningen inneholder en blanding av jod, ikke-ionske surfaktanter og pH bufferagenter (oppgitt av produsent).

Jod er et oksydasjonsmiddel som kan brukes ved desinfisering og ved sterilisering avhengig av styrke (Madigan 2009). Spesifikk virkningsmekanisme er ikke helt kjent, men jod bindes til proteiner, noe som fører til denaturering. Dette kan foregå på flere måter, ved oksidering av S-H bindinger hos aminosyrer som cystein og metionin og ved å forhindre hydrogenbindinger gjennom reaksjon med N-H grupper hos arginin, histidin, lysin eller hos fenolgruppen hos tyrosin (McDonnell og Russell 1999, Gottardi 2001, Cooper 2007). Jod reagerer også med karbon-karbon bindinger i fettsyrer og hydrogenbindinger i nukleinsyrer forhindres ved jodbinding til nukleotider (Apostolov 1980, Gottardi 2001, Cooper 2007). Jod har følgende et bredt spekter av antimikrobiell aktivitet og inhiberer bakterier, sopp, protozoer og virus (McDonnell og Russell 1999, Gottardi 2001).

Jod er generelt ustabil i vannløsninger og det kan være en kompleks likevekt mellom flere varianter hvor molekylær jod (I_2) antas å være hovedårsaken til den antimikrobielle effekten. Stabiliteten til jodløsninger er avhengig av pH-verdien og økt alkalinitet og lagringstid fører til lavere antimikrobiell aktivitet (McDonnell og Russel 1999, Gottardi 2001, Cooper 2007). Tilførsel av jodoforer, som er komplekser av jod og et hjelpestoff som øker løseligheten, løser denne utfordringen (McDonnell og Russel 1999, Gottardi 2001).

1.4.3 Glutaraldehyd

Glutaraldehyd er et alkylende desinfeksjonsmiddel med et bredspektert aktivitetsområde (Gorman *et al.* 1980, Madigan 2009). Det er et mettet 5-karbon dialdehyd med formel $C_5H_8O_2$. Glutaraldehyd er mer stabile ved lav pH enn ved høy pH, og ved pH på 8 eller høyere taper glutaraldehyd generelt aktivitet innen 4 uker (Russell, Hugo *et al.* 2004). Drapsraten er mye lavere for løsninger med lav pH enn løsninger med høy pH, men med temperaturøkning vil forskjellen minke. Forholdet mellom konsentrasjon, temperatur og pH er følgelig komplekst (Gorman *et al.* 1980).

Lave konsentrasjoner av glutaraldehyd inhiberer spiring av bakterier og høyere konsentrasjoner er sporisidal (McDonnell og Russell 1999). Virkningsmekanismen er ikke fullt kartlagt (Gorman *et al.* 1980, McDonnell og Russell 1999). Glutaraldehyd danner krysslinking av proteiner i celleveggen, den ytre membranen og ellers i cellen (McDonnell og Russell 1999).

1.4.4 Pyceze

Pyceze Vet. er et legemiddel som inneholder Bronopol og brukes mot soppinfeksjoner på laksefisk og rogn (Novartis). Kjemiske studier av interaksjoner av bronopol med cystein, cysteinmetylester og glutation demonstrerte at bronopol virker som en katalyst for oksidering av tiolgrupper til disulfider i nærvær av luft, med rask konsumering av oksygen (Sheperd *et al.* 1988). Bronopol degraderes raskere med økende temperatur, men sollys eller luft har ingen effekt på prosessen (Matczuk *et al.* 2012). Pyceze har vist seg å være effektiv mot sopp hos fisk (Pottinger og Day 1999, Aller-Gancedo og Fregeneda-Grandes 2007). Birkbeck *et al.* (2006) viste at Bronopol hadde effekt på 13 forskjellige bakteriearter funnet på egg fra tosk og kveite. Bronopol har bakteriereduserende effekt på torskeegg ved desinfisering (Treasurer *et al.* 2005).

1.5 Mål med oppgaven

For at *A.tonsa* skal kunne brukes som levende fôr i marine klekkerier er det viktig at bakterieveksten er under kontroll. Det har stor betydning å finne frem til optimale prosedyrer

for desinfisering av copepodeegg slik at skadelige bakterier ikke ødelegger eggene eller blir med over i dyrkningskarene når eggene skal klekkes.

Målet med oppgaven er å finne et egnet desinfiseringsmiddel med bakteriedrepende effekt og en desinfeksjonsmetode som ikke skader eggene.

2 Material og metode

Forsøkene ble gjennomført ved NTNU Senter for fiskeri og havbruk (Sealab) og SINTEF Fiskeri og havbruk, 2011.

Det ble gjennomført fire forsøk med desinfisering av copepodeegg og effekten av forskjellige desinfeksjonsmidler ble målt ved registrering av prosentandel copepodeegg med bakterievekst på agar og prosentandel copepodeegg som klekte. Desinfeksjonsmidlene som ble utprøvd i disse eksperimentene var:

- Pyceze (Novartis) bronopol 500 mg/ml
- Glutaraldehyd (vwr international) 25% glutaraldehyd
- Natriumhypokloritt 10-15 % aktivt klor
- Buffodine (Evans Vanodine International Ltd): 1 % aktivt iod

Det ble deretter gjennomført ett forsøk hvor det ble sett på lagring av egg som var desinfisert. Det benyttet glutaraldehyd og Buffodine av desinfiseringsmiddel og effekten av behandlingen ble registrert ved samme metode som de første forsøkene.

2.1 Produksjon av copepodeegg og mikroalger.

Sjøvann som ble benyttet til dyrkning av *Acartia tonsa* og under forsøkene var hentet opp fra Trondheimsfjorden ved 70 meters dyp, 800 meter fra land. Vannet var sandfiltrert, UV-behandlet og luftet før bruk.

2.1.1 Dyrking av *A. tonsa*

A. tonsa ble kultivert i en sylindrisk tank med et vannvolum på 1000 L og med 100 % vannutskiftning per døgn. I tanken var det montert slanger med lufting som ble regulert slik at oksygenkonsentrasjonen holdt seg over 60 % metning. Temperaturen i karet ble målt daglig og var 19 – 20 °C. Kulturen ble føret kontinuerlig med alger (*Rhodomonas baltica*) som ble pumpet inn i tanken ved en hastighet som var justert slik at algetettheten skulle være 30 000 celler ml⁻¹.

Tanken hadde påmontert en røkterarm som i løpet av 20 minutter gikk en runde i bunnen og samlet egg og organisk materiale. Dette ble sifonert ut av tanken med hevert som forsiktig ble ført rundt røkterarmen. Eggene ble deretter vasket i filtrert sjøvann (1 μm filtrert) i en sil med maskestørrelse på 120 μm slik at alt materiale større enn dette ble fjernet. Denne prosedyren ble gjentatt en gang til før eggene ble vasket i en sil med maskestørrelse på 64 μm og skylt med sjøvann til fargen på vannet som gikk gjennom silen var blankt og eggene hadde en klar blå farge. Eggene ble så samlet i en nunc EasyFlasktm Nunclontm flaske (200 ml) og fylt opp med sjøvann. Copepodeegg som ikke ble brukt med en gang ble lagret i kjøleskap med temperatur på 2-4 °C.

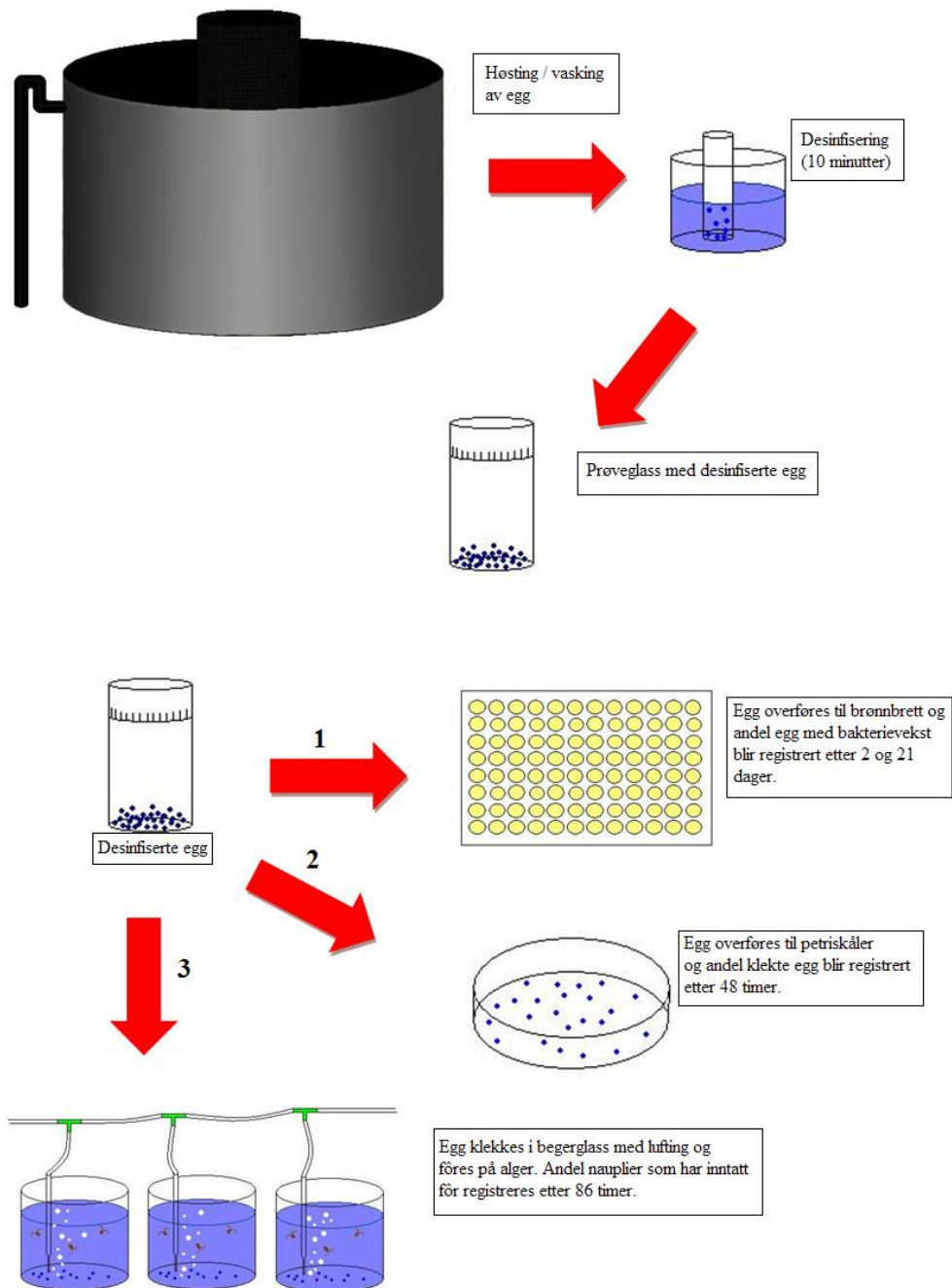
2.1.2 Dyrking av *Rhodomonas baltica*

R. baltica ble brukt som fôr til både eggproduksjon i copepodekulturene og under forsøkene. *R. baltica* ble dyrket i rør av polykarbonat med volum på 200 L eller 160 L. Algerørene var omgitt av 6 fluorescens lysrør (58 W) på 3 sider og ble daglig tynnet 40-50 % slik at celletettheten var mellom 1-1,5 millioner celler ml^{-1} . Algene ble høstet ved å feste en slange under rørene og den ønskede mengde alger ble høstet til bruk. Tilsvarende mengde sjøvann fra et vannreservar ble deretter tilsatt sammen med 1 ml Conwy (Walne 1974) medium per liter vann.

Sjøvann som skulle brukes i algeproduksjonen ble samlet i et vannreservoar og desinfisert ved å tilsette 25 ml natriumhypokloritt (10 – 15 %) per 100 L vann. Vannet ble avklorert etter minimum 5 timer ved at det ble tilsatt 3 g natriumthiosulfat pentahydrat per 100 L vann. Det ble deretter satt på sterk lufting ved bunnen av reservoaret i minst 5 timer. Algekulturene ble fornyet hver andre uke. Til dette ble en kultur av 10 L *R. baltica* med tetthet på minst 2-3 millioner celler ml^{-1} fra stamkultur tilsatt ett rør med 150 liter sjøvann og tilsvarende mengde Conwy medium. Målinger av pH-verdi i algekulturene ble gjort daglig og CO_2 mengden i luftingen ble justert slik at pH verdien ble holdt innenfor 7,5 og 8,7.

2.2 Eksperimentelt oppsett

Figur 2.1 viser skjematisk oversikt over forsøksoppsettet.



Figur 2.1 Skjematisk oversikt som viser prosedyren fra copepodeeggene ble høstet og desinfisert til uttak av egg for brønnbrett med agar, klekketester og klekking av nauplier til viabilitetstester.

Egg fra *A. tonsa* ble desinfisert med fire forskjellige desinfeksjonsmidler. Midlenes effekt ble målt ved å registrere andel egg med bakterievekst, eggens klekkesuksess og nauplienes viabilitet. Samtlige egg som ble brukt i de 4 desinfeksjonsforsøkene var dagferske og ble høstet fra samme kultur, men på forskjellige tidspunkt av copepodenes produksjonssyklus.

De fire desinfeksjonsmidlene som ble utprøvd var Pyceze, glutaraldehyd, Natriumhypoklorid og Buffodine. Hvilke doser som ble brukt av de ulike desinfeksjonsmidlene er vist i Tabell 2.1. Framgangsmåten var lik ved uttesting av samtlige desinfeksjonsmidler. Eggene som ble brukt i lagringseksperimentet var høstet 5 dager før forsøksstart.

Alle egg-gruppene ble behandlet likt, med unntak av kontroll-gruppen som ble lagret på isbad etter høsting / vasking og fram til prøvene for bakterievekst ble tatt ut. Fra det tidspunktet var behandlingen lik.

Ved samtlige forsøk ble eggene først desinfisert før det ble tatt ut egg til inkubering i agar og egg til klekketester. Under desinfiseringsforsøkene ble de resterende eggene satt til klekking og føret med alger slik at det kunne bli vurdert hvorvidt naupliene var levedyktige.

2.2.1 Desinfisering og desinfiseringsmidler

Samtlige forsøk hvor det ble prøvd forskjellige desinfiseringsmidler ble gjennomført med samme metoder, men med ulike konsentrasjoner tilsatt (Tabell 2.1).

Tabell 2.1 Oversikt av hvilke desinfeksjonsmidler og doser som ble brukt under forsøkene.

	Kontroll	Konsentrasjoner (mg/L)						
Pyceze	0	0	25	50	100	200	400	800
Glutaraldehyd	0	0	100	200	400	800	1600	3200
Hypokloritt	0	0	50	100	200	400	800	1600
Buffodine	0	0	50	100	200	400	800	1600

Alt sjøvann som ble brukt under desinfiseringsarbeidet var filtrert (1 μm) og autoklavert. Desinfeksjonsløsning ble laget ved å blande sjøvann til en stamløsning som tilsvarte konsentrasjon av desinfeksjonsmiddel i den høyeste aktuelle dosen og deretter tynnet ut med sjøvann til de forskjellige løsningene (Tabell 2.1). Arbeidet ble utført i avtrekkskap som var vasket med 70 % etanol før start. Prøveglassene med copepodeegg ble plassert i vann iblandet is både før og etter behandling. Temperaturen i isbadet ble målt til 4 - 5,5 $^{\circ}\text{C}$ og noe av vannet ble tømt ut og erstattet med is gjentatte ganger for å holde temperaturen lav og relativt jevn. 50 ml desinfeksjonsløsning ble helt i plastkopper som var innpakket i plast fra fabrikanten og antas relativt rene på forhånd. De ble vasket med sprit på utsiden og på innsiden var desinfeksjonsløsningen slik at desinfeksjonsmiddelet ville fjerne eventuelle bakterier i koppene. Flasker, begerglass og målebeger ble først vasket og så autoklavert før forsøk og det ble brukt engangspipetter som var autoklavert på forhånd.

Under desinfisering var eggene plassert i siler som var laget ved å sage bunnen av prøveglass av polystyren, for så å smelte på en planktonduk (64 μm , nylon) ved hjelp av strykejern.

Disse kunne ikke autoklaveres og ble derfor dyppet i etanol, tørket og deretter dyppet i autoklavert sjøvann før forsøkstart.

550 µl av sjøvann iblandet copepodeegg (estimert antall) ble tilført til de forskjellige desinfeksjonsløsningene. Dosene som ble brukt av de ulike desinfeksjonsmidlene er vist i Tabell 2.1. Eggene var i desinfeksjonsløsning i 10 minutter og silene ble beveget 2 ganger per minutt. Når eggene var ferdig desinfisert ble de skylt 5 ganger med sjøvann før de ble skylt over i autoklaverte dramsglass sammen med sjøvann. De ferdigbehandlede eggene ble holdt i isvann.

2.2.2 Forbredelse av bakterieagar

Agar ble laget til før forsøkstart og det ble benyttet 3 agartyper under forsøkene;

- Difco™ Marine agar
- CM 0559 Pseudomonas agar base (Oxoid)
- Difco™ Thiosulfate Citrate Bile Salts Sugrose agar(TCBS)

Samtlige agartyper ble laget til ut fra beskrivelse oppgitt av fabrikant på emballasjen, med unntak av Pseudomonas agar hvor det ble brukt 80 % sjøvann og 20 % destillert vann, i stedet for bare destillert vann som var oppgitt på forpakningen.

Ferdigblandet og avtemperert agar ble pipettert over i sterile brønnbrett (Nunc) med 96 brønner. Etter at agaren hadde stivnet ble de dekket av sterile lokk eller plast. Dette arbeidet foregikk på sterilbenk og brønnbrettene ble så oppbevart ved 15 °C inntil bruk.

2.2.3 Bakterietester

Det ble benyttet to forskjellige sterilbenker under forsøkene. Sterilbenk utstyrt med UV belysning ble benyttet under forsøk med glutaraldehyd, natriumhypokloritt og Buffodine og sterilbenk uten UV belysning ble benyttet under forsøk med Pyceze og under lagringsforsøket. Sterilskapet ble vasket med 70 % etanol og UV belysning (når tilgjengelig) var slått på minst 30 minutter før arbeidet ble startet. Av utstyr ble det brukt tilbredte

brønnbrett med agar, forhåndsterile plastpipetter, stereolupe (som ble vasket med sprit før arbeidsstart), små petriskåler i sterile pakninger samt en flaske med etanol. Arbeidsflaten ble tørket med etanol gjentatte ganger under arbeidet. Det samme ble utstyr som ble brukt under arbeid. Da prøveglassene som inneholdt desinfiserte copepodeegg ble plassert på benken ble de tørket over med sprit og satt på motsatt side fra resten av utstyret. Prøveglassene ble oppbevart i isbad med unntak av da de var plassert på sterilbenken.

Ved uttak av desinfiserte egg fra prøveglassene ble glassene ristet og noen ml ble overført til en petriskål under stereolupen, hvor tilfeldige egg ble plukket ut enkeltvis med pipette og overført til brønnbrett. Fra hver prøve av egg som var behandlet med Pyceze og glutaraldehyd ble det pipettert ut 10 egg til brønner som inneholdt marine agar, 3 egg til brønner som inneholdt TCBS agar og 3 egg til brønner som inneholdt Pseudomonas agar. Fra hver prøve av egg som var behandlet med Buffodine og natriumhypokloritt ble det pipettert ut 11 egg til brønner som inneholdt marine agar, 4 egg til brønner som inneholdt TCBS agar og 4 egg til brønner som inneholdt Pseudomonas agar. Dette ble gjort fordi det ble erfart at i enkelte tilfeller kunne egget sitte igjen i pipetten i stedet for i brønnen eller at det ved en feil ble overført ekstra egg til brønnen. Det ekstra egget fungerte dermed som reserve og ble oversett med mindre det ble observert feil i antall egg i brønnen. Det ble benyttet nye pipettespisser for hver pipettering.

Brønnbrettene ble inkubert på 15 °C i en Sanyo incubator og antall egg med bakterievekst ble registrert ved dag 2 og dag 21 etter start.

2.2.4 Klekkesuksess hos nauplier

Det ble tatt ut 50 µl en eller flere ganger fra bunnen av prøveglasset som inneholdt copepodeegg som var sedimentert, og ført over til en petriskål som var plassert under et stereomikroskop (Leica MZ 12.5) med kamera (Sony DFW-SX900) som var tilkoblet en datamaskin. Det ble tatt bilde av eggene i petriskålen ved bruk av programvaren Fire-I Application software. Disse bildene ble senere brukt for å telle antall copepodeegg i klekkestestene. Det ble deretter tilsatt 10 ml sjøvann og petriskålen ble lukket, tett med parafilm og plassert under konstant belysning i 48 timer ved 22°C (Peck *et al.* 2006). Det ble tatt fire klekkestester fra hvert prøveglass.

Etter 48 timer ble det tilsatt noen dråper Lugols løsning i hver petriskål med klekte / uklekte egg før de igjen ble tettet med parafilm og lagret fram til analyse. Antall klekte nauplier ble registrert under stereomikroskop (Leica M80) ved bruk av en håndteller og samtidig fjernet fra prøven ved bruk av en glasspipette som var koblet til en peristal pumpe (ALITEA SX-Mini). Prosentandel av klekte nauplier ble bestemt ved formelen:

$$\text{Klekkeprosent} = (\text{Antall klekte naupliier} / \text{antall egg}) \times 100$$

2.2.5 Viabilitet av nauplier (*A.tonsa*)

Nauplienes levedyktighet ble brukt som en indikasjon på hvorvidt copepodeeggene tålte de ulike behandlingene. I denne oppgaven ble antall nauplier som hadde inntatt alger (*R.baltica*) brukt som mål på viabilitet.

Copepodeegg ble plassert i begerglass av plast som inneholdt 500 ml filtrert sjøvann (1 μm). Hvert begerglass ble tilført svak lufting gjennom et system som var laget ved å koble plastslanger og glasspipetter sammen, for slik å bedre sirkulasjonen av sjøvann og alger i begerglassene. Det ble tilsatt mikroalger (*R.baltica*) 2 ganger per dag. Tettheten av *R.baltica* ble holdt over 9000 celler ml^{-1} (Skogstad, 2010) og ble målt ved å ta tilfeldige stikkprøver fra begrene. Tettheten av alger ble målt ved bruk av en Multisizertm 3 Coulter Counter, og algetettheten ble justert opp hvis den var for lav.

Etter 86 timer ble naupliene oppkonsentrert ved å helle innholdet fra begerglassene ned i siler og ført over til prøveglass. Naupliene ble bedøvd med tricain methansulfonat (MS222, Finquel). Etter noen minutter ble prøvene ristet før det ble pipettert ut prøver over i et tellebrett med 4 langsgående brønner. I stereomikroskop (Leica M80) ble de 50 første tilfeldige naupliene registrert. Naupli som inneholdt spor av alger i tarmen ble registrert som de hadde inntatt føde.

2.3 Lagringsforsøk

Etter forsøkene med desinfiseringsmidler var gjennomført ble det utført et lagringsforsøk med varighet 31 dager. Formålet var å få en indikasjon på hvor effektivt desinfisering av

copepodeegg var før lagring ved å sammenligne behandlede copepodeegg (*A.tonsa*) med ubehandlede egg. Eggene som ble brukt i dette forsøket var høstet 5 dager før forsøket ble startet. I følge Drillet, Iversen et al. (2006) har ikke lagring av egg i lav temperatur ved varighet under 2 uker noen merkbar effekt på eggenes viabilitet, og egg som brukes innenfor dette tidsintervallet kan dermed anses som ferske. Det ble inkubert 3 replikater som i tidligere eksperimenter.

Desinfisering, bakterietester og klekketester ble alle gjennomført med samme metode som er beskrevet i avsnitt 2.2.1-2.2.4 med mindre annet er nevnt. Av praktiske årsaker ble det ikke sett på viabilitet i dette forsøket. Anoksisk sjøvann ble laget med en metode brukt av Hagemann (2011) og står nærmere beskrevet i avsnitt 2.3.1. Behandlingene som ble gjennomført er samlet i Tabell 2.2.

Tabell 2.2 Oversikt over hvilke behandlingene som ble brukt i lagringsforsøket.

L1: Kontroll, lagret i sjøvann.
L2: Desinfisert med glutaraldehyd (200 mg/L), lagret i sjøvann.
L3: Desinfisert med glutaraldehyd(200 mg/L), lagret i anoksisk sjøvann.
L4: Desinfisert med glutaraldehyd(200 mg/L) og Buffodine(1600 mg/L), lagret i anoksisk sjøvann.

Gruppe L1 (kontroll) var ubehandlede egg som ble lagret i 1 µm filtrert sjøvann.

Gruppe L2 bestod av egg som var desinfisert i glutaraldehyd (200 mg/L), før de ble lagret i 1 µm filtrert autoklavert sjøvann.

Gruppe L3 bestod også av egg som var desinfisert i glutaraldehyd, men de ble lagret i 1 µm filtrert anoksisk autoklavert sjøvann.

Gruppe L4 ble desinfisert i glutaraldehyd på samme måte som de andre, men etter 30 minutter ble de samme eggene også desinfisert i Buffodine (1600 mg/L) før prøvene ble lagret i 1 µm filtrert, anoksisk autoklavert sjøvann.

Både behandlede og ubehandlede egg som ble brukt til bakterietester og klekketester før lagring ble overført til egne prøveglass som inneholdt filtrert sjøvann for kontroll (L1) og filtrert autoklavert sjøvann for de resterende gruppene med egg. De ble holdt i isbad fram til prøvene som skulle til lagring var unnagjort. Det ble overført egg til brønnbrett med agar og til klempeprøver ved samme metode som er beskrevet tidligere i denne oppgaven. Eggene i behandling L2 og L3 ble separert først da de ble satt til lagring siden prosedyren var den samme for begge gruppene fram til da, noe som også betyr at det første prøveuttaket ble gjennomført før dette og er derfor lik hos disse to gruppene.

Ferdigbehandlede copepodeegg ble overført til prøveglass som deretter ble fylt med sjøvann som var klargjort i henhold til Tabell 2.2. Etter de første prøvene var klargjorte ble de holdt i isbad fram til samtlige egg var behandlet og klargjort for lagring. Eggene ble lagret i 31 dager i 2 – 4 °C i mørket i kjøleskap (Sanyo medicool).

Etter lagringsperioden ble det tatt prøver for å bestemme andel egg med bakterievekst og andel klekte egg. Alle bakterietester ble lagret på 15 °C, men som følge av en rutinesvikt var bakterietestene fra de lagrete behandlingene inkubert ved 20 – 22 °C i de 2 første døgnene av inkubasjonstiden. Antall egg med bakterievekst ble telt ved dag 2 og dag 21.

2.3.1 Vannbehandling

Anoksisk sjøvann ble laget etter metoden beskrevet av Hagemann (2011), men med noen modifikasjoner da dette sjøvannet skulle være bakteriefritt. Filtrert sjøvann ble først

autoklavert og deretter ilagt en slange påmontert en oksygenstein, som var koblet til en N₂-flaske. Det ble plassert aluminiumsfolie over flasken for å gjøre systemet noe mindre åpent og sjøvannet ble tilført N₂ i 20 minutter. Dette ble utført i avtrekkskap som var vasket og tørket med etanol før start. Slangen, oksygensteinen og folien var autoklavert før arbeidet startet. Det var også på forhånd målt oksygenmetning etter forskjellige tider når sjøvann ble tilsatt N₂. Det var ikke mulig å få det helt oksygenfritt ved å bruke denne metoden, da systemet ikke er lukket før etter prøvene er tett, men det antas at oksygenet ble oppbrukt i løpet av kort tid etter lagringstart.

2.4 Statistikk

Alle resultater er basert på kategorisk data da alle individene i forsøkene ble plassert i en av to kategorier; klekte eller ikke klekte egg, egg med eller uten bakterievekst og nauplier med eller uten spor av *R.baltica* i tarmen. Det ble derfor benyttet statistiske tester som passer for denne type data. Alle statistiske analyser av andeler av copepodeegg med bakterievekst ble utelukkende gjort ved fishers exact test. Kjikvadrattest ble brukt ved viabilitet og ved andel klekte nauplier. Det ble testet med 1 frihetsgrad(df) hvis ikke annet er oppgitt. Disse statistiske testene er gjort på summert rådata og ikke på gjennomsnitt. For å beskrive trenden ble det kjørt en linear regresjons analyse på data fra klekkesuksess og viabilitet. Her ble prosent fra de individuelle replikatene plottet inn og resultatene fra denne analysen er samlet i Tabell 3.1. Signifikansnivået er 0,05 i hele oppgaven. Alle figurer og statistiske tester ble gjort i SigmaPlot 12.0. I figurene er data presentert som gjennomsnitt med konfidensintervall.

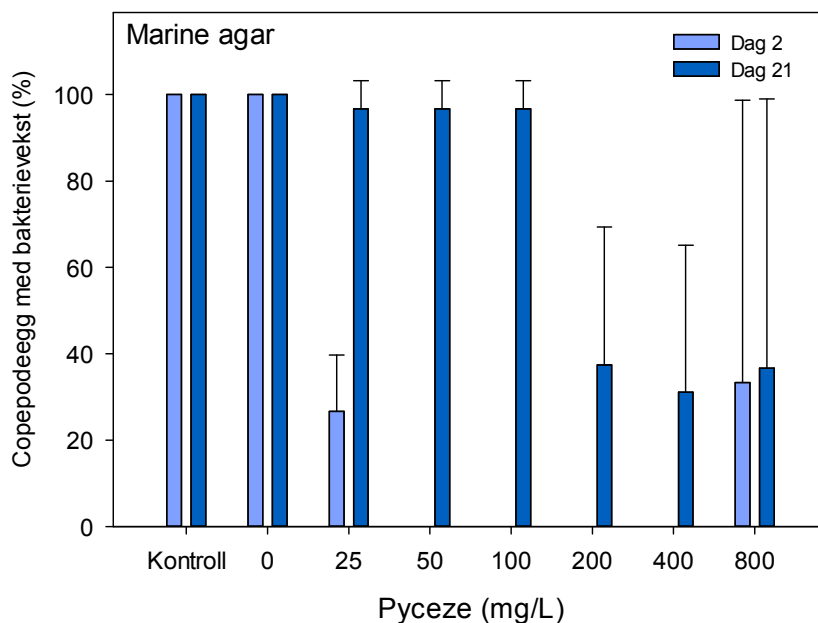
3 Resultater

3.1 Desinfisering av copepodeegg med Pyceze

Andel egg med bakterievekst på marine agar etter desinfeksjon i 0-800 mg/L Pyceze er vist i Figur 3.1. Ved dag 2 ble det observert bakterievekst på samtlige egg fra kontroll (ubehandlede egg) og fra 0-gruppen (egg som ble håndtert likt som de desinfiserte eggene, men uten desinfeksjonsmiddel). Det var 26,7 % egg med bakterievekst som var behandlet i 25 mg/L og 33,3 % egg med bakterievekst som var behandlet i 800 mg/L. På egg som var desinfisert i 800 mg/L ble det funnet 100 % egg med bakterievekst hos ett replikat og ingen bakterievekst på de to resterende.

Ved dag 21 var det bakterievekst å finne ved samtlige dosestyrker. Egg som var behandlet i 25 - 100 mg/L hadde alle 96,7 % egg med bakterievekst. Hos egg som var desinfisert i 200 mg/L var andelen med bakterievekst 37,4 %, med 400 mg /L var andelen egg med bakterievekst 31,1 % og ved 800 mg/L, 36,7 %.

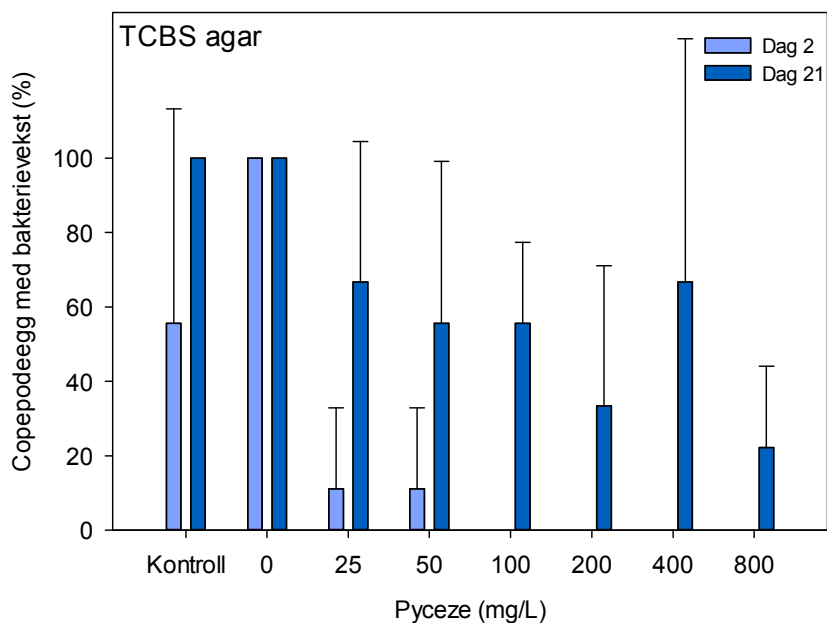
Ved de sterkeste dosene var reduksjonen av prosentandelene av egg med bakterievekst mellom 60 – 70 %. Andel egg med bakterievekst hos gruppene som var behandlet med Pyceze i konsentrasjoner 200 - 800 mg/L var signifikant redusert ($P = <0,001$).



Figur 3.1 Andel copepodeegg med bakterievekst i Marine agar ved dag 2 og dag 21 (+/- 95 % CI, n = 3 og inneholdt 9 – 10 egg).

På TCBS agar var det ingen av behandlingene som resulterte i totalt fravær av bakterievekst ved dag 21. Høye doser av Pyceze førte til færre egg med bakterievekst (Figur 3.2). I kontrollgruppen ved dag 2 var det 55,6 % egg med bakterievekst, noe som hadde økt til 100 % ved dag 21. Av egg som var behandlet i 0 mg/L hadde 100 % bakterievekst ved dag 2 og dag 21. Fra gruppene som var behandlet med 25 og 50 mg/L var andelen egg med bakterievekst 11,1 % ved dag 2, mens hos egg desinfisert i 100 mg/L eller høyere ble det ikke registrert bakterievekst i TCBS etter 2 dager. Ved dag 21 var andelen egg med bakterievekst økt til 66,7 % hos gruppen som var behandlet med 25 mg/L og til 55,6 % egg med bakterievekst hos gruppene som var behandlet med 50 mg/L og 100 mg/L. Andelen egg med bakterievekst var 33,3 % for egg som var behandlet i 200 mg/L, 66,7 % for egg som var behandlet i 400 mg/L og 22,2 % for egg som var behandlet i 800 mg/L.

Selv om desinfisering med Pyceze ga reduksjon av andel egg med bakterievekst på TCBS hos samtlige grupper, var det bare hos gruppene som var behandlet i 200 mg/L ($P = 0,026$) og 800 mg/L at reduksjonen var signifikant ($P = 0,002$).

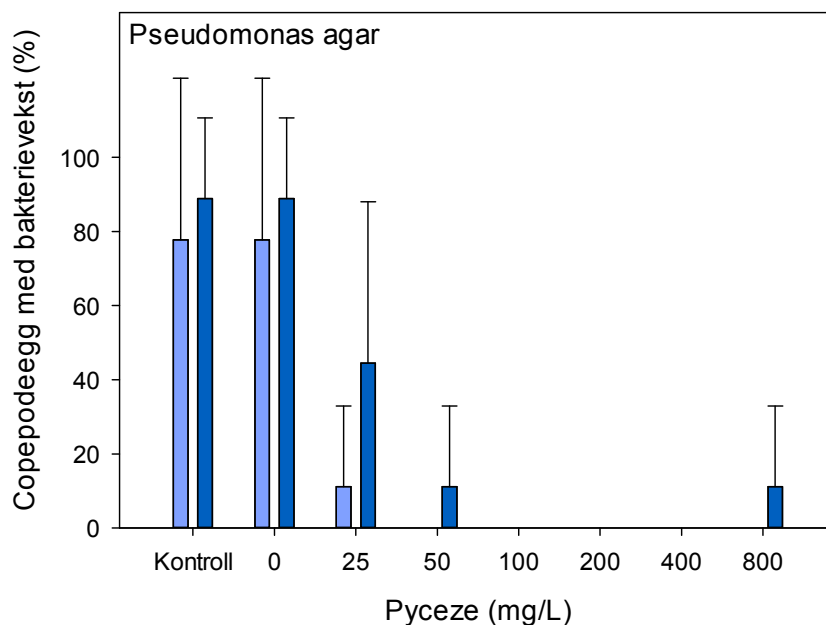


Figur 3.2 Andel copepodeegg med bakterievekst i TCBS agar ved dag 2 og dag 21 (+/- 95 % CI, n = 3 og hvert replikat bestod av 3 egg, med unntak av det ene replikatet i kontrollgruppen som bestod av 2).

På *Pseudomonas* agar var andelen egg med bakterievekst lavere sammenlignet med de to andre agartypene (Figur 3.3). Ved en dosestyrke på 25 mg/L var andelen egg med bakterievekst redusert med 44,5 % sammenlignet med kontrollgruppen og ved høyere dosestyrker var reduksjonen enda mer markant.

Ved dag 2 var det bakterievekst på 77,8 % av eggene fra både Kontrollgruppen og fra 0 – gruppen og ved dag 21 hadde dette økt til 88,9 %. Hos egg behandlet med den laveste konsentrasjonen (25 mg/L) ble det registrert 11,1 % egg med bakterier ved dag 2 og 44,4 % ved dag 21. Hos resten av copepodeeggene ble det ikke registrert noen bakterievekst ved dag 2, men ved dag 21 var det 11,1 % egg med bakterievekst fra gruppene som var behandlet i 50 mg/L og 800 mg/L.

Andelen egg med bakterievekst hos gruppen som var behandlet i 25 mg/L var ikke signifikant forskjellig fra kontroll ($P = 0,131$). Hos gruppene som var behandlet i 50 - 800 mg/L var andelen egg med bakterievekst signifikant forskjellig fra kontroll ($P = 0,003$).



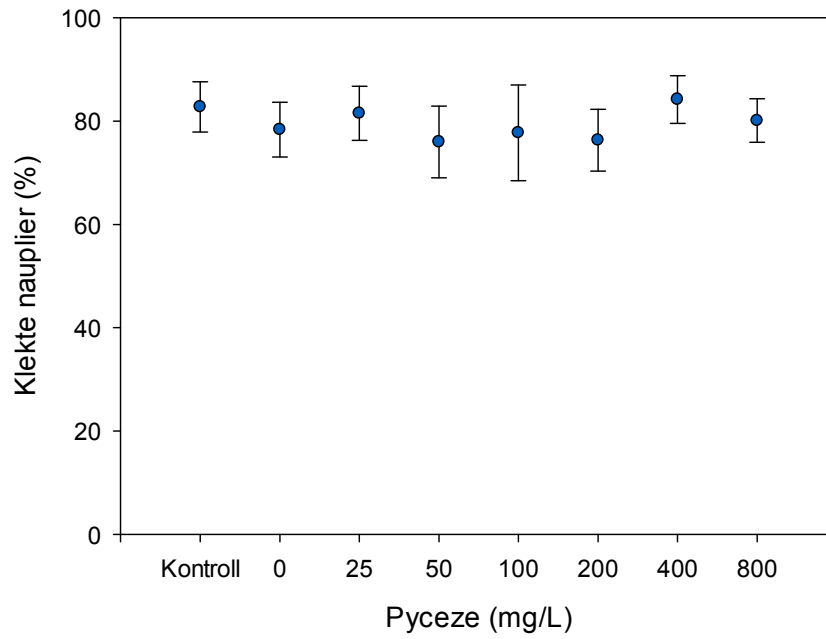
Figur 3.3 Andel av egg, behandlet i Pyceze, med bakterievekst på Pseudomonas agar ved dag 2 og dag 21 (+/- 95 % CI, n = 3 og hvert replikat bestod av 3 egg).

3.1.1 Klekkesuksess hos nauplier fra egg desinfisert med Pyceze

Klekkeprosenten av naupliene ved ulike konsentrasjoner av Pyceze er vist i Figur 3.4 og viste variabel klekking mellom 76 % og 84,2 %. Fra kontroll var andel klekte nauplier 82,8 % og fra 0-gruppen var andelen klekte nauplier 78,4 %. Dosestyrkene av Pyceze som ga egg med lavest klekkeprosent (76 % - 77,7 %) var 50 – 200 mg/L og dosestyrkene som hadde de høyeste klekkeprosentene (81,5 % og 84,2 %) var 25 mg/L og 400 mg/L.

Det var generelt liten variasjon mellom gruppene, men det ble funnet signifikante forskjeller av andel klekte nauplier sammenlignet med kontroll hos 0-gruppen og gruppene som ble desinfisert i 50 mg/L, 200 mg/L og 800 mg/L ($P \leq 0,005$).

Trenden viste en svak nedgang i klekkesuksess ved økende dosestyrker ($k = -0,0079$), men denne nedgangen var ikke signifikant ($P \geq 0,05$, Tabell 3.1).



Figur 3.4 Andel klekte nauplier etter gjennomført desinfeksjon (\pm 95 % CI, $n = 7 - 12$ og antall egg varierte fra 26 til 402).

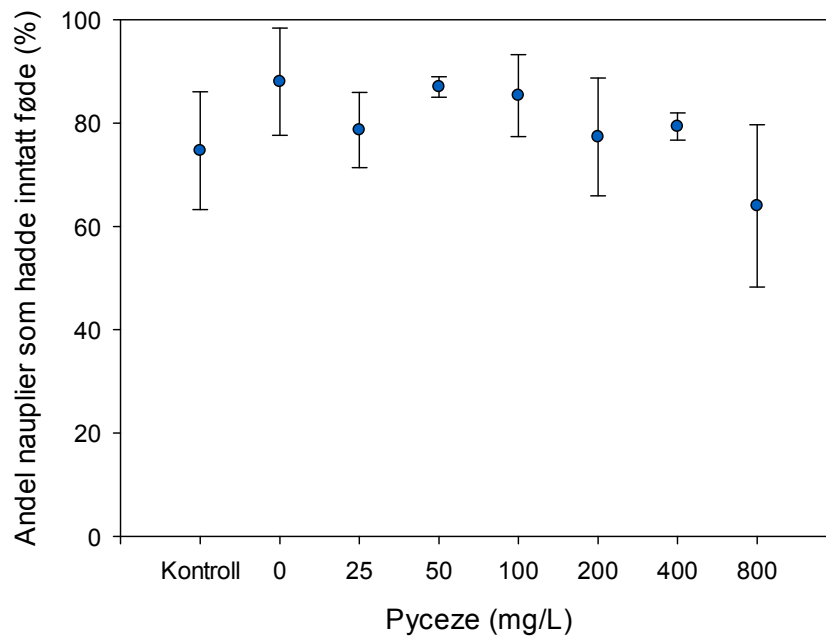
Tabell 3.1 Ligninger, t, r^2 og P verdier for klekkesuksess og viabilitet for samtlige desinfeksjonsmidler funnet ved lineær regressjon.

		Ligning	r^2	P
Pyceze	Klekkesuksess	$Y = 79.4 - (0.00794 * X)$	0,0203	> 0,05
	Viabilitet	$Y = 83.1 - (0.0198 * X)$	0,255	< 0,05
Glutaraldehyd	Klekkesuksess	$Y = 79.7 - (0.00383 * X)$	0,0966	< 0,01
	Viabilitet	$Y = 85.0 + (0.00138 * X)$	0,0624	> 0,05
Natriumhypokloritt	Klekkesuksess	$Y = 65.5 - (0.0123 * X)$	0,255	< 0,001
	Viabilitet	$Y = 75.6 + (0.0119 * X)$	0,0687	> 0,05
Buffodine	Klekkesuksess	$Y = 49.2 + (0.00124 * X)$	0,00480	> 0,05
	Viabilitet	$Y = 76.6 + (0.00186 * X)$	0,00385	> 0,05

3.1.2 Viabilitet hos nauplier fra egg desinfisert i Pyceze

Andel nauplier som hadde inntatt fôr 86 timer etter desinfisering i Pyceze varierte mellom 64 % og 88 % (**Figur 3.5**). Andelen nauplier som hadde inntatt fôr var lavest hos den gruppen som var behandlet i den høyeste konsentrasjonen av Pyceze (800 mg/L). Hos de resterende gruppene var andelen nauplier som hadde inntatt fôr høyere ved alle behandlinger sammenlignet med kontroll. I kontrollgruppen var andelen av nauplier som hadde inntatt fôr 74,7 % og hos nauplier som var behandlet i 0 mg/L var andelen nauplier som hadde inntatt fôr 88 %.

Sammenlignet med kontroll var andelen nauplier som hadde inntatt fôr signifikant høyere hos gruppene som var behandlet i 0 mg/L ($P = 0,003$), 50 mg/L ($P = 0,018$) og 100 mg/L ($P = 0,021$). Hos de resterende gruppene var ikke forskjellen i andel nauplier som hadde inntatt fôr signifikant forskjellig fra kontrollgruppen. Trenden var at viabiliteten var signifikant lavere ved høyere dosestyrker ($k = -0,020$, $P < 0,05$, Tabell 3.1).

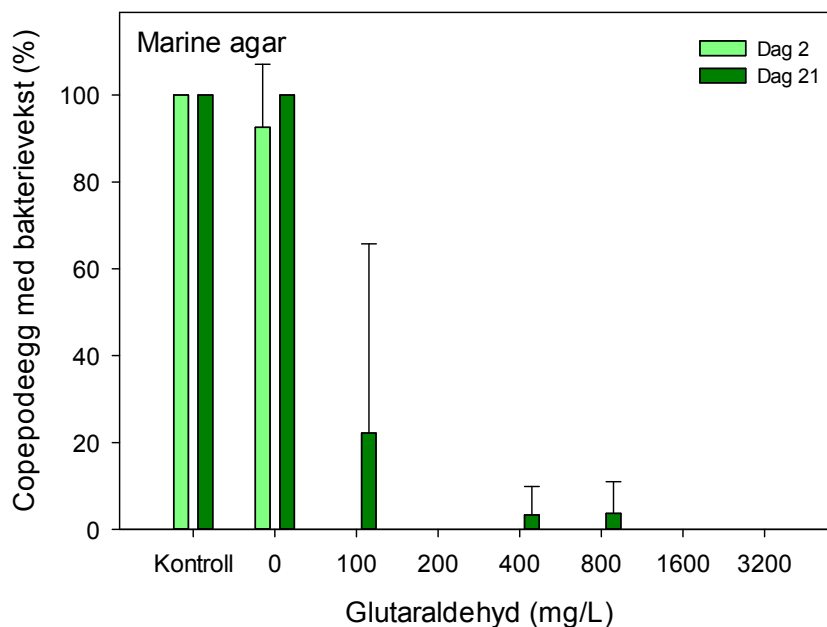


Figur 3.5 Andel nauplier som hadde *R. baltica* i tarmen 86 timer etter desinfeksjonsprosedyrene ble utført (+/- 95 % CI, n = 3 og består av 50 nauplier, med unntak av ved dose 50 mg/L og 800 mg/L hvor antall replikater var 2).

3.2 Desinfisering av copepodeegg med glutaraldehyd

Desinfeksjon av copepodeegg med glutaraldehyd (100-3200 mg/L) førte til en sterk reduksjon av andel egg med bakterievekst ved alle dosestyrker når de ble overført til Marine agar. Ved dag 2 hadde 100 % av eggene fra kontroll og 92,6 % av eggene fra 0-gruppen bakterievekst. ($P = 0,229$), noe som økte til 100 % ved dag 21. Det var ingen bakterievekst hos noen av eggene som var desinfisert i 100-3200 mg/L ved dag 2, men ved dag 21 hadde andelen egg med bakterievekst økt til 22,2 % hos gruppen som var desinfisert i 100 mg/L, 3,3 % hos gruppen desinfisert i 400 mg/L og 3,7 % hos gruppen som var desinfisert i 800 mg/L.

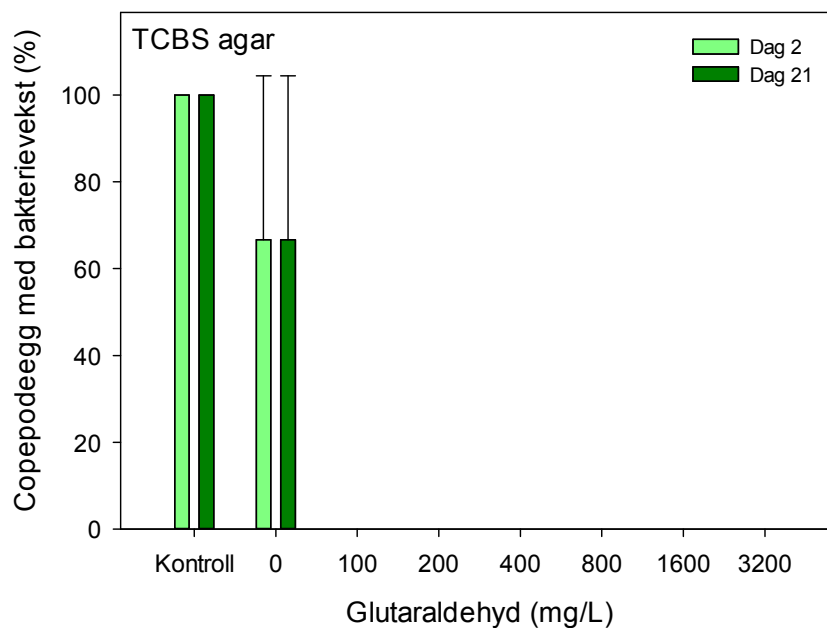
Den bakteriereduserende effekten var signifikant ved alle dosestyrkene av Glutaraldehyd ($P \leq 0,001$). Det var ingen signifikante forskjeller i andel egg med bakterievekst hos egg desinfisert i 200 mg/L og høyere doser ($P \geq 0,492$).



Figur 3.6 Andel copepodeegg med bakterievekst i Marine agar ved dag 2 og dag 21 (+/- 95 % CI, n = 3, 9 – 10 egg i hvert replikat).

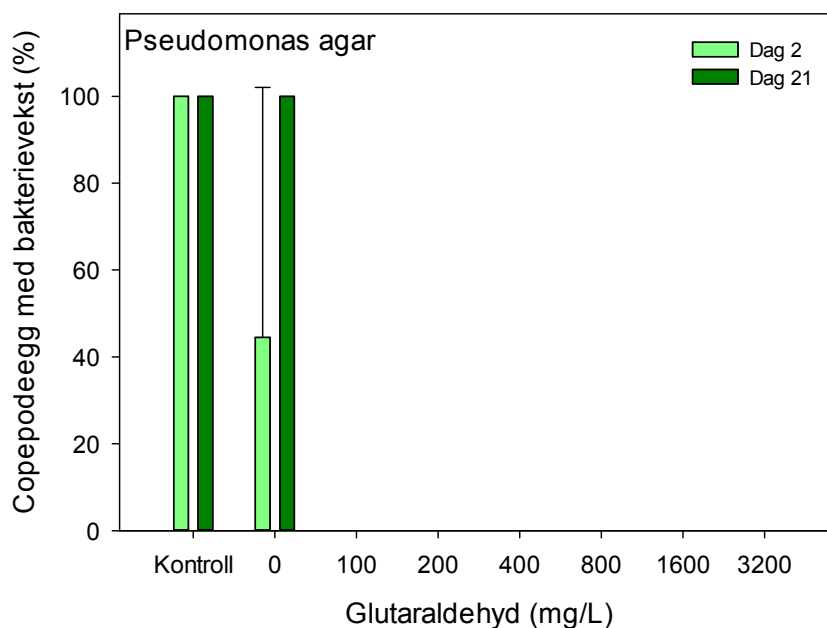
På TCBS agar var den bakteriereduserende effekten av Glutaraldehyd tydelig da det bare var egg fra kontroll og egg fra 0-gruppen som hadde bakterievekst (Figur 3.7). Både ved dag 2 og

21 var andelen egg med bakterievekst 100 % hos kontroll og 66,7 % hos 0-gruppen. Det ble ikke registrert egg med bakterievekst ved dag 2 og dag 21 hos noen av gruppene som var desinfisert i 100 mg/L eller ved høyere doser. Forskjellen i andel av egg med bakterievekst hos 0-gruppen og kontrollgruppen var ikke signifikant ($P = 0,206$).



Figur 3.7 Andel copepodeegg med bakterievekst i TCBS agar ved dag 2 og dag 21 (+/- 95 % CI, $n = 3$ og består av 3 egg hver).

Det ble heller ikke registrert egg med bakterievekst på dag 2 og dag 21 på Pseudomonas agar fra noen av gruppene desinfisert i Glutaraldehyd (Figur 3.8). Hos kontroll var andelen egg med bakterievekst 100 % ved dag 2 og hos gruppen behandlet i 0 mg/L var andelen egg med bakterievekst 44,4 % ved dag 2, noe som var økt til 100 % ved dag 21.

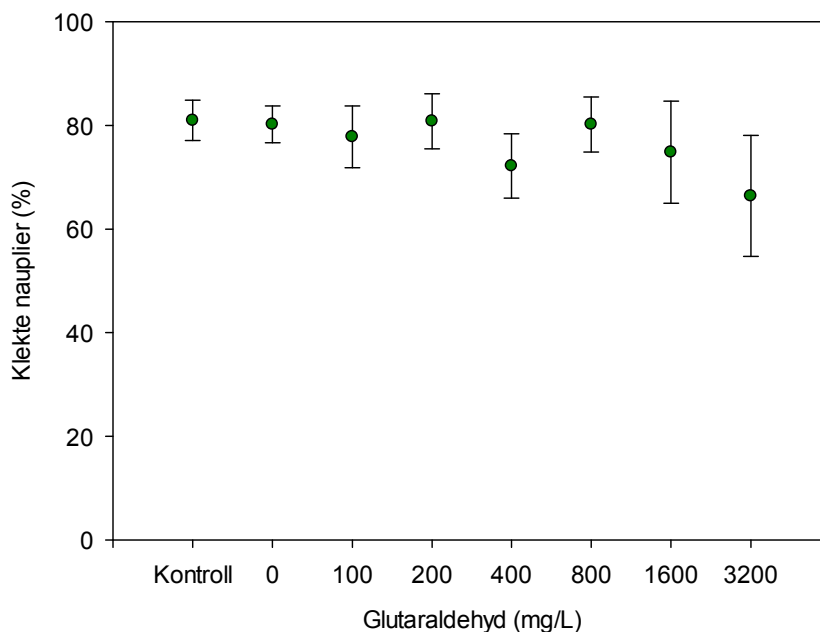


Figur 3.8 Andel copepodeegg med bakterievekst i *Pseudomonas* agar ved dag 2 og dag 21 (+/- 95 % CI, n = 3 og består av 3 egg hver).

3.2.1 Klekkesuksess hos naupliier fra egg desinfisert i Glutaraldhyd

Klekkesuksessen hos naupliene fra de forskjellige behandlingene varierte mellom 59,9 % og 81 %, med lavest klekkesuksess hos gruppene som var desinfisert i de sterkeste dosestyrkene (Figur 3.9). Kontrollgruppen og gruppene som var desinfisert i 0 – 200 mg /L og 800 mg/L hadde høyest klekkesuksess (77,8 – 81 %) og gruppene som var desinfisert med 400 mg/L og med 1600 – 3200 mg/L hadde lavest klekkesuksess (66,4 – 74,8 %).

Det ble ikke funnet signifikante forskjeller ($P = 0,390$, $df = 4$) ved sammenligning av kontrollgruppen og gruppene behandlet i 0 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L og 800 g/L. Klekkeprosenten hos egg desinfisert i 400 mg/L, 1600 mg/L og 3200 mg/L var signifikant lavere enn kontroll ($P \leq 0,001$). Trenden viser at klekkesuksessen ble signifikant lavere ved høyere doser ($k = -0,0038$, $P < 0,01$, Tabell 3.1).

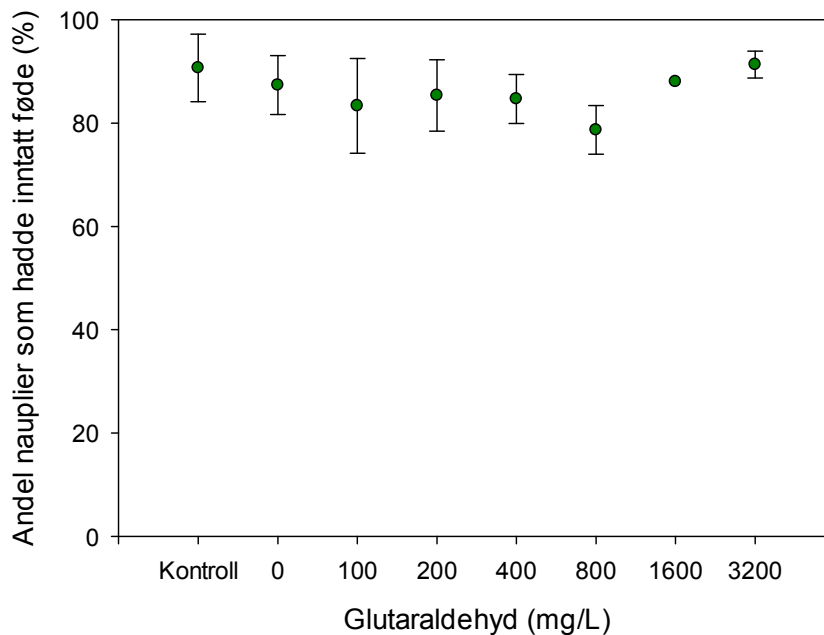


Figur 3.9 Andel klekte nauplier etter gjennomført desinfeksjon (+/- 95 % CI, n = 9–12 og antall egg varierte fra 30 til 584).

3.2.2 Viabilitet hos nauplier fra egg desinfisert i Glutaraldhyd

Andelen nauplier som hadde inntatt fôr fra de forskjellige behandlingene varierte fra 78,7 % til 91,3 % (**Figur 3.10**). Den høyeste andelen nauplier som hadde inntatt fôr ble funnet i gruppen som var desinfisert i 3200 mg/L og lavest andel nauplier i gruppen som var desinfisert i 800 mg/L. Fra gruppen som var desinfisert i 1600 mg/L var det bare 1 replikat.

Andelen nauplier som hadde inntatt fôr var signifikant lavere hos gruppen som var desinfisert i 800 mg/L ($P = 0,004$) sammenlignet med kontroll. Ellers var det ingen signifikante forskjeller ($P = 0,297$, $df = 6$). Den generelle trenden var at viabiliteten økte noe ved de høyeste dosene, men denne økningen ikke var signifikant ($k = 0,0014$, $P > 0,005$, Tabell 3.1).

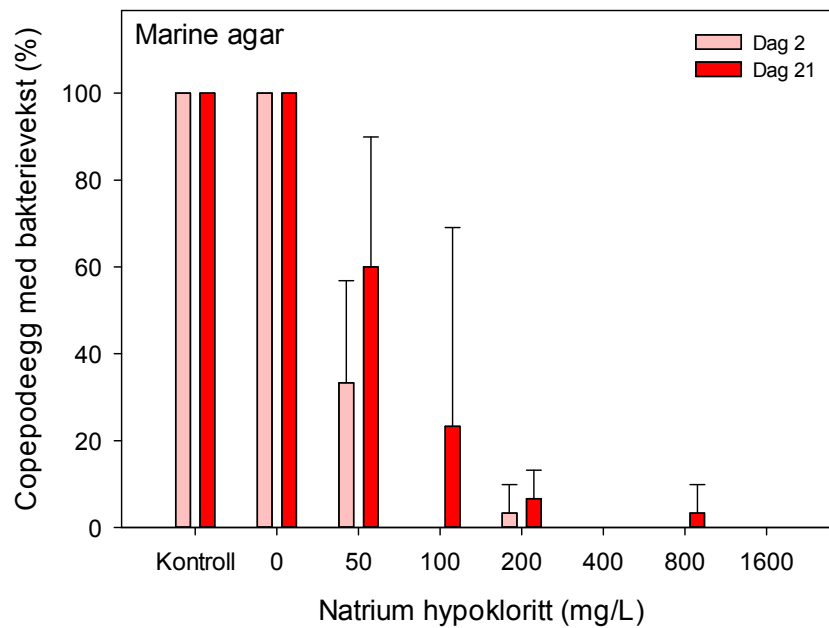


Figur 3.10 Andel nauplier som hadde *R. baltica* i tarmen 86 timer etter desinfeksjonsprosedyrene ble utført (+/- 95 % CI, n = 3 og består av 50 nauplier, med unntak av ved 1600 mg/L hvor n = 1).

3.3 Desinfisering av copepodeegg med natriumhypokloritt

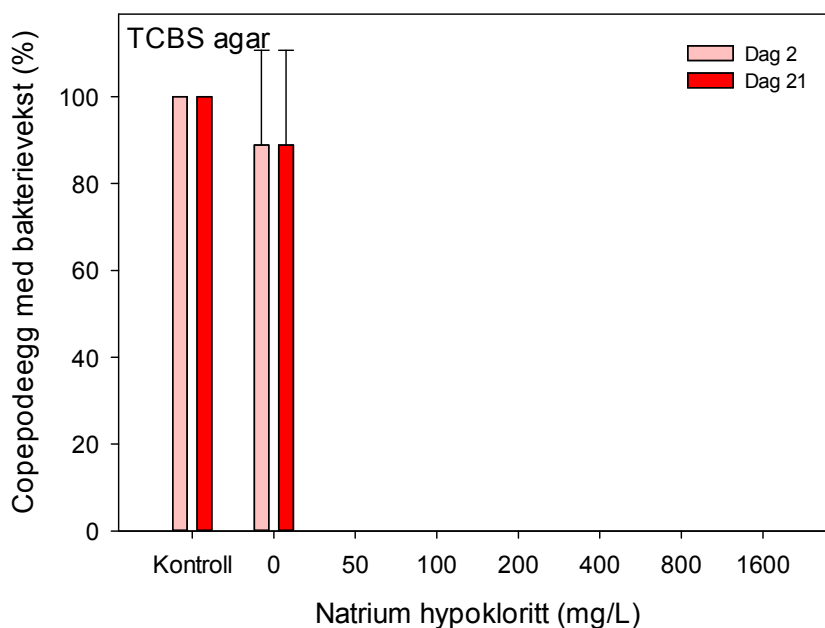
Desinfisering av copepodeegg i natriumhypokloritt ga en reduksjon av andel egg med bakterievekst i Marine agar allerede ved laveste dose på 50 mg/L (**Figur 3.11**). Ved dag 2 var det bakterievekst på samtlige egg fra kontroll og 0-gruppen. Andelen egg med bakterievekst var 33,3 % hos gruppen desinfisert i 50 mg/L og 3,3 % hos gruppen desinfisert i 200 mg/L. Det ble ikke registrert bakterievekst hos noen av de resterende gruppene på dette tidspunktet. Ved dag 21 hadde andel egg med bakterievekst økt til 60 % hos gruppen som var desinfisert med 50 mg/L og til 6,7 % egg med bakterievekst hos gruppen desinfisert i 200 mg/L. Det ble funnet 23,3 % egg med bakterievekst hos gruppen desinfisert i 100 mg/L og 3,3 % egg med bakterievekst hos gruppen som var desinfisert i 800 mg/L.

Ved dosestyrke 50 mg/L ga natriumhypokloritt en signifikant reduksjon av andel egg med bakterievekst ($P \leq 0,001$) og en dose på 100 mg/L ga en signifikant sterkere reduksjon av andel egg med bakterievekst sammenlignet med effekten ved dosestyrke 50 mg/L ($P < 0,01$).



Figur 3.11 Andel copepodeegg med bakterievekst (\pm 95 % CI, $n = 3$ og består av 10 egg hver) i Marine agar ved dag 2 og dag 21.

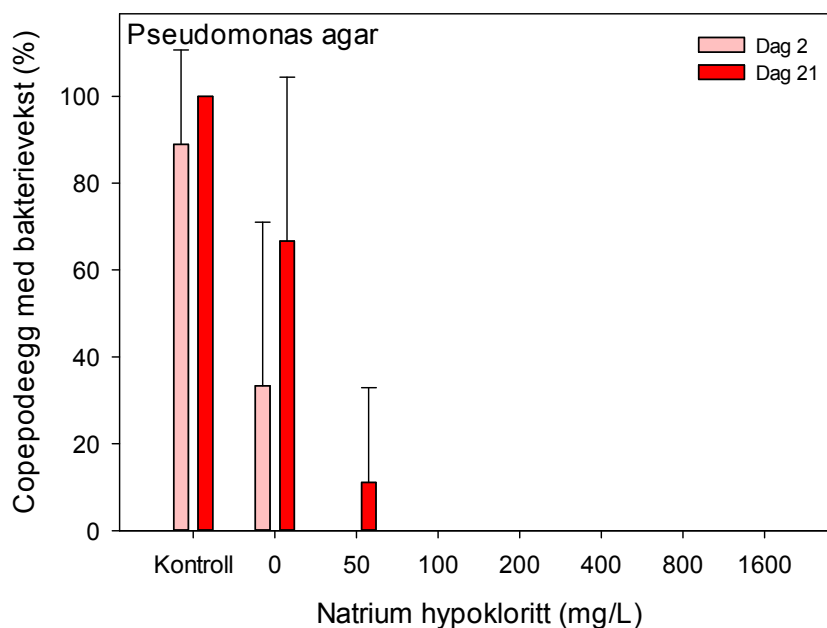
Det var ingen egg med bakterievekst på TCBS agar av de gruppene som var desinfisert i natriumhypokloritt (Figur 3.12). Andelen egg med bakterievekst var 100 % i kontrollgruppen og 90 % i 0-gruppen både ved dag 2 og dag 21. Det ble ikke funnet signifikant forskjell mellom disse to gruppene ($P = 1,000$).



Figur 3.12 Andel copepodeegg med bakterievekst i TCBS agar ved dag 2 og dag 21 (+/- 95 % CI, n = 3 og består av 3 egg hver).

Etter overføring til *Pseudomonas* agar ble det funnet egg med bakterievekst bare hos gruppen desinfisert i laveste dosestyrke (50 mg/L). Ved dag 2 var det 88,7 % egg med bakterievekst hos kontroll, noe som var økt til 100 % ved dag 21. I 0-gruppen var det 33,3 % egg med bakterievekst ved dag 2 og 66,7 % ved dag 21. Det ble registrert 11,1 % egg med bakterievekst fra egg som var desinfisert i 50 mg/L ved dag 21. Det ble for øvrig ikke observert noen bakterievekst på egg desinfisert i 100 mg/L eller i høyere konsentrasjoner.

Ved sammenlignet av antall egg med bakterievekst fra kontroll og fra gruppen desinfisert i 50 mg/L var forskjellen signifikant ($P \leq 0,001$), men det ble ikke funnet signifikante forskjeller mellom egg desinfisert i 50 mg/L sammenlignet med gruppene desinfisert i høyere konsentrasjoner av natriumhypokloritt ($P = 1,000$). Forskjellen i andel egg med bakterievekst hos kontroll-gruppen og 0 - gruppen var ikke stor nok til å gi utslag på den statistiske analysen ($P = 0,206$).

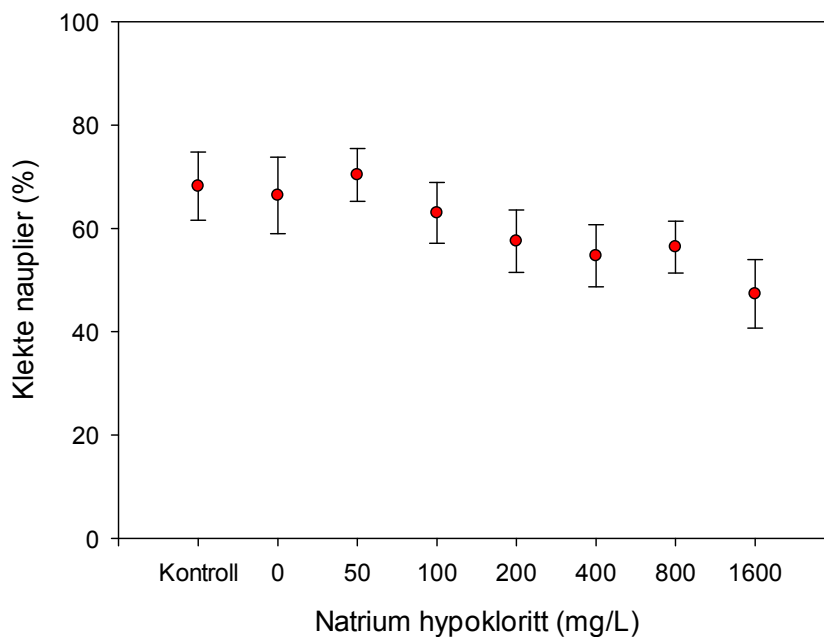


Figur 3.13 Andel copepodeegg med bakterievekst (+/- 95 % CI, n = 3 og består av 3 egg hver) i Pseudomonas agar ved dag 2 og dag 21.

3.3.1 Klekkesuksess hos nauplier fra egg desinfisert med natriumhypokloritt

Andel klekte nauplier fra de forskjellige behandlingene varierte mellom 70,4 % og 47,3 % (Figur 3.14), og klekkesuksessen var lavere hos egg desinfisert i 100 mg/L og høyere konsentrasjoner av natriumhypokloritt. I kontrollgruppen var andelen klekte nauplier 68,2 % og i 0-gruppen var andelen 66,4 %. Egg som var desinfisert i 50 mg/L hadde høyest andel klekte nauplier (70,4 %) og lavest andel klekte nauplier var 47,3 % og var fra gruppen som var desinfisert i den høyeste konsentrasjonen; 1600 mg/L.

Selv om andelen klekte nauplier var noe høyere hos egg som var desinfisert i 50 mg/L sammenlignet med kontroll var forskjellen ikke signifikant ($P = 0,566$). Andelen av klekte nauplier fra egg som var behandlet i natriumhypokloritt med konsentrasjon på 100 mg/L og høyere var derimot signifikant lavere enn klekkeprosent hos kontroll ($P \leq 0,001$). Generelt var det en signifikant sammenheng mellom lavere klekkesuksess og høyere dosestyrker ($k = -0,0123$, $P < 0,001$, Tabell 3.1).



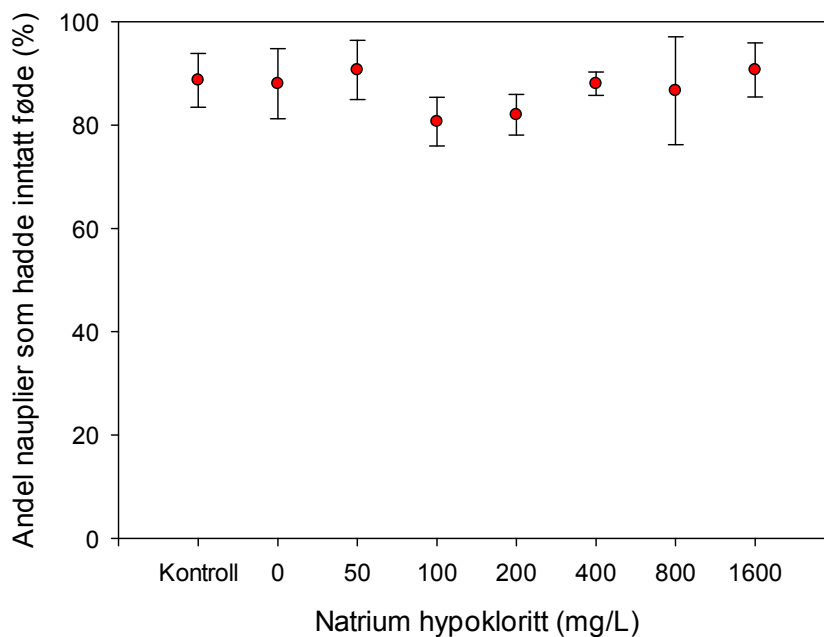
Figur 3.14 Andel klekte nauplier etter gjennomført desinfeksjon (+/- 95 % CI, n = 11–12 og antall egg varierte fra 27 til 523).

3.3.2 Viabilitet hos nauplier fra egg desinfisert i natriumhypokloritt

Andelen nauplier som hadde inntatt mikroalger var forholdsvis høy i alle gruppene og varierte fra 80,7 % til 90,7 % (Figur 3.15). De høyeste andelene av nauplier som hadde *R.baltica* i tarmen var fra kontrollgruppen, og fra egg som var desinfisert med 0-50 mg/L og med 400 mg/L. Andelen nauplier som hadde inntatt fôr fra egg som var desinfisert i 50 mg/L og 1600 mg/L var høyest med 90,7 % hos begge gruppene, men verdiene var ikke mye høyere enn hos nauplier fra kontroll (88,7 %), 0-gruppen (88,0 %) og egg desinfisert i 400 mg/L (88,0 %).

De laveste andelene med nauplier som hadde inntatt fôr var fra egg desinfisert i 100 mg/L med 80,7 % og egg desinfisert i 200 mg/L med 82,0 %.

Forskjellene av andel nauplier som hadde spist mikroalger var ikke signifikante ($P=0,078$, $df = 7$). Trenden viser en svak, ikke signifikant økning av viabilitet ved høyere dosestyrker ($k = 0,0119$, $P > 0,005$, Tabell 3.1).

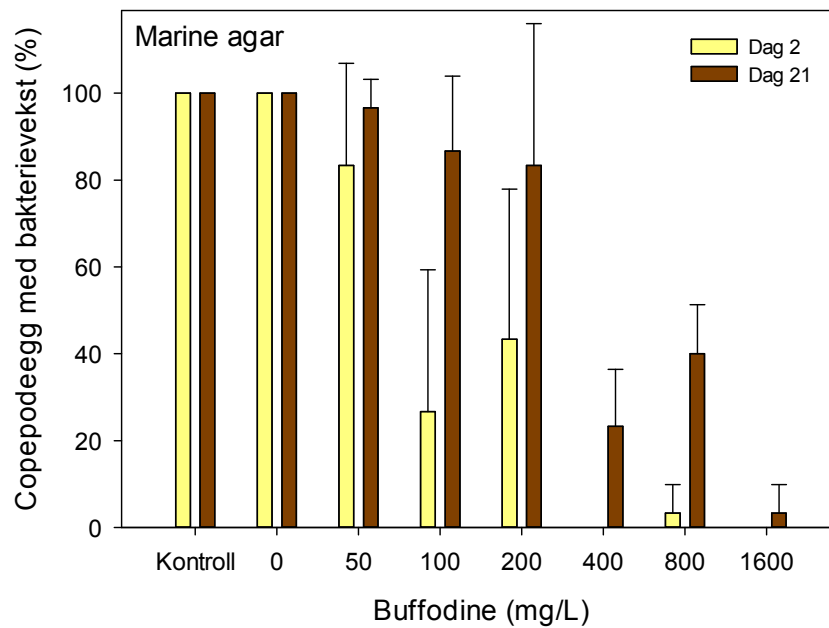


Figur 3.15 Andel nauplier som hadde *R.baltica* i tarmen (+/- 95 % CI, n = 3 og består av 50 nauplier) 86 timer etter desinfeksjonsprosedyrene ble utført.

3.4 Desinfisering av copepodeegg med Buffodine

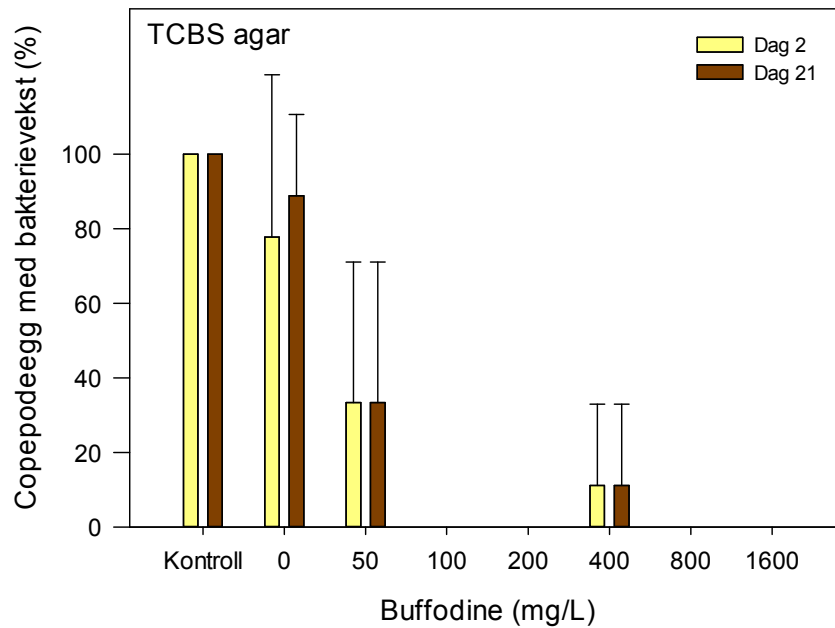
Fra egg desinfisert i Buffodine var andelene egg med bakterievekst på Marine agar stort sett synkende for økende dosestyrke (Figur 3.16). Etter 2 dager ble det registrert bakterievekst hos alle grupper unntatt de som var desinfisert i 400 mg/L og 1600 mg/L. Etter 21 dager var andel egg med bakterievekst økt hos alle gruppene, med unntak av kontroll og gruppen som var behandlet i rent sjøvann, der det var 100 % utslag allerede ved dag 2.

Det var ingen signifikant forskjell i bakterienivået til egg desinfisert i 50 mg/L sammenlignet med kontroll, verken på dag 2 ($P = 0,052$) eller dag 21 ($P = 1,000$). Hos gruppene som var desinfisert i 100 mg/L eller ved høyere konsentrasjoner var reduksjonen av andel egg med bakterievekst signifikant lavere ved dag 2 enn hos kontroll ($P \leq 0,001$, Fischer exact), men ved dag 21 var ikke forskjellen signifikant ($P = 0,112$) hos egg fra 100 mg/L og hos egg fra 200 mg/L ($P = 0,052$). Ved en dosestyrke på 400 mg/L og høyere var den bakteriereduserende effekten signifikant ($P \leq 0,001$). Ved sammenligning av eggene fra 400 mg/L og 1600 mg/L var den bakteriereduserende effekten signifikant bedre hos gruppen som var desinfisert i den sterkeste dosen ($P = 0,001$).



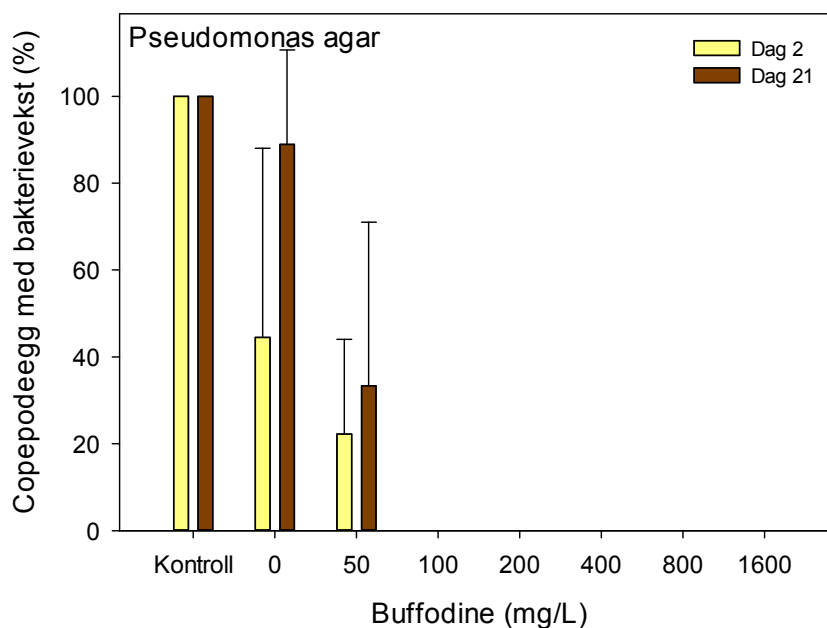
Figur 3.16 Andel copepodeegg med bakterievekst i Marine agar ved dag 2 og dag 21 (+/- 95 % CI, n = 3 og består av 10 egg hver).

På TCBS agar ble det bare registrert bakterievekst hos 2 av gruppene som var desinfisert i Buffodine (50 og 400 mg/L, Figur 3.17). Det ble både ved dag 2 og dag 21 registrert 33,3 % egg med bakterievekst hos gruppen desinfisert i 50 mg/L og 11,1 % hos gruppen desinfisert i 400 mg/L. Fra 0-gruppen var andelen 77,8 % ved dag 2 og 88,9 % ved dag 21. Bakteriereduksjonen ved 50 mg/L og høyere konsentrasjoner var signifikante ($P < 0,01$).



Figur 3.17 Andel copepodeegg med bakterievekst i TCBS agar ved dag 2 og dag 21 (+/- 95 % CI, n = 3 og består av 3 egg hver).

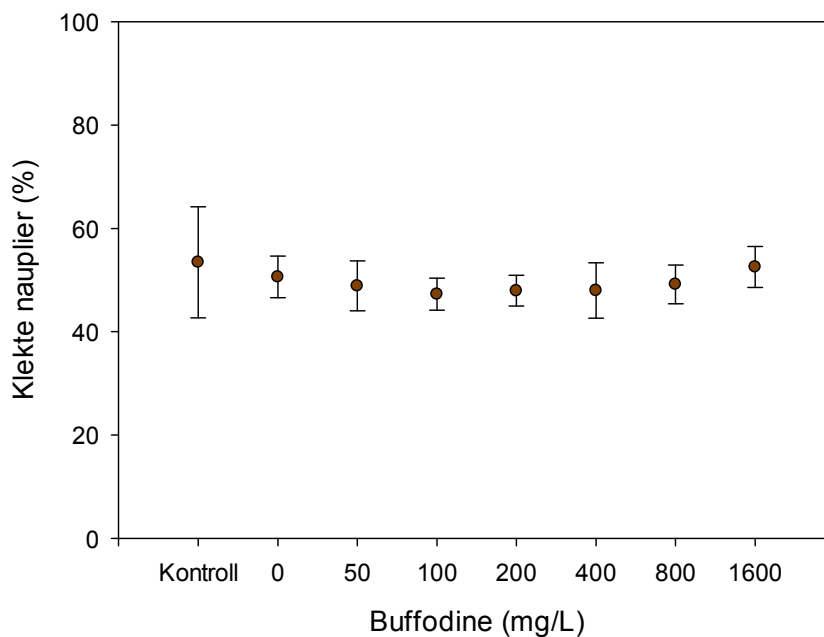
På Pseudomonas agar ble det ikke registrert noen egg med bakterievekst fra egg desinfisert i 100 mg/L av Buffodine eller høyere (Figur 3.18). Ved 50 mg/L var andelen egg med bakterievekst 22,2 % etter 2 dagers inkubering og 33,3 % etter 21 dagers inkubering. I 0 - gruppen var andelen 44,4 % ved dag 2, noe som hadde økt til 88,1 % etter 21 døgn.



Figur 3.18 Andel copepodeegg med bakterievekst i Pseudomonas agar ved dag 2 og dag 21 (+/- 95 % CI, n = 3 og består av 3 egg hver).

3.4.1 Klekkesuksess hos nauplier fra egg desinfisert i Buffodine

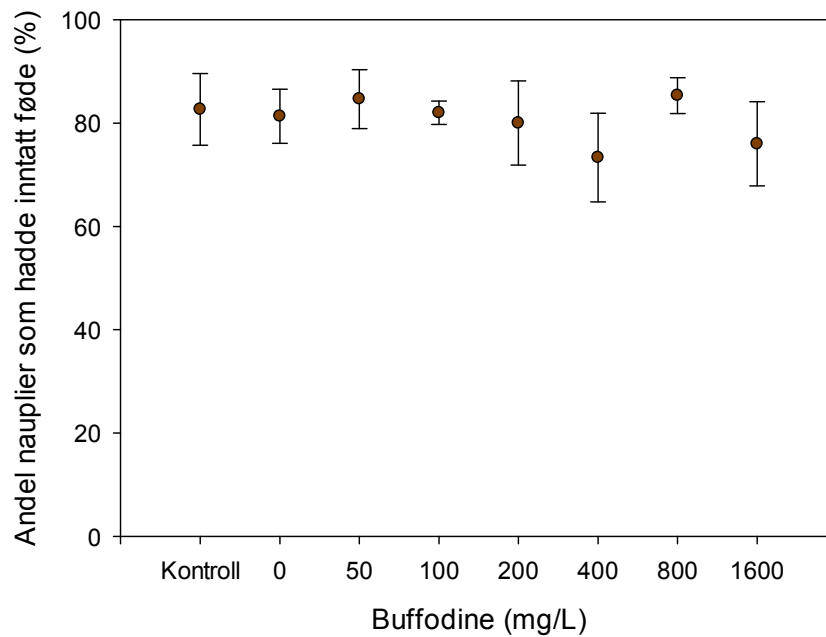
Variasjonen i klekkeprosent fra de forskjellige behandlingene var forholdsvis liten og varierte mellom ytterpunktene fra 47,3 % hos egg desinfisert i 100 mg/L til 53,4 % hos kontrollgruppen (**Figur 3.19**). Eggkvaliteten var i utgangspunktet lavere i dette forsøket sammenlignet med de tidligere forsøkene. Klekkeprosenten ved 1600 mg/L var 52,5 %, noe som var 1,9 % høyere enn ved 0 mg/L. Av alle gruppene var det bare gruppen som var desinfisert i 100 mg/L som hadde signifikant lavere klekkeprosent ($P < 0,01$) sammenlignet med kontroll. Trenden viste en svak, ikke signifikant økning i klekkesuksess ved høyere doser ($k = 0,0012$, $P > 0,05$, Tabell 3.1)



Figur 3.19 Andel klekte nauplier etter gjennomført desinfeksjon (+/- 95 % CI, n = og antall egg varierte fra 53 til 563).

3.4.2 Viabilitet hos nauplier fra egg desinfisert i Buffodine

Det var færrest nauplier fra egg desinfisert i 400 mg/L med fôr i tarmen (73,3 %, Figur 3.19). Den høyeste andelen nauplier som hadde inntatt fôr var klekket fra egg behandlet i 800 mg/L (85,3 %). Selv om forskjellen mellom ytterpunktene var på 12 % ble det ikke funnet signifikante forskjeller ($P = 0,117$, $df = 7$). Trenden viste en minimal, ikke signifikant økning i viabilitet ved økende dosestyrker ($k = 0,0019$, $P > 0,05$, Tabell 3.1).

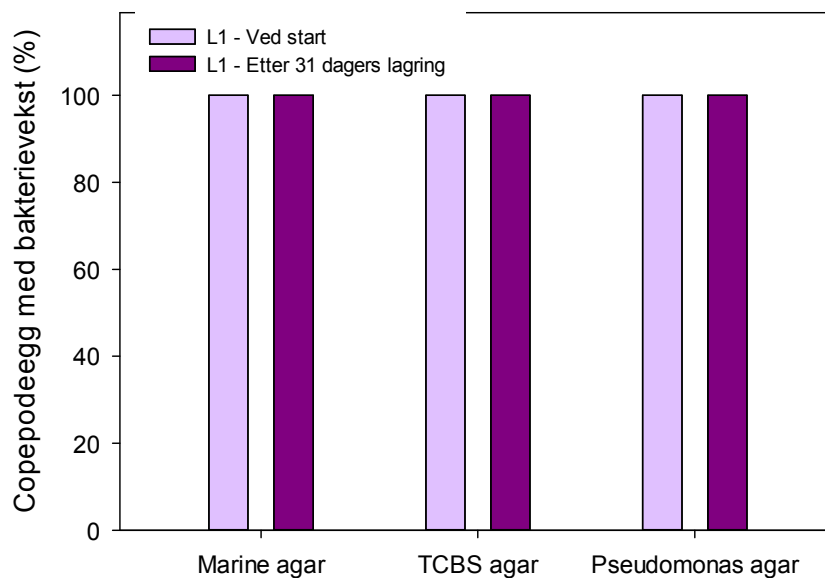


Figur 3.20 Andel nauplier som hadde *R. baltica* i tarmen 86 timer etter desinfeksjonsprosedyrene ble utført (+/- 95 % CI, n = 3 og består av 50 nauplier).

3.5 Lagringsforsøk av desinfiserte copepodeegg

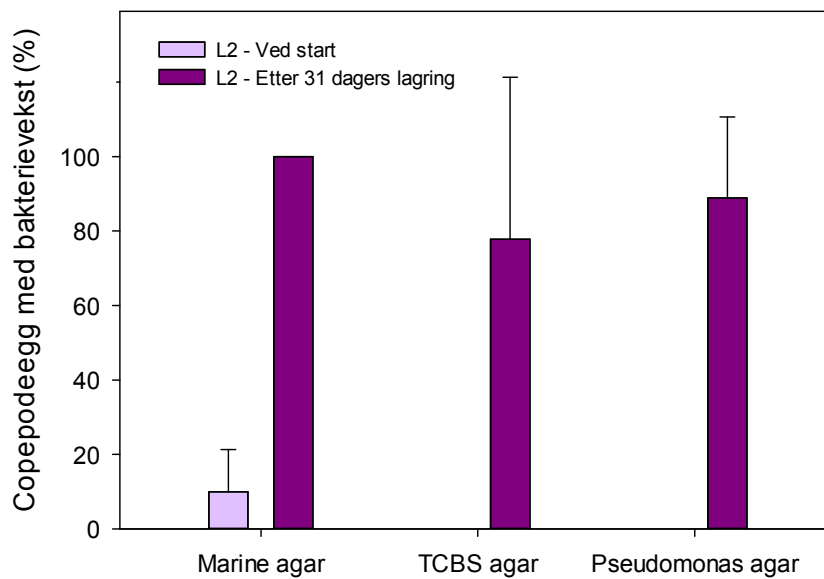
I dette forsøket ble andel egg med bakterievekst og klekkesuksess registrert for egg som ble utsatt for 4 forskjellige behandlinger etterfulgt av 31 dagers lagring (Tabell 2.2). Bakterievekst og klekkesuksess ble registrert 2 ganger; etter desinfisering, men før lagring av copepodeegg og etter 31 dagers lagring av copepodeegg.

Figur 3.21– Figur 3.24 viser samlet bakterievekst registrert etter 21 dagers inkubering (15 °C) hos egg-gruppene før og etter 31 dagers lagring. Copepodeegg fra gruppe L1 (kontroll) hadde 100 % egg med bakterievekst på samtlige agartyper, både før og etter 31 dagers lagring (Figur 3.21).



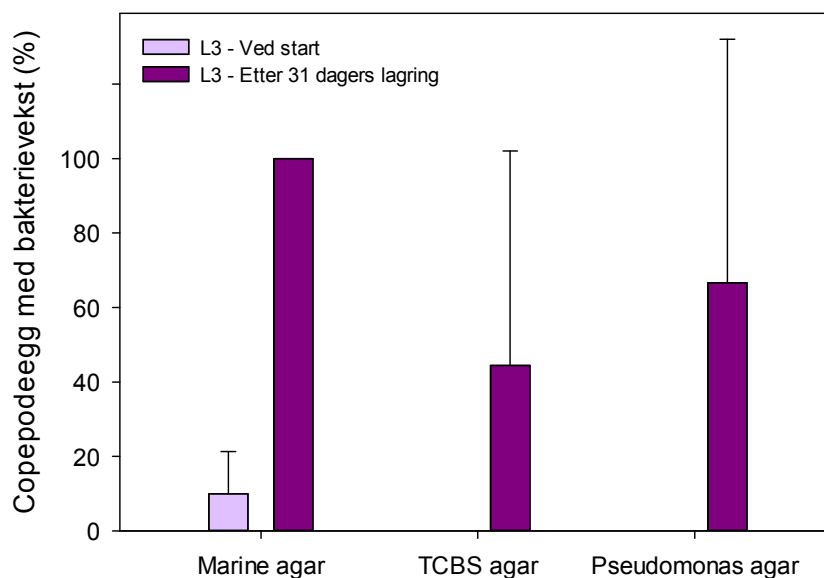
Figur 3.21 Andel copepodeegg med bakterievekst fra L1 (kontroll) i Marine agar, TCBS agar og Pseudomonas agar før og etter 31 dagers lagring i sjøvann (+/- 95 % CI, n = 3 og består av 10 egg på Marine agar og 3 egg på TCBS agar og Pseudomonas agar).

Hos copepodeeggene fra gruppe L2 (desinfisert i 200 mg/L Glutaraldhyd og lagret i filtrert autoklavert 1 μ m sjøvann, Figur 3.22) var den bakteriereduserende effekten tydelig før lagring da andelen egg med bakterievekst i Marine agar var 10 % og 0 % i både TCBS agar og Pseudomonas agar. Etter 31 dagers lagring hadde andelen egg med bakterievekst økt til 100 % i Marine agar, 77,8 % i TCBS agar og 88,9 % i Pseudomonas agar. Økningen i andel egg med bakterievekst fra før lagring til etter lagring var statistisk signifikant på samtlige agar typer; Marine agar ($P \leq 0,001$), TCBS agar ($P < 0,01$) og Pseudomonas agar ($P \leq 0,001$).



Figur 3.22 Andel copepodeegg med bakterievekst fra L2 (desinfisert i 200 mg/L Glutaraldehyd) i Marine agar, TCBS agar og Pseudomonas agar før og etter 31 dagers lagring i 1 μ m filtrert og autoklavert sjøvann (+/- 95 % CI, n = 3 og består av 10 egg på Marine agar og 3 egg på TCBS agar og Pseudomonas agar).

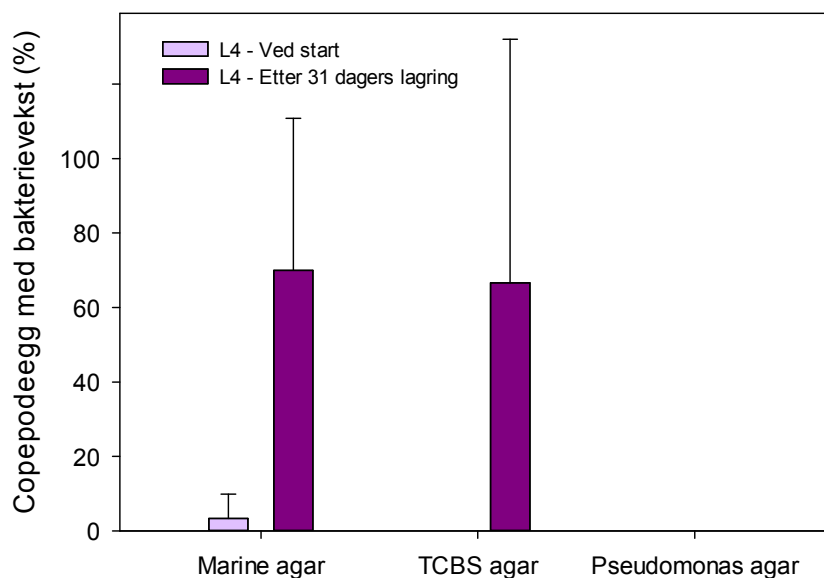
For egg fra gruppe L3 (desinfisert i 200 mg/L Glutaraldehyd og lagret i 1 μ m filtrert anoksisk autoklavert sjøvann) var verdiene før lagring basert på de samme som hos egg som gjennomgikk behandling L2, da behandlingen fram til lagring var lik hos begge gruppene (Figur 3.23). Andelen egg med bakterievekst etter lagring var 100 % i Marine agar, 44,4 % i TCBS agar og 66,7 % i Pseudomonas agar. Den økte andelen av egg med bakterievekst var signifikant på Marine agar ($P \leq 0,001$) og på Pseudomonas agar ($P < 0,01$), men ikke på TCBS agar ($P = 0,082$).



Figur 3.23 Andel copepodeegg med bakterievekst fra L3 (desinfisert i 200 mg/L Glutaraldehyd) i Marine agar, TCBS agar og Pseudomonas agar før og etter 31 dagers lagring i 1 μ m filtrert og autoklavert anoksisk sjøvann (+/- 95 % CI, n = 3 og består av 10 egg på Marine agar og 3 egg på TCBS agar og Pseudomonas agar).

I gruppe L4 (desinfisert i 200 mg/L Glutaraldehyd og 1600 mg/L Buffodine, og deretter lagret i 1 μ m filtrert, anoksisk autoklavert sjøvann) var den bakteriereduserende effekten tydeligst av samtlige behandlinger (Figur 3.24). Før eggene ble lagret var andelen egg med bakterievekst 3,3 % i Marine agar og 0 % i TCBS agar. Etter lagring hadde prosentandelen av egg med bakterievekst økt til 70,0 % i Marine agar og 66,7 % i TCBS agar. Det ble ikke registrert noen egg med bakterievekst i Pseudomonas agar, verken før eller etter 31 dagers lagring.

Økningen av andel egg med bakterier fra eggene før lagring sammenlignet med eggene etter lagring var signifikant både på Marine agar ($P = <0,001$) og på TCBS agar ($P < 0,01$).



Figur 3.24 Andel copepodeegg med bakterievekst fra L4 (desinfisert i 200 mg/L Glutaraldehyd, deretter i Buffodine etter 30 minutter) i Marine agar, TCBS agar og Pseudomonas agar før og etter 31 dagers lagring i 1 μ m filtrert og autoklavert sjøvann (\pm 95 % CI, n = 3 og består av 10 egg på Marine agar og 3 egg på TCBS agar og Pseudomonas agar).

3.5.1 Sammenligning av bakterieeffektene av de ulike behandlingene under lagringsforsøket

Desinfisering av copepodeegg med Glutaraldehyd (L2 og L3, 200 mg/L, Figur 3.22) ga en reduksjon av andelen copepodeegg med bakterievekst i Marine agar på 90 % før lagring, sammenlignet med kontrollgruppen (**Figur 3.21**). Desinfisering med både glutaraldehyd og Buffodine (L4, Figur 3.24) ga en reduksjon på 96,7 %.

Reduksjonen av andel egg med bakterievekst i Marine agar var signifikant ved samtlige behandlinger ($P \leq 0,001$) før lagring, men forskjellen av andel egg med vekst i mellom behandlingene L2/L3 og L4 var ikke signifikant ($P > 0,05$).

Andelen av copepodeegg med bakterievekst var høyere ved samtlige behandlinger etter 31 dagers lagring. Begge gruppene som var desinfisert i glutaraldehyd (L2 og L3) hadde 100 % egg med bakterievekst i Marine agar etter lagring. Hos egg som var behandlet i både glutaraldehyd og Buffodine (L4) var andelen noe lavere med 70 % egg med bakterievekst i Marine agar. I TCBS agar var andel egg med bakterier 77,8 for gruppe L2, 44,4 % for gruppe

L3 og 66,7 % for gruppe L4. I Pseudomonas agar var det ingen egg med bakterievekst fra L4, men fra L2 var det 88,9 % og fra L3 var det 66,7 %.

Andelen av copepodeegg med bakterievekst hos gruppe L4 i Marine agar var signifikant lavere enn hos de resterende behandlingene ($P = 0,002$). I TCBS agar var andel egg med bakterievekst signifikant lavere hos gruppe L3 sammenlignet med kontroll ($P < 0,05$), men ikke hos gruppe L2 ($P = 0,471$) og gruppe L4 ($P = 0,206$). Det ble ikke funnet signifikante forskjeller behandlingene seg i mellom. I Pseudomonas agar var det signifikant forskjell mellom kontrollgruppe L1 og gruppe L4 ($P \leq 0,001$), men ikke hos gruppe L2 ($P = 1,000$) eller gruppe L3 ($P = 0,206$) sammenlignet med kontrollgruppen (L1). Det ble ikke funnet signifikant forskjell ved sammenligning av gruppe L2 og gruppe L3 ($P > 0,05$), men gruppe L4 hadde en signifikant lavere andel enn både gruppe L2 ($P \leq 0,001$) og gruppe L3 ($P < 0,05$).

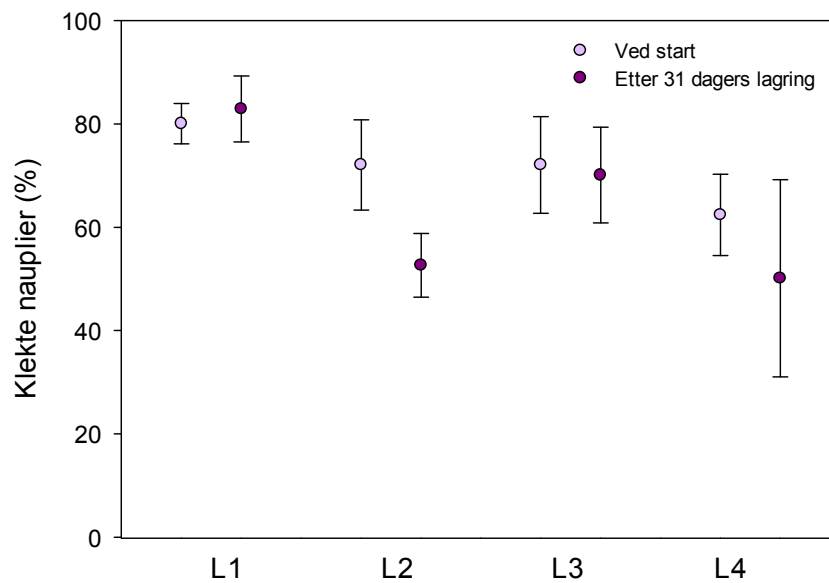
3.5.2 Klekkesuksess hos nauplier fra lagringsforsøk

Prosentandelene av klekte nauplier fra samtlige behandlinger er vist i Figur 3.25. Gruppe L1 hadde høyest andel klekte nauplier med 80,1 % før lagring og 82,9 % etter lagring. Hos eggene fra gruppe L2 var andelen klekte nauplier 72,1 % før lagring, noe som var sunket til 52,7 % etter lagring. Gruppe L3 hadde som tidligere nevnt samme utgangspunkt som L2, men hadde en høyere andel klekte nauplier på 70,1 % etter lagring. Gruppe L4 hadde 62,4 % klekte nauplier før lagring og 50,1 % etter lagring.

Kontrollgruppe L1 hadde ikke signifikante forskjeller av andel klekte nauplier før og etter lagring ($P = 0,071$). Det var en signifikant reduksjon av andel klekte nauplier etter 31 dagers lagring hos de resterende gruppene ($P \leq 0,001$).

En nærmere vurdering av andel klekte nauplier før lagring viste at andelen klekte nauplier til gruppe L2 og L3 var signifikant lavere enn hos kontrollgruppen ($P < 0,05$), noe som også var tilfellet hos L4 ($P < 0,001$). Det bør også nevnes at kombinasjonsbehandlingen med glutaraldehyd og Buffodine (L4) ga en signifikant lavere andel klekte egg enn hos egg behandlet med bare glutaraldehyd(L2 / L3) ($P \leq 0,001$).

Det var også tydelige forskjeller i klekkesuksessen etter 31 dagers lagring. Samtlige behandlinger ga signifikant lavere andel av klekte nauplier enn hos kontroll ($P \leq 0,001$). Hos gruppe L2 og L4 var det ingen signifikante forskjeller i klekkesuksess ($P = 0,991$) seg imellom, men begge gruppene hadde signifikant lavere klekkesuksess enn det var hos egg som fra gruppe L3 ($P \leq 0,001$).



Figur 3.25 Andel klekte nauplier fra L1, L2, L3 og L4 før og etter 31 dagers lagring (\pm 95 % CI, $n = 8 - 12$ og antall egg var 53 – 563).

4 Diskusjon

I denne masteroppgaven var målet å finne egnet desinfiseringsmiddel og en metode som gir god bakteriereduksjon uten å skade copepodeeggene. Dette ble gjort ved å evaluere effekten desinfiseringsmidlene hadde på bakterievekst på egg, klekkesuksess av egg og viabiliteten til nauplier. Det ble også utført et lagringsforsøk for å gi en indikasjon på hvordan desinfisering påvirker eggkvaliteten ved lagring.

4.1 Desinfisering av copepodeegg og bakterieforsøk

Desinfiseringen av copepodeegg ble gjennomført i romtemperatur ettersom eggene ble høstet daglig. Ved desinfisering før lagring var det praktisk å gjennomføre prosedyren raskt og enkelt i romtemperatur før eggene ble satt til lagring. Kontakttiden; den tiden eggene er eksponert for desinfiseringsmiddelet, var 10 minutter og ble valgt ut ifra denne forutsetningen. Temperatur og kontaktid er blant variablene som har innvirkning på desinfiseringsmiddelets effekt (Madigan 2009).

Det ble ikke målt pH under forsøkene. Salvesen og Vadstein (1995) målte pH for løsninger av glutaraldehyd, Buffodine og natriumhypokloritt under desinfisering av Marine fiskeegg. glutaraldehyds pH var ikke påvirket nevneverdig av konsentrasjon, Buffodines pH verdier sank fra 7,1 til 6,2 ved økning av konsentrasjoner fra 75 mg/L til 400 mg/L og natrium hypklorittløsningens pH økte over optimalverdiene ved 800 mg/l (Salvesen og Vadstein, 1995). Selv om natriumhypokloritt er mer aktiv i sur løsning enn i basisk løsning (Naidu and Khanna 2000) så ser ikke det ut til å ha hatt noen synlig negativ innvirkning på den bakteriereduserende effekten på copepodeegg under forsøkene da de fleste eggene ikke hadde bakterievekst ved høyere doser. natriumhypokloritt hadde god bakteriereduserende effekt både ved doser lavere enn 800 mg/L og ved de høye dosene (Figur 3.11). Hos Salvesen og Vadstein (1995) sank pH i Buffodineløsninger med økt konsentrasjon av Buffodine, men siden det er økning i alkalinitet som fører til lavere antimikrobiell aktivitet for jodløsninger er det lite trolig dette har hatt nevneverdig innvirkning (Cooper 2007). Buffodine er oppgitt fra produsent å inneholde bufferagenter, å ha nøytral pH og være stabil. Det er derfor liten sannsynlighet for at løsning med sjøvann har påvirket pH i noen særlig grad under

desinfeksjon av copepodeegg. Den antimikrobielle effekten økte med dosestyrker, noe som også er en indikasjon på at pH ikke har hatt noen negativ innvirkning ved desinfiseringen av eggene.

Før forsøkstart ble det vurdert å telle koloniformende enheter (colony forming units, CFU) men det viste seg å være vanskelig å homogenisere copepodeeggene, noe som er nødvendig for å få tilstrekkelig spredning av bakteriene på agarplatene. Det ble i stedet plassert hele egg i brønnbrett med forskjellige agartyper og andel egg med bakterievekst ble registrert. Dette er en metode som tidligere er blitt brukt av blant andre Salvesen og Vadstein (1995). Det er mange bakterier som ikke vokser på agar (Loesche 1969) og det antas det at hvis desinfiseringen reduserer agarvoksende-bakteriene, så vil den tilsvarende reduserer bakterier som ikke vokser på agar. Egg uten bakterievekst ble derfor definert som overflatesterile.

Det er også verdt å nevne at det skal godt gjøres å fjerne absolutt alle bakterier ved desinfisering og at overlevelse av bare en bakterie er nok til videre bakterievekst over tid, noe som ble observert under lagringsforsøkene hvor andelene egg med bakterievekst økte etter 31 dagers lagring.

Det ble som tidligere nevnt (kapitel 2.2.3) pipettert 10 egg fra hvert replikat ($n = 3$) på Marine agar og 3 egg på *Pseudomonas* agar og 3 egg på TCBS agar. Det ble brukt 10 egg på Marine agar da denne agar varianten er forventet å gi informasjon om den totale tilstedeværelsen av koloniformende marine bakteriearter og de to andre agarvariantene gir supplerende informasjon om spesifikke bakteriegrupper hvor det eksisterer en del patogene bakteriearter (Lopez-Romalde *et al.* 2003, Kumaran *et al.* 2010, Deivasigamani *et al.* 2010, Lagana *et al.* 2011).

4.2 Copepodeegg og klekkesuksess

Klekkesuksessen av copepodeeggene ble registrert etter 48 timer under konstant belysning, en metode som er benyttet tidligere for å finne klekkesuksess ved NTNU/SINTEF. Siden *Acartia tonsa* kan produsere egg av både SE og DHE type er det mulig at ikke alle levedyktige egg har klekket innen 48 timer (Drillet *et al.* 2011). Dette kan potensielt bety at klekkesuksessen var bedre enn hva som ble registrert. Det kan imidlertid antas at tilfeldig fordeling av eggene

vil kompensere for dette ved sammenligning av egg som ble høstet i samme kultur ved samme tidspunkt. Det var i midlertidig varierende klekkesuksess hos egg fra kontrollgruppen høstet ved forskjellige dager, noe som kan være en indikasjon på forskjellige sammensetninger av eggtyper hvis noen av eggene behøvde lengre tid for å klekkes. Det bør også påpekes at det ble observert større mengder organisk materiale i form av bl.a. skallrester og døde copepoder ved de to siste egghøstingene. Fra 4 dager etter copepodene startet å produsere egg ble det gjort ett forsøk hver 4 - 6 dag (av praktiske årsaker). Klekkesuksessen hos kontrollgruppen var på 81 % og 82,8 % hos eggene fra de to første innhøstningene, 68,2 % ved den tredje egghøstingen og 53,4 % ved den siste. Klekkesuksess hos kontrollgruppene gir informasjon på hvor god eggkvaliteten er før desinfisering og det kan være en sammenheng mellom mengden av organisk materiale og eggkvalitet. Ekskrementer, døde og levende copepoder fungerer som substrater for bakterievekst (Tang 2005) og i en moden kultur hvor innholdet av dette er høyt er det også sannsynligvis større innhold av bakterier. Det kan også være andre faktorer som potensielt har innvirkning på eggkvalitet, som f.eks vannkvalitet i dyrkningskar og algekvalitet.

Hvis kvaliteten på algene som ble føret til copepodene var dårlig med innhold av døde eller døende celler vil tilgangen på fôrpartikler bli dårlig. Copepodene kan da produsere DHE (Drillet *et al.* 2011) som vil ha en innvirkning på eggenes klekkesuksess. SE og DHE ligner morfologisk (Hansen *et al.* 2010, Hansen *et al.* 2012) og er derfor vanskelig å skille fra hverandre i lupe.

Eggene hadde en sterk tendens til å klebre seg til hverandre, noe som vanskeligjorde spesielt uttakene til klekkestestene. Prøveuttakene ble derfor gjort etter at eggene først var ristet og sedimentert til bunnen av prøveglassene. Hvis ikke ble uttakene svært ujevne siden eggene var så ujevnt fordelt i vannkolonnen. Det var vanskelig å ta uttak på like antall egg og det var på forhånd bestemt at hver klekkestest skulle inneholde minst 10 egg, men de fleste uttakene inneholdt en god del flere (opptil 584 egg).

Det er også verdt å nevne at det naturligvis var forskjeller på klekkesuksess mellom replikater. Konfidensintervallet til klekkesuksessene var imidlertid relativt jevnt fordelt for de fleste dosestyrkene, men de to høyeste dosestyrkene av glutaraldehyd skilte seg ut med høyere konfidensintervall på 9,86 og 11,7 %. Dette kan ha vært en indikasjon på at eggene ble ujevnt

eksponert for desinfiseringsmiddel og dermed også større variasjon i dødelighet som følge av dette.

4.3 Viabilitet av copepoder

Innholdet av *R. Baltica* i tarmen hos de 50 første tilfeldige nauplinene ble registrert og brukt som mål på nauplienes viabilitet etter desinfisering. Variasjonen av andelen av nauplier som hadde spor av alger i tarmen var ikke alltid i samsvar med dosestyrke. Viabiliteten hos nauplier fra egg desinfisert med glutaraldehyd og natriumhypokloritt var høy både for kontroll og for den høyeste tilsatte dosen. Den var noe lavere for mildere doser, men det var også store variasjoner i mellom dosestyrkene ved de to andre desinfiseringsmidlene. Mellom replikater ved samme dosestyrker var det forskjeller på opptil 16 % mellom høyeste og laveste verdi. Differansen var ikke like stor mellom alle replikatene, men forskjellene varierte ved alle desinfiseringsmidlene og det ble ikke observert noen sammenheng variasjon og dosestyrker.

Årsaken til de relativt store sprangene mellom viabilitet er vanskelig å si noe konkret om. Det kan selvfølgelig tenkes at svakheter med utførelses av metodikken kan være en potensiell årsak, uten at det kan påpekes spesifikke feil i gjennomførelsen. Disse variasjonene framstår som tilfeldige og som en indikasjon på at verdiene kunne vært jevnere hvis utvalget som var på 50 naupli per replikat hadde vært større.

Statistikken gir også en indikasjon på at de fleste variasjonene kan ha vært tilfeldige ettersom det ikke ble funnet noen signifikante forskjeller i viabilitet ved desinfisering med Buffodine og natriumhypokloritt. De signifikante forskjellene som ble funnet var ved en konsentrasjon med glutaraldehyd (800 mg/L,) hvor viabiliteten var lavere. Med Pyceze var viabiliteten signifikant bedre hos nauplier fra egg fra 0-gruppen, 50 mg/L og 100 mg/L. Den eneste forskjellen mellom kontrollgruppen og 0-gruppen hos egg som var behandlet i Pyceze var at den sistnevnte gruppen ble behandlet likt som de desinfiserte eggene. Det var ingen tilsvarende forskjell ved de andre forsøkene. En mulig forklaring på bedre viabilitet ved dosestyrker på 50 mg/L og 100 mg/L kan være at desinfisering ved lave doser av Pyceze kan hatt en forbedrende effekt på viabilitet. Den bakteriereduserende effekten var høyere ved høyere doser og viser dermed ingen sammenheng mellom økende viabilitet og redusert bakterieinnhold. Klekkesuksessen var signifikant lavere hos 0-gruppen og hos gruppen som

var desinfisert i 50 mg/l, men det gjaldt også flere andre dosestyrker, noe som gjør det vanskelig å se noe mønster. For glutaraldehyd var det lav viabilitet ved dosestyrke på 800 mg/L, men heller ikke her observeres det sammenheng med den bakteriereduserende effekten og klekkesuksess.. Det kan derfor spekuleres i om dette er en tilfeldig variasjon. Statistikken gir ingen informasjon på forskjeller mellom replikater av egg behandlet med samme dosestyrke.

Den generelle trenden var at viabiliteten til nauplier fra egg som var desinfisert i Pyceze ble signifikant lavere ved høyere dosestyrker (Tabell 3.1). Høyeste dosestyrke av Pyceze var også den eneste behandlingen hvor det visuelt ble observert forskjeller i mikroskopet. Naupliene var generelt mindre av størrelse. Det var en svak økning av viabilitet ved høyre dosestyrker hos nauplier fra egg desinfisert i de resterende midlene, men denne trenden var ikke signifikant for noen av midlene.

Subjektivt vurderes denne metoden til å gi en indikasjon på at midlene som ble brukt ikke hadde noen vesentlig negativ innvirkning på nauplienes viabilitet, men at dette muligens ikke er et godt verktøy for å rangere desinfiseringsmidler og dosestyrker opp mot hverandre, i alle fall ikke de midlene og dosestyrkene som ble undersøkt i disse forsøkene.

En alternativ metode hadde vært om det ble telt antall levende og døde nauplier, men en slik metode vil ikke gi informasjon om kvaliteten til de levende naupliene. Nauplier av *A.tonsa* starter å innta fôr ved det andre nauplistadiet (instar) og dermed er spor av alger i tarmen ikke bare et mål på at nauplien er levedyktig, men også på at den har oppnådd minst et stadieskifte (Landry 1983). Nærmere stadiesbestemmelse av nauplier ble ikke gjort da grunnlaget for evalueringen av desinfiseringsmiddelene hovedsakelig var rettet mot bakterietestene og klekkestestene. Det ble observert variasjoner av nauplienes størrelse, både hos de som hadde spor av alger i tarmen og blant de som ikke hadde, selv om andelen av små nauplier var større blant de som ikke hadde alger i tarmen. Det kan derfor være nauplier med god viabilitet som ikke ble registrert med spor av alger i tarmen, men siden det antes normalfordeling så skal dette teoretisk sett ikke ha noen innvirkning på resultatene.

4.4 Lagringsforsøk

Lagringsforsøket ble gjennomført ved de samme metodene for desinfisering, bruk av agarter og testing av copepodeeggens klekkesuksess. Det var fire forskjellige behandlinger som var testet (Tabell 2.2). Gruppe L2 og L3 bestod begge av egg desinfisert i glutaraldehyd, men gruppe L2 ble lagret i sjøvann med vanlig oksygeninnhold og gruppe L3 ble lagret i anoksisk sjøvann. Eggene i gruppe L3 hadde signifikant høyere klekkesuksess etter lagring (70,1 %) enn eggene i gruppe L2 (52,7 %). Hagemann (2011) viste at lagring av copepodeegg i anoksisk vann hadde bedre klekkesuksess (91,8 %) sammenlignet med lagring i vann med normalt oksygeninnhold (85,9 %).

Andelen av egg med bakterievekst hadde i begge gruppene økt etter lagring uavhengig av om eggene var lagret i anoksisk vann eller ikke. Andelen av egg med bakterier på Marin agar var 100 % hos begge gruppene. På Pseudomonas agar var det 88,9 % egg med bakterievekst fra gruppe L2 og 66,7 % egg med bakterievekst fra gruppe L3. På TCBS agar var forskjellen 77,8 % egg med bakterievekst fra gruppe L2 og 44,4 % egg med bakterievekst fra gruppe L3. Selv om andel egg med bakterievekst var lavere hos egg som var lagret i anoksisk vann, var ikke denne forskjellen signifikant. Forskjellene i andel egg med bakterievekst mellom gruppe L2 og gruppe L3 vurderes derfor ikke til å være årsaken til forskjellen i klekkesuksess i gruppene. Selv om både gruppe L2 og gruppe L3 hadde 100 % egg med bakterievekst kan det ha vært forskjeller i bakteriemengder i mellom disse gruppene. Denne metoden gir ingen informasjon om mengden bakterier som er tilstedet, bortsett fra at det var minst ett bakterieindivid i agarbrønnen ved starten av inkubasjonstiden (avsnitt 4.1).

Da det ble tatt agarprøver av egg etter lagring ble de forseglete brønnbrettene gjenglemt på et bord i laboratoriet med den konsekvens at de første 48 timene av inkuberingstiden var i et lyst rom med temperatur på 20 °C. Konsekvensene av dette var antageligvis at bakterieveksten var raskere de første 48 timene sammenlignet med om de var blitt inkubert ved 15 °C.

4.5 Sammenligning med andre studier

Det er ikke gjort mange studier på desinfisering av copepodeegg, men Næss and Bergh (1994) desinfiserte egg med glutaraldehyd og Buffodine. Mine funn samsvarer ikke helt med deres i

hvordan glutaraldehyd påvirket eggene etter klekking, men de brukte egg fra andre copepodarter i sine forsøk. Egg fra *A. tonsa* hadde en klekkesuksess på 80,2 % og viabilitet på 78,7 % ved desinfisering i glutaraldehyd (200 mg/L, 10 min). Næss og Bergh (1994) fant at egg fra *Acartia clausi* hadde dårlig toleranse for glutaraldehyd og til tross for 95,8 % klekkesuksess var det ingen overlevelse etter desinfisering i 250 ppm i 3 minutter. Samme studie viste at *Eurytemora affinis* hadde 79,2 % klekkesuksess og 73,7 % overlevelse etter desinfisering med glutaraldehyd. Dette var noen prosent lavere enn kontroller i begge testene. Viabilitet var ikke et direkte mål på dødelighet, men siden dette er basert på andelen av nauplier som hadde spor av alger i tarmen betyr det at overlevelsen var minst 70 %, ettersom døde nauplier ikke spiser. Det skal påpekes at det i denne oppgaven er brukt ferske egg fra en laboratoriekultur av copepoder, mens Næss and Bergh høstet inn egg fra sjøen og lagret dem en tid før bruk, noe som potensielt kan ha innvirkning på forskjeller i toleranse for desinfiseringsmidlene. Det er også forskjellige arter som er brukt, selv om *A. clausi* kan sies og være nærmere *A. tonsa* genetisk enn *E. affinis*. Buffodine var mildt mot egg fra *A. tonsa*, men hadde ikke like sterk bakteriereduserende effekt som glutaraldehyd. Buffodine var også det mildeste desinfeksjonsmiddelet Næss and Bergh (1994) undersøkte, med klekkeprosent på 100 % for *A. clausi* og 83,3 % for *E. affinis*. Middelet hadde også lavest bakteriereduserende effekt av midlene de testet, noe som stemmer overens med mine funn.

Etter desinfisering med Buffodine var andelen copepodeegg med bakterievekst på Marine agar 86,7 % (100 mg/L), 83,3 % (200 mg/L) og 23,3 % (400 mg/L). Salvesen og Vadstein (1995) evaluerte effekten av glutaraldehyd, natriumhypokloritt, chloroamine-T og Buffodine på egg fra rødspette, torsk og kveite. De desinfiserte fiskeegg med tilsvarende styrker av Buffodine og andelen fiskeegg med bakterievekst var over 50 % og opptil 100 %, avhengig av dosestyrke og gruppeforskjeller, for dosestyrker på 100 og 200 mg/L og i underkant av 50 % for 400 mg/L. Salvesen og Vadstein (1995) fant flere egg med bakterier hos den ene av to grupper og vurderte om forskjellene kunne handle om den initielle bakterebelastningen. glutaraldehyd hadde sterkere bakteriereduserende effekt på desinfisering av copepodeegg ved tilsvarende styrker (200 – 1600 mg/L) og kontakttider som Salvesen og Vadstein (1995) fant for fiskeegg, men som tidligere nevnt var temperaturene ulike. Andelen egg med bakterievekst var 0 – 3,7 % hos *A. tonsa* og rundt 5 – 35 % (avhengig av gruppe og dosestyrke) for fiskeegg (Salvesen og Vadstein, 1995).

Desinfisering av copepodeegg med natriumhypoklorid resulterte i 23,3 % (100 mg/L), 6,7 % (200 mg/L), 0 % (400 mg/L) og 3,3 % (800 mg/L) egg med bakterivekst. Natriumhypokloritt hadde også god bakteriereduserende effekt på fiskeegg (Salvesen og Vadstein, 1995). Den ene gruppen av fiskeegg ble desinfisert med tilsvarende dosestyrker som copepodeeggene og andelen av fiskeegg med bakterivekst varierte under 5 %. Den andre gruppen av fiskeegg ble desinfisert med 125, 250 og 500 mg/L og andelen fiskeegg med bakterivekst var fra rundt 20 % ved lavste styrke og til litt under 10 % ved høyeste styrke. Det virker som om copepodeegg har større toleranse til natriumhypokloritt sammenlignet med de marine fiskeeggene (Salvesen og Vadstein, 1995) selv om også klekkesuksessen hos copepodeeggene sank med økende dosestyrker.

Salvesen et al. (1997) desinfiserte egg fra kveite og piggvar med glutaraldehyd ved varierende dosestyrker og kontaktider. Prosentandelen av egg med bakterivekst etter desinfisering i glutaraldehyd (10 minutter) var varierende. Ved 400 mg/L var andelen 3 – 95 %, ved 800 mg/l var det 0 – 58 % og ved 1200 mg/L var det 0 – 20 % egg med bakterivekst. Eggene fra *A. tonsa* var desinfisert med både 400 mg/l og 800 mg/L og andelen av egg med bakterivekst var 3,3 % og 3,7 %. Dette samsvarer med de replikatene med lavest andel egg med bakterivekst hos Salvesen et al. (1997), men kveiteeggene og piggvareggene ble desinfisert på lavere temperaturer enn copepodeeggene og temperatur har innvirkning på effektiviteten til glutaraldehyd (Gorman, Scott et al. 1980).

4.6 Sammenligning av desinfeksjonsmidlene

Alle desinfiseringsmidlene hadde bakteriereduserende effekt, men graden varierte. De to desinfiseringsmidlene som hadde best bakteriereduserende effekt var glutaraldehyd og natriumhypokloritt. Behandling med glutaraldehyd førte til bakteriereduserende effekt allerede ved laveste dose (100 mg/L).

Klekkesuksessen hos egg desinfisert i ulike konsentrasjoner med glutaraldehyd (100, 200 og 800 mg/L) var ikke signifikant forskjellige fra kontroll og siden 200 mg/L ga en god bakteriereduksjon framstår dette som en trygg dose med god effekt. Klekkesuksessen hos egg desinfisert i 400 mg/L var signifikant lavere enn hos egg desinfisert i 800 mg/L. Trenden viser at klekkesuksessen ble signifikant lavere ved høyere doser (Tabell 3.1) og forskjellen i

klekkesuksess hos gruppene som var desinfisert i 400 mg/L og 800 mg/L kan være tilfeldig. Forskjeller i mengde organisk materiale som følger med prøvene kan også være en mulig forklaring på dette ettersom organisk materiale har en kjent innvirkning på effekten av glutaraldehyd. Organisk materiale kunne potensielt ha konkurrert om de aktive setene på desinfiseringsmolekylene (Gorman *et al.* 1980) og dermed ført til ujevnt fordeling av middel. Siden det er brukt et godt overskudd på desinfiseringsmiddel under disse forsøkene (gjelder samtlige midler) virker ikke dette sannsynlig. Under forsøkene ble det observert at copepodeeggene hadde en sterk tendens til å feste seg til hverandre, spesielt under mekanisk stress når vannet beveget seg. Det kan tenkes at dette medfører at eggenes overflate ikke var tilgjengelig for middelet og at organisk materiale kan forsterke dette problemet. Dette kan hypotetisk føre til at egg fra forskjellige doseringer har ujevnt dekning av desinfiseringsmiddel og dermed også forskjellig effekt i forhold til klekkesuksess.

Den bakteriereduserende effekten til natriumhypokloritt var også tydelig. Ved de fire høyeste dosene (200 mg/L – 1600 mg/L) var det mellom 6,7 % - 0 % egg med bakterievekst, men klekkesuksessen var signifikant dårligere allerede for egg desinfisert i 100 mg/L og trenden var at lavere klekkesuksess fulgte høyere dosestyrker ($t = 5,643$, $P < 0,001$, Tabell 3.1). Dette middelet kan brukes for å redusere bakteriebelastningen, men det vil redusere klekkesuksessen.

Pyceze og Buffodine hadde lavere bakteriereduserende effekt sammenlignet med de to andre midlene, men hadde til gjengjeld lite negativ effekt på klekkesuksess, spesielt Buffodine. Desinfiseringsmidlenes effekt på eggene kan variere ut ifra bakteriebelastningen fra start (Salvesen og Vadstein 1995). Desinfisering med Pyceze ga høyere andel egg med bakterier ved høyeste dose sammenlignet med Buffodine. Bakterieveksten ved den høyeste dosen til Pyceze var utelukkende på ett replikat, noe som kan antyde at det har skjedd noe feil under behandling av det aktuelle replikatet og at den høyeste dosen ved Pyceze ikke bør legges vekt på. Det var noen forskjeller mellom replikatene på andre tester også, men disse forskjellene var mindre og kan skyldes tilfeldig variasjon. Ved den høyeste dosen av Pyceze på viabilitet ble det observert forskjeller i mikroskopet. Naupliene var mindre, noe som kan bety at de hadde dødd på et tidligere stadium, brukt lengre tid per stadium eller at de brukte lengre tid på å klekke, selv om klekkesuksessen bare var 2,7 % lavere enn hos kontroll. Selv om forskjellen ikke var signifikant i *k*-kvadrattesten, så viste trenden at høyere dosestyrker hadde en

signifikant negativ innvirkning på nauplienes viabilitet. Den nest høyeste dosen (400 mg/L) framstår som godkjent både ved viabilitet og klekkeprosent, men andelen egg med bakterievekst ved dag 21 var 31,1 % (Marine agar) og 66,7 % (TCBS agar). Dette framstår derfor ikke som det beste alternativet.

Buffodine har ikke like gode antimikrobielle egenskaper som glutaraldehyd og natriumhypokloritt, men den bakteriereduserende effekten var svært god ved den høyeste dosen på 1600 mg/L. Bare 3,33 % av copepodeeggene hadde bakterievekst på Marine agar ved dag 21.

Klekkesuksessen hos eggene var noe bedre enn hos kontroll og viabiliteten var noe lavere, men dette var ikke statistisk signifikant og derfor framstår Buffodine ved en dosestyrke på 1600 mg/L er et godt alternativ til desinfisering av copepodeegg. Buffodine ga en jevn klekkeprosent for alle dosestyrker og kan dermed anses som et mildt middel. Dette kan ha noen fordeler. Under lagringsforsøkene ble Buffodine brukt sammen med glutaraldehyd. Dette er to forskjellige desinfiseringsmidler og det er mulig at de påvirker mikroorganismer og copepodeegg på forskjellige måter. Buffodine inneholder jod som aktivt virkestoff og jod er en oksidasjonsmiddel (Madigan 2009). glutaraldehyd er et alkylende desinfeksjonsmiddel og krysslinker aminogrupeer i proteiner (Gorman *et al.* 1980, McDonnell og Russell 1999). Den fulle virkningsmekanismen er ikke fullt kartlagt for noen av disse midlene, men det virker som om effekten ikke er lik. Dermed kan det tenkes at en kombinasjon av flere desinfiseringsmidler vil gi en bedre og bredere antimikrobielle effekt. Kombinasjonen av glutaraldehyd og Buffodine (gruppe L4) ga den beste bakteriereduserende effekten av alle behandlingene under lagringsforsøket. Det var signifikant færre egg med bakterier på Marine agar ($P = 0,002$) da andelen egg med bakterier var 70,0 %. Dette gjør den til eneste behandlingen som ikke resulterte i 100 % egg med bakterievekst på Marine agar 21 dager etter lagring. På TCBS agar var det 66,7 % egg med bakterievekst noe som var høyere enn hos gruppe L3 som hadde 44,4 % egg med bakterievekst etter 21 dager etter lagring, men det var ikke signifikant høyere. Det virker som denne behandlingen var svært effektiv mot *Pseudomonas* sp. ettersom det ikke ble registrert noen egg med bakterievekst på *Pseudomonas* agar, verken før eller etter lagring.

Problemet med denne behandling er at klekkesuksessen var lavere. Selv om klekkesuksessen hos behandling L3 (desinfisering med glutaraldehyd etterfulgt av lagring under anoksiske forhold) var signifikant lavere enn kontroll allerede før lagring, var ikke forskjellen like stor som hos de resterende behandlingene (Figur 3.25). Etter 31 dagers lagring var klekkesuksessen signifikant bedre hos denne gruppen enn de andre gruppene som var blitt desinfisert. Selv om forskjellen i klekkesuksess før og etter lagring var signifikant, så var den på bare 2 %, noe som betyr at dette var den behandlingen som var mildest mot eggene.

Selv om gruppe L4 med 70 % egg med bakterievekst på Marine agar er lavere enn de resterende gruppene som hadde 100 % bakterievekst på Marine agar, er ikke andelen egg med bakterievekst så lav som ønskelig. Det var forventet at bakterieveksten ville ta seg opp noe under lagring. Det var ingen av de behandlingene som hadde 100 % egg med bakterievekst ved dag 2. Dette er en indikasjon på at bakterienivået er lavere enn hos kontroll, selv om det er umulig å si noe om i hvilken grad ut ifra metoden som ble brukt.

Eggene fra gruppe L1 (kontroll) hadde 80,1 % klekkesuksess før lagring og 82,9 % klekkesuksess etter 1 måneds lagring. Denne forskjellen var ikke signifikant. Til sammenligning hadde Hagemann (2011) en nedgang i klekkesuksess av egg fra *A. tonsa* ved lagring i 1 måned under tilsvarende lagringsforhold. Før lagring hadde hans copepodeegg 91,0 % klekkesuksess og etter 1 måned var klekkesuksessen 63,5 %. Etter 3 måneder hadde klekkesuksessen økt til 76,4 % (Hagemann, 2011). Eggene i mine forsøk ble kultivert ved samme metode som Hagemann brukte og lagret i mørket slik som i hans forsøk. Metoden for å bestemme klekkesuksess var også lik, noe som betyr at forskjeller i metodikk derfor ikke er årsak til forskjellene i klekkesuksess. Forskjell i sammensetning av eggtyper kan være en mulig forklaring på dette.

Det var også forskjeller i eggenes klekkesuksess etter desinfisert i 200 mg/L glutaraldehyd mellom eggene som ble brukt i lagringsforsøket og de som ble brukt i desinfiseringsforsøket sammenlignet med kontroll. Gruppe L2 og L3 hadde 8 % lavere klekkesuksess enn kontroll før lagring og under glutaraldehydforsøket var forskjellen bare på 0,2 %. Hvis normale copepodeegg og forsinket klekkete egg har ulik toleranse for glutaraldehyd vil sammensetningen av eggtyper kunne ha vært en mulig forklaring på forskjellen i

klekkesuksess. En annen mulig forklaring kan være ujevn eksponering ovenfor desinfeksjonsmiddelet på grunn av eggens tendens til å klebre seg sammen.

Det ser ikke ut til at desinfisering av copepodeegg har noen forbedrende effekt på eggkvaliteten den første måneden under lagring.

4.7 Konklusjoner

Samtlige desinfiseringsmidler hadde en bakteriereduserende effekt.

glutaraldehyd (200 mg/L) ga god bakteriereduserende effekt uten å påvirke klekkesuksess negativt.

Desinfisering av egg fra *A. tonsa* før lagring fører til lavere klekkesuksess og mindre forskjeller av andel copepodeegg med bakterievekst.

4.8 Spørsmål ut fra data i denne oppgaven

Er det bedre å desinfisere egg etter lagring?

Er det bedre å desinfisere egg både før og etter lagring?

Kan kombinasjon av flere desinfiseringsmidler fungere bedre enn de ulike midlene hver for seg?

Ville lengre lagringstider ført til bedre klekkesuksess?

Vil bakterienivået ha innvirkning på eggens klekkesuksess etter en lengre lagringsperiode?

5 Referanser

Ahlstrom, E. H. and H. G. Moser (1980). "Characters useful in identification of pelagic marine fish eggs." California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports 21: 121-131.

Alekseev, V. R., et al. (2007). "Introduction to diapause." *Monographiae Biologicae* 84: 3-10.

Aller-Gancedo, J. M. and J. M. Fregeneda-Grandes (2007). "Comparative efficacy of Pyceze® (bronopol) in controlling mortality of brown trout *Salmo trutta* eggs." *Aquaculture Research* 38(6): 618-624.

Apostolov, K. (1980). "The Effects of Iodine on the Biological-Activities of Myxoviruses." *Journal of Hygiene* 84(3): 381-388.

Bell, J. G., et al. (2003). "Optimising lipid nutrition in first-feeding flatfish larvae." *Aquaculture* 227(1-4): 211-220.

Birkbeck, T. H., et al. (2006). "Activity of bronopol (Pyceze®) against bacteria cultured from eggs of halibut, *Hippoglossus hippoglossus* and cod, *Gadus morhua*." *Aquaculture* 254(1-4): 125-128.

Boxshall, G. A. and D. Jaume (2000). Making waves: The repeated colonization of fresh water by copepod crustaceans. *Advances in Ecological Research*. H. K. A. Rossiter, Academic Press. Volume 31: 61-79.

Cooper, R. A. (2007). "Iodine revisited." *International Wound Journal* 4(2): 124-137.

Drillet, G., et al. (2011). "Status and recommendations on marine copepod cultivation for use as live feed." *Aquaculture* 315(3-4): 155-166.

Drillet, G., et al. (2006). "Effect of cold storage upon eggs of a calanoid copepod, *Acartia tonsa* (Dana) and their offspring." *Aquaculture* 254(1-4): 714-729.

Dussart, B. and D. Defaye (2001). *Introduction to the copepoda*, Backhuys.

Dychdala, G. R. (1983). *Chlorine and chlorine compounds*.

The author reviews the use of chlorine compounds for disinfection purposes.

Evjemo, J. O., et al. (1997). "The stability of docosahexaenoic acid in two *Artemia* species following enrichment and subsequent starvation." *Aquaculture* 155(1-4): 135-148.

Evjemo, J. O. and Y. Olsen (1997). "Lipid and fatty acid content in cultivated live feed organisms compared to marine copepods." *Hydrobiologia* 358: 159-162.

FAO (1996). *Manual on the production and use of live food for aquaculture*.

FAO (2012). "The state of world fisheries and aquaculture."

Garcia, A. S., et al. (2008). "Use of differently enriched rotifers, *Brachionus plicatilis*, during larviculture of haddock, *Melanogrammus aeglefinus*: effects on early growth, survival and body lipid composition." *Aquaculture Nutrition* 14(5): 431-444.

Gorman, S. P., et al. (1980). "Antimicrobial Activity, Uses and Mechanism of Action of glutaraldehyde." *Journal of Applied Microbiology* 48(2): 161-190.

Gottardi, W. (2001). "Iodine and Iodine Compounds." *Disinfection, Sterilization, and Preservation*.(Fifth edition).

Govoni, J. J., et al. (1986). "The Physiology of Digestion in Fish Larvae." *Environmental Biology of Fishes* 16(1-3): 59-77.

Hagemann, A. (2011). Cold storage of eggs of *Acartia tonsa* Dana: effects of light, salinity and short-term temperature elevation on 48-h egg hatching success.

Hagiwara, A., et al. (2001). "Live food production in Japan: recent progress and future aspects." *Aquaculture* 200(1-2): 111-127.

Hansen, B. W., et al. (2010). "Production, hatching success and surface ornamentation of eggs of calanoid copepods during a winter at 57A degrees N." *Marine Biology* 157(1): 59-68.

Hansen, B. W., et al. (2012). "Do *Acartia tonsa* (Dana) eggs regulate their volume and osmolality as salinity changes?" *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* 182(5): 613-623.

Herson, D. S., et al. (1987). "Attachment as a Factor in the Protection of *Enterobacter-Cloacae* from Chlorination." *Applied and Environmental Microbiology* 53(5): 1178-1180.

Holste, L. and M. A. Peck (2006). "The effects of temperature and salinity on egg production and hatching success of Baltic *Acartia tonsa* (Copepoda : Calanoida): a laboratory investigation." *Marine Biology* 148(5): 1061-1070.

Humes, A. G. (1994). "How Many Copepods." *Hydrobiologia* 293: 1-7.

Huys, R. and G. A. Boxshall (1991). *Copepod evolution*, Ray Society London.

Kendall, A. W., E.H. Ahlstrom & H.G. Moser (1984). *Early Life History Stages of Fishes and Their Characters. Ontogeny and systematics of fishes : based on an international symposium*

dedicated to the memory of Elbert Halvor Ahlstrom

American Society of Ichthyologists and Herpetologists.

Knox, W. E., et al. (1948). "The Inhibition of Sulfhydryl Enzymes as the Basis of the Bactericidal Action of Chlorine." *Journal of Bacteriology* 55(4): 451-458.

Kumaran, S., et al. (2010). "Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. KUMS3 from Asian sea bass (*Lates calcarifer*) with fin rot." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26(2): 359-363.

Lagana, P., et al. (2011). "Susceptibility to antibiotics of *Vibrio* spp. and *Photobacterium damsela* ssp *piscicida* strains isolated from Italian aquaculture farms." *New Microbiologica* 34(1): 53-63.

Landry, M. R. (1983). "The Development of Marine Calanoid Copepods with Comment on the Isochronal Rule." *Limnology and Oceanography* 28(4): 614-624.

Loesche, W. J. (1969). "Oxygen Sensitivity of Various Anaerobic Bacteria." *Applied Microbiology* 18(5): 723-&.

López-Romalde, S., et al. (2003). "Existence of two O-serotypes in the fish pathogen *Pseudomonas anguilliseptica*." *Veterinary Microbiology* 94(4): 325-333.

Madigan, M. T. (2009). *Brock biology of microorganisms*. San Francisco, Benjamin Cummings.

Makridis, P. and Y. Olsen (1999). "Protein depletion of the rotifer *Brachionus plicatilis* during starvation." *Aquaculture* 174(3–4): 343-353.

Matzuk, M., et al. (2012). "The impact of the various chemical and physical factors on the degradation rate of bronopol." *International Journal of Cosmetic Science* 34(5): 451-457.

Mauchline, J., et al. (1998). "Advances in marine biology - The biology of calanoid copepods - Introduction." *Advances in Marine Biology*, Vol 33 33: 1-+.

Maugeri, T. L., et al. (2004). "Distribution of potentially pathogenic bacteria as free living and plankton associated in a marine coastal zone." *Journal of Applied Microbiology* 97(2): 354-361.

McDonnell, G. and A. D. Russell (1999). "Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance." *Clinical Microbiology Reviews* 12(1): 147-179.

McDonnell, G. E. (2007). Antisepsis, disinfection, and sterilization : types, action, and resistance. Washington, D.C., ASM Press.

McEvoy, L. A., et al. (1998). "Lipid and fatty acid composition of normal and malpigmented Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) fed enriched *Artemia*: a comparison with fry fed wild copepods." *Aquaculture* 163(3–4): 237-250.

Naidu, A. and N. Khanna (2000). Chloro-cides. Natural Food Antimicrobial Systems, CRC Press.

Navarro, J. C., et al. (1999). "Lipid conversions during enrichment of *Artemia*." *Aquaculture* 174(1-2): 155-166.

Næss, T. and Ø. Bergh (1994). "Calanoid copepod resting eggs can be surface-disinfected." *Aquacultural Engineering* 13(1): 1-9.

Næss, T. and Ø. Lie (1998). "A sensitive period during first feeding for the determination of pigmentation pattern in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., juveniles: the role of diet." *Aquaculture Research* 29(12): 925-934.

Payne, M. F. and R. J. Rippingale (2000). "Rearing West Australian seahorse, *Hippocampus subelongatus*, juveniles on copepod nauplii and enriched *Artemia*." *Aquaculture* 188(3–4): 353-361.

Pottinger, T. G. and J. G. Day (1999). "A *Saprolegnia parasitica* challenge system, for rainbow trout: assessment of Pyceze as an anti-fungal agent for both fish and ova." *Diseases of Aquatic Organisms* 36(2): 129-141.

Rodríguez, C., et al. (1996). "Improvement of the nutritional value of rotifers by varying the type and concentration of oil and the enrichment period." *Aquaculture* 147(1–2): 93-105.

Russell, A. A. D., et al. (2004). *Russell, Hugo & Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection, Preservation & Sterilization*, Wiley.

Rutala, W. A., et al. (1998). "Stability and Bactericidal Activity of Chlorine Solutions." *Infection Control and Hospital Epidemiology* 19(5): 323-327.

Salvesen, I., et al. (1997). "Surface disinfection of Atlantic halibut and turbot eggs with glutaraldehyde: evaluation of concentrations and contact times." *Aquaculture International* 5(3): 249-258.

Salvesen, I. and O. Vadstein (1995). "Surface disinfection of eggs from marine fish: evaluation of four chemicals." *Aquaculture International* 3(3): 155-171.

Sargent, J. R., et al. (1997). "Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds." *Aquaculture* 155(1–4): 117-127.

Sargent, J. R., et al. (1999). "Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions." *Aquaculture* 179: 217-229.

Shepherd, J. A., et al. (1988). "Antibacterial Action of 2-Bromo-2-Nitropropane-1,3-Diol (Bronopol)." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 32(11): 1693-1698.

Simpson, C. and J. Sofos (2009). *Antimicrobial Ingredients. Ingredients in Meat Products*. R. Tarté, Springer New York: 301-377.

Skjermo, J. and O. Vadstein (1993). "Characterization of the Bacterial-Flora of Mass Cultivated *Brachionus-Plicatilis*." *Hydrobiologia* 255: 185-191.

Sochard, M. R., et al. (1979). "Bacteria Associated with the Surface and Gut of Marine Copepods." *Applied and Environmental Microbiology* 37(4): 750-759.

Støttrup, J. G., McEvoi, L.A.E., (2003). *Live Feeds in Marine Aquaculture*, Blackwell Science Ltd.

Støttrup, J. G., et al. (1999). "The fate of lipids during development and cold-storage of eggs in the laboratory-reared calanoid copepod, *Acartia tonsa* Dana, and in response to different algal diets." *Aquaculture* 176(3–4): 257-269.

Tang, K. W. (2005). "Copepods as microbial hotspots in the ocean: effects of host feeding activities on attached bacteria." *Aquatic Microbial Ecology* 38(1): 31-40.

Treasurer, J. W., et al. (2005). "Surface disinfection of cod *Gadus morhua* and haddock *Melanogrammus aeglefinus* eggs with bronopol." *Aquaculture* 250(1–2): 27-35.

Walne, P. R. (1974). *CULTURE OF BIVALVE MOLLUSKS 50 YEARS EXPERIENCE AT CONWAY*.

Wlodkowski, T. J. and H. S. Rosenkranz (1975). "Mutagenicity of sodium hypochlorite for *Salmonella typhimurium*." *Mutation research* 31(1): 39-42.

Yoshimura, K., et al. (1997). "Recent development of a high density mass culture system for the rotifer *Brachionus rotundiformis* Tschugunoff." *Hydrobiologia* 358: 139-144.