

FORORD

Denne oppgaven ble utført ved Institutt for Bioteknologi ved NTNU, Trondheim, under veiledning av Professor Olav Vadstein og PhD stipendiat Torunn Forberg. Jeg vil gjerne rette en stor takk til dere begge for all veiledning, gode råd og god støtte underveis i prosessen, og for at dere har fått meg til å bli oppriktig interessert i faget mitt. Jeg vil også takke alle på instituttets laboratorier for god hjelp når det har trengtes, og for det gode miljøet.

En spesiell takk går til Ane Kjersti og Susana for utallige kaffepauser og lån av små husrom og gigantiske hjerterom når det har vært nødvendig, og ellers alle dere som har bidratt til at mine utallige år på universitetet har blitt en fantastisk periode i livet mitt.

Til slutt vil jeg takke familien min som har stått bak meg og mine valg hele veien, og for deres evne til å nikke og smile og virke interessert hver gang jeg har lagt ut om torskens liv og leven.

SAMMENDRAG	4
1 INTRODUKSJON	6
1.1 KRITISKE ASPEKTER VED OPPDRETT AV TORSKEYNGEL (GADUS MORHUA)	6
1.2 FISK - BAKTERIEINTERAKSJONER	8
1.3 MIKROBIELL KONTROLL I YNGELPRODUKSJON	11
1.3.1 Probiotiske bakterier.....	12
1.3.2 Quorum sensing.....	14
1.4 MÅL OG DELMÅL	19
2 MATERIALER OG METODER.....	20
2.1 BIOLOGISK MATERIALE.....	20
2.1.1 Bakteriefrie algekulturer.....	20
2.1.2 Bakteriefrie rotatoriekulturer	21
2.1.3 Bakteriekulturer	22
2.1.4 Kvantifisering av bakterier	23
2.2 ANRIKING AV QUORUM SENSING HEMMENDE KANDIDATER.....	27
2.2.1 Tillaging av cellefritt vann anrikt med AHL.....	27
2.2.2 Anriking av AHL-nedbrytende kandidater fra torsk.....	28
2.2.3 Nedbryting av autoindusermolekyler fra <i>Vibrio harveyi</i>	29
2.2.4 Anriking av <i>Listonella anguillarum</i> autoinduser-nedbrytende kandidater fra torsk	30
2.2.5 Nedbryting av autoindusermolekyler fra <i>Listonella anguillarum</i>	30
2.3 TORSKELARVEFORSØK	30
2.3.1 Etablering av bakteriefrie torskeegg	30
2.3.2 Korttidsforsøk.....	31
2.3.3 Startføringsforsøk.....	33
2.4 ANALYTISKE METODER	36
2.4.1 Måling av total ammonia	36
2.4.2 Primersekvenser for genuttrykk hos torsk	36
2.4.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)	39
2.4.4 Isolering av RNA og syntese av cDNA	40
2.4.5 Kvantifisering av genuttrykk med kvantitativ real time PCR (qPCR)	43
2.5 BIOINFORMATISKE METODER	48
2.5.1 BLAST.....	48
3 RESULTATER	49
3.1 FORSØK MED LEVENDE OG DØDE PROBIOTISKE KANDIDATER.....	49
3.1.1 Startføringsforsøk.....	49
3.1.2 Korttidsforsøk med levende og døde probiotiske kandidater.....	64
3.2 FORSØK MED QUORUM SENSING HEMMENDE KANDIDATER	71

3.2.1	<i>Nedbryting av autoindusere fra Vibrio harveyi</i>	72
3.2.2	<i>Nedbryting av autoindusere fra Listonella anguillarum</i>	73
3.2.3	<i>Overlevelse for torskelarver</i>	74
3.2.4	<i>Kvantifisering av bakterier</i>	76
4	DISKUSJON	77
4.1	EVALUERING AV MODELLSYSTEMET	77
4.2	EFFEKT AV LEVENDE OG DØDE PROBIOTISKE KANDIDATER PÅ TORSKELARVER.....	79
4.2.1	<i>Overlevelse hos torskelarver</i>	79
4.2.2	<i>Kvantifisering av genuttrykk hos torskelarver fra startføringsforsøk</i>	81
4.2.3	<i>Kvantifisering av genuttrykk hos torskelarver fra korttidsforsøk</i>	83
4.3	FORSØK MED QUORUM SENSING HEMMENDE KANDIDATER	84
4.3.1	<i>Effekt av quorum sensing hemmende kandidater på overlevelse hos torskelarver</i>	84
4.3.2	<i>Anriking av quorum sensing hemmende kandidater</i>	86
4.4	FORSLAG TIL VIDERE ARBEID	87
5	KONKLUSJON	89
	LITTERATURLISTE	91
	VEDLEGGSLISTE	102

SAMMENDRAG

Ved produksjon av torskelarver (*Gadus morhua*) har man ofte opplevd problemer med lav reproduksjonen blant annet på grunn av bakterielle infeksjoner. For å forsøke å redusere bruken av antibiotika i oppdrettsnæringen forsøker man å finne ulike måter å kontrollere det mikrobielle miljøet rundt fiskelarvene. En type mikrobiell kontroll er tilsetning av probiotiske bakterier til vannet eller fôret for å kolonisere torskelarvene med ønskede bakterier. En annen type mikrobiell kontroll er å hindre patogene bakterier i å skade fiskelarvene ved å forstyrre quorum sensing prosessen.

Dette ble foretatt et 17 dagers startfôringsforsøk og et 5 dagers korttidsforsøk. Startfôringsforsøket ble gjennomført i 2 liters flasker med filtrert autoklavert sjøvann (FASV) (30 torskelarver L⁻¹) med aktiv lufting og torskelarvene ble fôret hver dag fra dag 3 etter klekking. Korttidsforsøket ble gjennomført i flasker med 50 mL FASV (30 torskelarver) uten lufting og fôring. Systemene ble holdt gnotobiotiske under hele forsøket.

Microbacterium sp., *Pseudoalteromonas* sp. og *Vibrio* sp., tre probiotiske kandidater ble undersøkt med hensyn til deres innvirkning på torskelarvers vekst, overlevelse og genuttrykk. Levende *Microbacterium* sp. og *Pseudoalteromonas* sp. hadde en negativ effekt på torskelarvenes overlevelse, mens *Vibrio* sp. hadde ingen effekt i forhold til den bakteriefri kontrollbehandlingen. De probiotiske kandidatene tilsatt som monokulturer hadde ingen probiotisk effekt på torskelarvene. Døde bakterier gav ingen respons med hensyn til torskelarvenes overlevelse, og det ble konkludert med at bakteriene må være levende/aktive for å ha en effekt.

8 ulike gener ble kvantifisert for torskelarvene fra startfôringsforsøket og to av genene ble kvantifisert for larvene fra korttidsforsøket med levende og døde probiotiske bakterier. *Fiaf* og *Fdps* er gener som er involvert i fiskens næringsmetabolisme. Uttrykket av disse genene var oppregulert i behandlingene med levende *Microbacterium* sp. Dette var også tilfellet for *Cyp1a1* som er involvert i den xenobiotiske metabolismen. *C3* og *Gpx2* er begge gener som er koblet til immunsystemet, og disse hadde begge høyest uttrykk i larvene fra den bakteriefrie kontrollbehandlingen, og lavest uttrykk i larvene fra behandlingen med død *Microbacterium* sp. *CLECT* er også et gen som er involvert i fiskens immunrespons, men her var det ingen

signifikante forskjeller mellom uttrykket i de ulike behandlingene. Det var det heller ikke for *WARS*, et gen involvert i fiskens proteinsyntese. *Itgb1bp3* koder for integrin β -1-binding protein, og dette var uttrykt høyest i behandlingene med levende *Microbacterium* sp. For torskelarvene fra korttidsforsøket ble genene *C3* og *Cyp1a1* kvantifisert, og begge gener var høyest uttrykt hos larvene fra behandlinger med *L. anguillarum* og *Pseudoalteromonas* sp. Behandlingene med døde bakterier gav generelt sett lavere respons enn behandlingene med levende bakterier.

Potensielle quorum sensing nedbrytende kandidater fra torskefeces ble anrikt med cellefritt vann fra *L. anguillarum* og AHL-molekyler. Tre av anrikingssamfunnene ble benyttet i et korttidsforsøk med *L. anguillarum* som kjent patogen. Behandling med levende *L. anguillarum* førte til rask død etter bakterietilsetning, mens tilsetning av død *L. anguillarum* ikke hadde noen effekt på overlevelsen i forhold til en bakteriefri kontrollbehandling. Tilsats av de anrikede bakteriesamfunnene uten challenge av *L. anguillarum* hadde ingen effekt på torskelarvenes overlevelse, men alle tre samfunn hadde evnen til å utsette *L. anguillarum* sin patogene effekt med omtrent 3 dager. Bakteriesamfunnenes positive effekt på torskelarvene kom av deres evne til nedbryting av *L. anguillarum*'s quorum sensing signalmolekyler.

1 INTRODUKSJON

Torsk (*Gadus morhua*) er en marin kaldtvannsfisk av typen beinfisk (teleost) som lever blant annet langs hele norskekysten. Fordelaktige priser på torsken i de siste årene har gjort torskeoppdrett til en potensielt attraktiv næring. Ved utgangen av 2007 var det 97 selskaper som drev med omsetning av torsk, og 299 personer var ansatt i denne næringen. I løpet av 2007 ble det til sammen solgt 11 104 tonn torsk i Norge, hvorav 10 375 tonn var torsk produsert basert på yngel som var klekket i fangenskap og 729 tonn var fra produksjon basert på villfanget småfisk (Fiskeridirektoratet 2007). I følge Fiskeri- og havbruksnærings landsforening (FHL) forventes det at torskeoppdrett vil bli en stor og viktig havbruksnæring i tiden fremovers (Nordli 2009), selv om utviklinga ikke har vært så rask som først antatt. Det er per dags dato to avlsprogram på torsk i Norge, Marine Breed og Nofima Marin i Tromsø, og resultatene fra disse programmene er svært lovende. Disse avlsprogrammene er langsiktige og deres mål er å produsere torsk som tilfredsstillende alle kriterier rundt fiskehelse, miljøpåvirkning, kvalitet og økonomi (Nordli 2009).

1.1 Kritiske aspekter ved oppdrett av torskeyngel (*Gadus morhua*)

De fleste marine fiskearter gjennomgår mer eller mindre den samme grunnleggende utviklingen fra egg til voksen fisk. Selv om det er forskjeller mellom ulike arter, gjennomgår alle 5 ulike utviklingsstadier (Kjørsvik et al. 2004) (Figur 1):

Egg:	Et innkapslet embryo (fra egglegging til klekking).
Plommesekk-larve:	Et frittlevende embryo med en plommesekk (fra klekking til eksogen foring).
Larve:	Fra start av eksogen foring til gjennomgått metamorfose.
Metamorfose:	Overgangen mellom larve og juvenil.
Juvenil:	Har den endelige fenotypen, men er ikke kjønnsmoden.

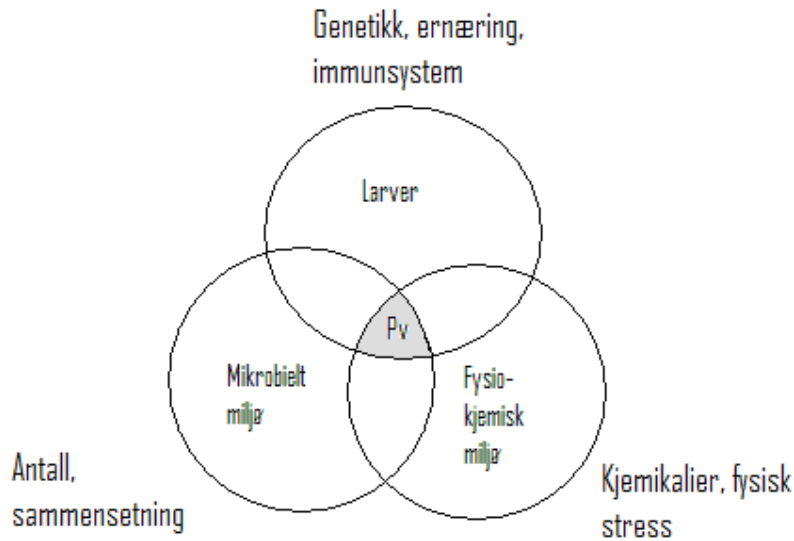


Figur 1 Torsk i de ulike utviklingsstadiene fra egg, gjennom plommesekkstadiet, metamorfosen, og til juvenil (Foto: Diego Mendiola og Kari Johanne Kihle Attramadal).

Lengden på de ulike stadiene varierer fra art til art. Arter som torsk, piggvar (*Psetta maxima*) og kveite (*Hippoglossus hippoglossus*) har i forhold til arter som for eksempel steinbit (*Anarhichas lupus*) og laks, et kort eggstadie og en lang larveperiode, noe som innebærer at larven er relativt lite utviklet ved klekking. Det er også store forskjeller mellom artene når det gjelder eggenes størrelse og type. Mange marine fiskearter, som for eksempel torsk, legger relativt små, pelagiske egg som befruktes utenfor mor, og som flyter individuelt nær vannets overflate. Mange ferskvannsarter og enkelte marine arter derimot, legger store demersale egg på bunnen eller festet til et substrat. Slike egg har vanligvis et tykkere eggskall enn pelagiske egg.

Ved produksjon av marine fiskelarver, deriblant torsk, har reproduksjonen målt i overlevelse og vekst ofte vært lav. Produksjonen av høy kvalitets yngel er en av de viktigste flaskehalsene i oppdrett av flere marine fiskearter (Salvesen et al. 1995; Vadstein 1997), på grunn av at torskelarvene har høy dødelighet de første 2-3 ukene etter klekking. I følge Kjærsvik et al. (2006) er forskjellene i størrelse og embryoets utvikling hovedgrunnene til problemene rundt oppdrett av marine fiskearter, da pelagiske larver er mindre utviklet ved overgangen til startfôring enn de demersale larvene. Dødeligheten kan også skyldes smittsomme sykdommer, og at torskens spesifikke immunsystem ikke utvikles fullt ut før 2-3 måneder etter klekking (Magnadottir et al. 2004; Magnadottir et al. 2006).

Forhold som øker sannsynligheten for å få levedyktige larver avhenger av tre samvirkende faktorer. Dette inkluderer larvene selv, det mikrobielle- og det fysio-kjemiske miljøet. Disse faktorene påvirkes igjen av mange ulike forhold, som for eksempel larvenes genetiske arv, det mikrobielle miljøets sammensetning, og ulike kjemikalier i det kjemiske miljøet (Vadstein 1997). Samhandlingen mellom de ulike faktorene er fremstilt i Figur 2.

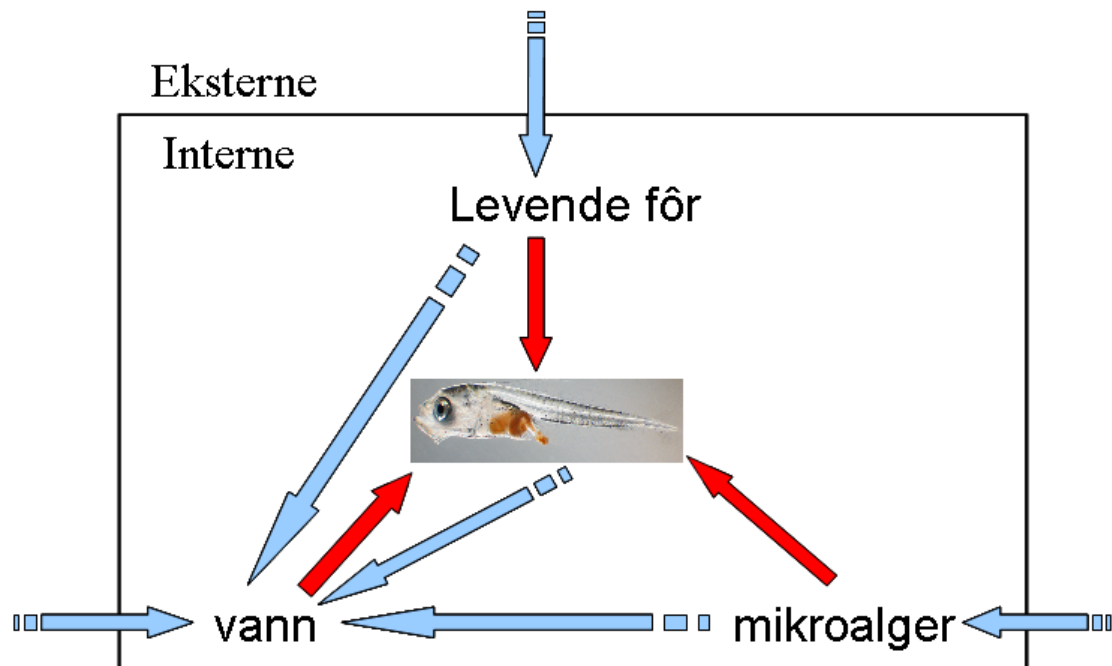


Figur 2 Tre viktige faktorer som påvirker sannsynligheten for å få levedyktige larver (P_v) og ulike forhold som påvirker disse. Modifisert figur fra Vadstein (1997).

Figur 2 illustrerer at sannsynligheten for å få levedyktige larver, P_v , øker dersom en bruker metoder som skyver de tre sirklene mot hverandre. En kan også se at forskyving av kun en av sirklene vil ha en begrenset effekt. Målet blir derfor å finne en strategi som benytter tiltak rettet mot alle de tre ulike aspektene.

1.2 Fisk - bakterieinteraksjoner

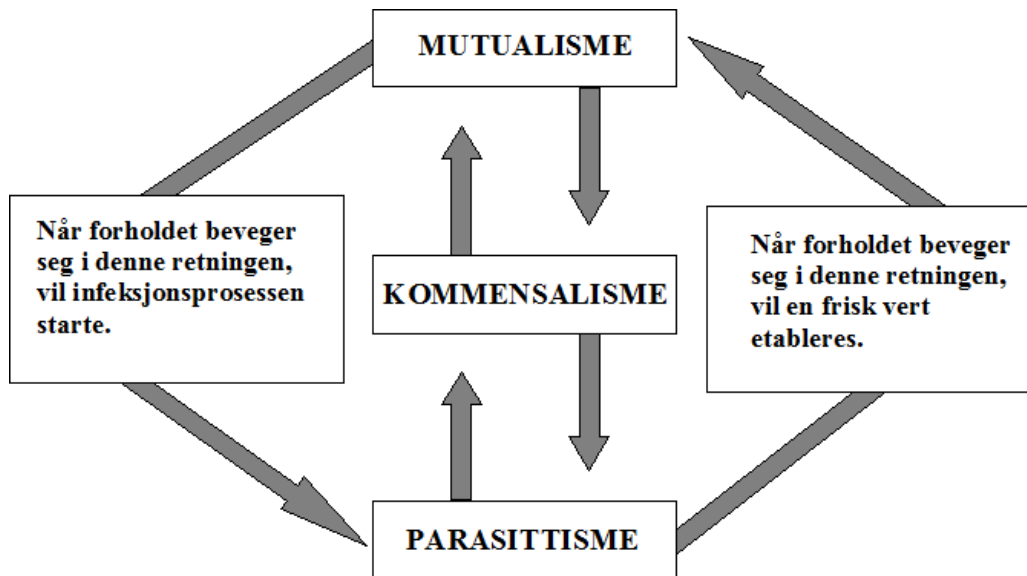
Med tanke på interaksjoner mellom mikrobielle organismer og eukaryoter, må fisk og andre dyr som lever i vann tåle mer i forhold til dyr som lever i luft. Sjøvann fungerer som et medium for både transport og vekst av mikroorganismer, mens luft hovedsaklig kun sees på som et transportmedium (Hansen et al. 1999). Akvatiske dyr lever i et miljø hvor patogener ofte kan leve uavhengig av sine verter, og fisk lever normalt i bakteriekonsentrasjoner rundt $1\ 000\ 000$ bakterier mL^{-1} , og viruskonsentrasjoner som kan være 10-100 ganger høyere enn bakteriekonsentrasjonene. Mikrobielle organismer kan overføres til, eller samvirke med fisk på en rekke ulike måter (Figur 3). Blant annet tas bakterier opp gjennom fôr og når larvene drikker. Kildene for interaksjon kan deles inn i eksterne og interne kilder, som har sterk påvirkning på hverandre (Vadstein et al. 2004).



Figur 3 Viktige eksterne og interne bakterielle kilder, som samvirker med fisk (modifisert fra Vadstein et al. 2004) (Foto: Diego Mendiola).

I motsetning til terrestriske dyr, som får overført bakterier gjennom kontakt med mor, legger fisker og andre akvatiske dyr akseniske egg i vannet. Den mikrobielle økologien under utvikling av egg hos torsk og kveite (*Hippoglossus hippoglossus*) har blitt beskrevet i en undersøkelse utført av Hansen og Olafsen (1989). Det ble observert signifikant bakterievekst på overflata av torskeegg to timer etter befruktning, og innen klekking på dag 18 var eggene dekket av bakterier (Hansen et al. 1989).

Interaksjoner mellom bakterier og deres verter er symbiotiske forhold som deles inn i tre ulike hovedtyper (Figur 4). De ulike formene for symbiose er mutualisme, kommensalisme og parasittisme. Mutualisme er den mest fordelaktige symbioseformen og skjer når begge symbionter oppnår noe positivt fra forholdet. Kommensalisme er et forhold hvor en av symbiontene får fordeler fra symbiosen, mens den andre (verten) verken skades eller hjelpes. Parasittisme er den mest skadelige formen, og skjer når den ene symbionten lever på bekostning av, eller skader verten (Madigan et al. 2006).



Figur 4 Skjematisk oversikt over dynamikken i ulike typer symbiotiske forhold (modifisert fra Prescott et al. (1999)).

Opportunistiske bakterier er bakterier som ikke nødvendigvis er patogene, men de kan kolonisere en vert dersom denne er svekket, eller bakteriekonsentrasjonen er høy nok. En slik overkolonisering kan være skadelig for verten (Vadstein et al. 2004). Det har blitt vist at kolonisering av patogener eller opportunistiske bakterier på overflata av fiskeegg kan være skadelige og forårsake sykdommer hos egg (Hansen et al. 1992) og larver (Bergh et al. 1997). Flere undersøkelser har konkludert med at problemer som oppstår under produksjon av fiskeyngel, som oftest skyldes opportunistiske bakterier, og ikke spesifikke patogener (Hansen et al. 1989; Munro et al. 1995; Vadstein et al. 2004).

For å hindre at ugunstige mikroorganismer koloniserer larvene, er det viktig å ha en stabil, mutualistisk, mikroflora i larvenes tarmsystem. Dette kan føre til at invaderende populasjoner av mikroorganismer, inkludert patogene bakterier, blir forhindret fra å kolonisere dette systemet. I følge en review av Ringø og Birkbeck (1999) viser mange rapporter at bakterier isolert fra mukus fra fisk produserer forbindelser som hindrer veksten til mange ulike fiskepatogener. I tillegg kan ufarlige mikroorganismer motvirke infeksjoner og vekst av patogener, ved at de blokkerer steder de patogene bakteriene kan feste seg til (Ringø et al. 1999).

1.3 Mikrobiell kontroll i yngelproduksjon

Figur 2 viser hvilke faktorer som er med på å påvirke sannsynligheten for å få levedyktige fiskelarver. Dersom disse faktorene endres i riktig retning, kan det bidra til å øke denne sannsynligheten. Vadstein et. al (1993) kom med et forslag om en generell strategi for mikrobiell kontroll, som tar hensyn til både økologiske forhold og de tre faktorene i Figur 2. Strategien innebærer ikke bruk av antibiotika, og baserer seg på bruken av tre ulike elementer: Ikkeselektiv reduksjon av bakterier; selektiv forbedring av bakterier; og forbedring av fiskelarvenes motstandsdyktighet mot bakterier (Tabell 1).

Tabell 1 Tre elementer i en strategi for å oppnå mikrobiell kontroll i oppdrett av marine fiskelarver. Her med eksempler på mulige metoder for de ulike elementene i strategien (Vadstein et al. 1993).

Element 1. Ikkeselektiv reduksjon av bakterier

- Overflatedesinfisering av egg
- Reduksjon i tilførsel av organisk materiale
- Fjerning av organisk materiale
- Kontroll av bakteriell biomasse ved beiting

Element 2. Selektiv forbedring av bakterier

- Seleksjon av ønskede bakterier
- Tilførsel av utvalgte bakterier til oppdrettstanker
- Inkorporering av utvalgte bakterier i fôret

Element 3. Forbedring av fiskelarvenes motstandsdyktighet mot bakterier

- Stimulering av det generelle immunforsvaret
 - Modulering av maternal immunitet
-

For å undersøke interaksjoner mellom vert og mikroorganismer er bruken av gnotobiotiske systemer et godt verktøy. Et gnotobiotisk system er dyr, for eksempel fisk, som holdes i bakteriefrie forhold eller i et miljø med en spesifikk mikroflora. På denne måten kan man karakterisere det aktuelle dyrets funksjon i et bakteriefritt eller gnotobiotisk miljø for så å undersøke effekten av å tilsette en bestemt bakteriepopulasjon (Marques et al. 2006). Man kan dele inn det en kan forske på ved hjelp av gnotobiotiske systemer, i tre kategorier: a) ernæringsbehov; b) vert/mikrobe interaksjoner; c) og metabolske funksjoner.

1.3.1 Probiotiske bakterier

En type mikrobiell kontroll som har gitt økt levedyktighet for fiskelarvene, er å tilsette probiotiske bakterier til vannet eller fôret, med det mål å kolonisere fiskelarvene med ønskede bakterier. Dette hører til under element 2 i Vadstein et al. (1993) sin strategi (Tabell 1) (Verschuere et al. 2000; Makridis et al. 2000a; Makridis et al. 2000b; Vine et al. 2006).

Verschuere et al. (2000) bruker følgende definisjon av probionter: Probionter er levende mikrobielle organismer, som utøver positive effekter på verten ved å; modifisere mikrobielle samfunn assosiert med verten eller i vertens omgivelser; forbedre fôropptaket eller fôrets næringsverdi; forbedre vertens respons mot sykdommer; eller forbedre kvaliteten på vertens omgivelser. Organismer som går inn under denne definisjonen er mikrober som hindrer patogene bakterier i å reproducere seg i vertens tarm, på overflatestrukturer og i miljøet som omgir verten; som sikrer optimalt næringsopptak ved å påvirke vertens fordøyelse; som forbedrer vannkvaliteten; eller som stimulerer vertens immunsystem (Verschuere et al. 2000).

Flere ulike mekanismer er viktige for at effektene nevnt ovenfor skal kunne oppnås. Fjellheim (2006a) summerer i sin PhD-oppgave de viktigste av disse:

- Produksjon av inhibitoriske forbindelser
- Konkurransen om adhesjonssteder
- Økning av immunrespons
- Produksjon av fordøytige forbindelser, som for eksempel fordøyelsesenzymer og vitaminer.
- Antivirale effekter
- Forbedring av vannkvaliteten

I tillegg må de probiotiske bakteriene kunne feste seg til, og vokse i mukus i tarmen, og kunne tolerere miljøet i vertens mage og tarm, for å kunne kolonisere verten (Fjellheim 2006). Fjellheim et al. (2006a) brukte to strategier for seleksjon av probiotiske kandidater fra torskelarvenes tarmsystem (intestinal tract): a) å isolere den dominante bakteriefloraen i larvenes tarm, og b) å isolere bakterier som produserer antimikrobielle forbindelser mot den patogene bakterien *L. anguillarum*. Nesten 500 kandidater ble isolert, og etter videre testing *in vitro* ble 7 kandidater plukket ut til et *in vivo* eksperiment. Dette førte til at to kandidater ble

forkastet, mens 5 kandidater førte til økt overlevelse hos torskelarvene i forhold til den positive kontrollen. 4 av disse probiotiske kandidatene er vist i Tabell 2.

Tabell 2 Egenskaper hos fire utvalgte probiotiske kandidater (Fjellheim et al. 2006b). Antagonisme-kolonnene indikerer hvor mange av de fire patogene og de tre dominante bakteriene som ble inhibert. Extracellulær enzymproduksjon sikter til den totale poengsummen for alle de 19 extracellulære enzymene (maksimum poengsum 5 for hver av de 19 enzymene, med maksimum totalsum på 95). Antall enzymer produsert viser kun til enzymer med en produksjonspoengsum høyere enn 2.

Egenskaper	ND2-7	RD5-30	RA4-1	RA7-14
Nærmeste match i GenBank	<i>Microbacterium</i> sp.	<i>Vibrio gallicus</i>	<i>Roseobacter</i> sp.	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.
Seleksjonsstrategi	Dominant	Dominant	Antagonist	Antagonist
Antagonisme mot patogener	0	0	4	3
Antagonisme mot dominante	0	0	1	1
Adhesjon til mucus (%)	1,5	4	20	2
Vekstrate i mucus h ⁻¹	0,033	0,075	Ingen vekst	0,097
Vekstrate i marine broth, h ⁻¹	0,130	0,248	0,166	0,217
Extracellulær enzymproduksjon	42	22	22	47
Antall enzymer produsert	9	5	3	9
Fermentative i OF medium	-	+	-	-
Ureaseaktivitet	-	-	+	+

Utvelgelsen av de 7 isolatene ble gjort av Fjellheim, med bakgrunn i isolatenes egenskaper (Fjellheim 2006; Fjellheim et al. 2006a). Antagonisme ble kun funnet i isolatene fra den antagonistiske seleksjonsstrategien, og isolatene med antagonisme mot flere patogener, deriblant *L. anguillarum*, ble foretrukket. Evne til adhesjon og vekst i mukus er viktige egenskaper for å muliggjøre kolonisering av tarmsystemet (intestinal tract). Kandidater med høy evne til adhesjon til mukus ble foretrukket, men kandidater med lavere adhesjon ble også plukket ut dersom de gjorde det bra i andre tester. Produksjon av mange ekstracellulære enzymer, som kan bidra på en fordelaktig måte til fiskens fordøyelse, ble lagt mer vekt på enn kandidatenes vekstrate i mukus. Dette for å hindre at opportunistiske bakterier ble valgt.

Det finnes mange undersøkelser som tar for seg bruk av probiotiske bakterier for å øke fiskelarvers overlevelsessevne. Sammenhengen mellom probiontenes fordelaktige effekter, og deres undertrykkelse av patogene bakterier *in vivo*, trenger imidlertid videre undersøkelser. Selv om det kan være en sammenheng mellom bakterienes næringsverdi og deres probiotiske effekt bør disse to egenskapene undersøkes hver for seg (Verschuere et al. 2000). Ved tilsats av levende probiotiske kandidater under produksjon av torskelarver, kan deres probiotiske effekt på torskelarvene *in vivo* undersøkes. Dersom døde probiotiske kandidater tilsettes kan man se om bakterienes næringsverdi har en effekt på torskelarvene, eller om bakterier som partikler kan ha en påvirkning på torskelarvenes immunsystem. Ved å sammenligne disse resultatene, kan en finne ut om bakteriene må være aktive for å ha en positiv effekt på torskelarvene, eller om det er bakterienes bestanddeler som står for effekten.

Det er blitt vist at bakterier kan bidra til å øke næringsverdien i fôr som brukes i dyrking av *Artemia*, ved at bakteriene direkte eller indirekte er en av hovedkildene for proteiner, vitaminer, essensielle aminosyrer, fettsyrer, polyaminer, enzymer og uorganiske næringsstoffer (Hessen et al. 1990; Gorospe et al. 1996). Marques et al. (2005) fant at døde bakterier kan øke biomasseproduksjonen hos *Artemia*, og at overlevelsessevnen øker ved tilsats av døde bakterier. Dette gjelder spesielt ved bruk av fôr med lavt næringsinnhold. I det aktuelle forsøket så det likevel ikke ut til at døde bakterier bidro med nok næringsstoffer til at den individuelle lengden hos *Artemia* øker (Marques et al. 2005).

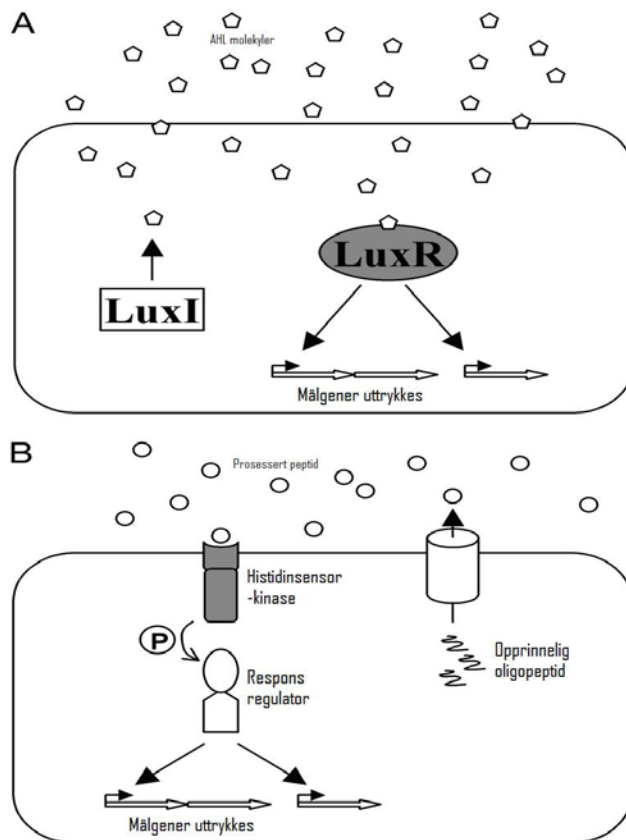
Taoka et al. (2006) viste at døde bakterieceller kan ha en positiv effekt på tilapia (*Oreochromis niloticus*). Både tilsettelse av døde og levende bakterier førte til reduserte stressfaktorer hos fisken, samt at hemoglobinnivået i blodet økte. Men ved tilsetting av en patogen bakterie hadde behandlingen med levende probiotiske bakterier størst effekt på fiskens overlevelse (Taoka et al. 2006).

1.3.2 Quorum sensing

Quorum sensing er en form for kommunikasjon som brukes av bakterier. Denne kommunikasjonen består av frigjøring, detektering og respons på endringer i konsentrasjonen av kjemiske signalmolekyler som kalles autoindusere. Bakteriene kan slik kontrollere uttrykket av ulike gener basert på populasjonstettheten. På denne måten kan en bakteriepopulasjon koordinere genuttrykket til hele bakteriepopulasjonen (Schauder et al. 2001). Mange bakterielle fenotyper hos gram positive og gram negative bakterier kontrolleres

på denne måten. Eksempler på dette er luminescens, sporedannelse, produksjon av antibiotika, dannelse av biofilm og produksjon av lytiske enzymer, toksiner og molekyler brukt i adhesjon (Bassler et al. 1993; Miller et al. 2001; Schauder et al. 2001; Whitehead et al. 2001).

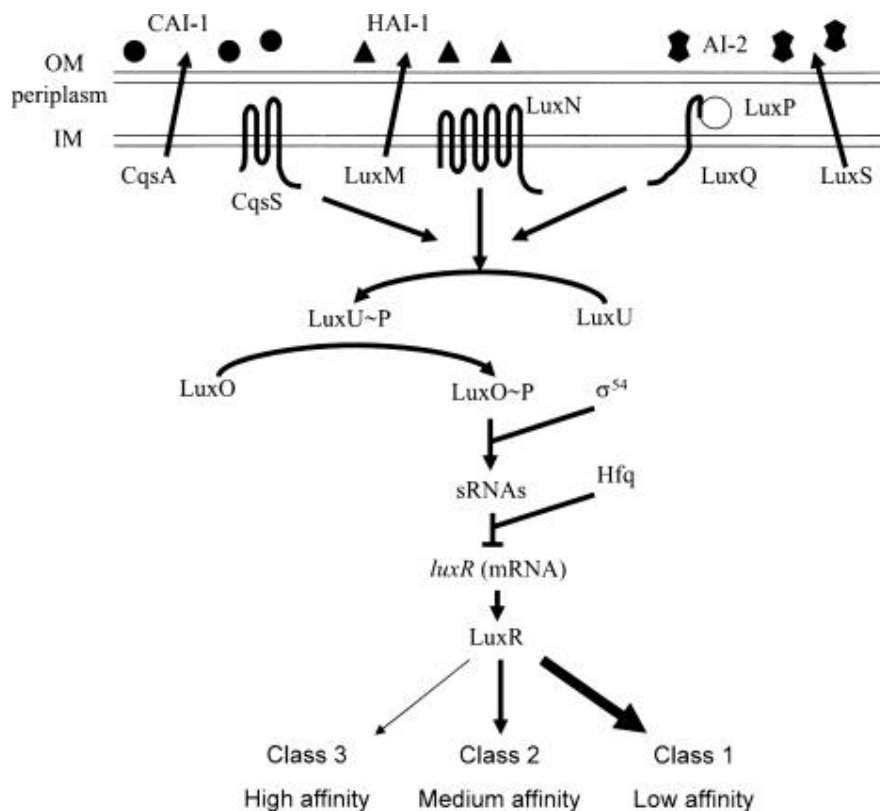
Quorum sensing ble først oppdaget i den marine bakterien *Vibrio fischeri* av Nealson og Hastings (1979). Bioluminescens skjer kun ved høye bakteriekonsentrasjoner, og denne prosessen kontrolleres ved hjelp av quorum sensing (Nealson et al. 1979). Det finnes i hovedsak tre ulike quorum sensing systemer (Defoirdt et al. 2004). Gram negative bakterier, som *V. fischeri*, benytter acetylerede homoserinlactoner (AHL) som sine autoindusere, mens gram positive bakterier bruker prosesserte oligopeptider (Figur 5) (reviews fra Miller et al. 2001; Schauder et a. 2001; Whitehead et.al 2001).



Figur 5 (modifisert fra Miller og Bassler 2001) **A)** Gram negative bakterier har minst to regulatoriske proteiner, som er homologe til proteiner funnet hos *V.fischeri*. Disse kalles LuxI og LuxR. LuxI-lignende proteiner står for biosyntesen av AHL molekyler. LuxR-lignende proteiner binder disse autoinduserene når de kommer opp på et visst konsentrasjonsnivå. LuxR-autoinduser kompleksset, kan da aktivere transkripsjon av spesifikke målgener (Miller et

al. 2001). **B)** Gram positive bakterier bruker prosesserte oligopeptider som sine autoindusere. Disse fraktes ut av cella, og når den extracellulære konsentrasjonen er høy nok, vil en histidinsensor-kinase detektere peptidene, og dermed aktiveres ved autofosforylering. Fosforgruppa overføres til en respons-regulator inne i cella, som etter fosforylering kan aktivere transkripsjonen av spesifikke målgener (Miller et al. 2001).

Det tredje systemet benytter flere ulike AHL molekyler som fungerer sammen (Figur 6) og finnes hos *Vibrio harveyi*. Denne metoden består av tre system som har hver sine autoindusere, henholdsvis harveyi autoinduser 1 (HAI-1, *N*-(3-hydroksybutanoyl) homoserin lakton) (Cao et al. 1989), autoinduser 2 (AI-2, 3A-metyl-5,6-dihydro-furo(2,3-D)(1,3,2)dioksaborole-2,2,6,6A-tetraol) (Chen et al. 2002), og en tredje autoinduser, cholerae autoinduser 1, som kalles CAI-1 (Henke et al. 2004a). Disse systemene fungerer på en koordinert måte for å kontrollere blant annet bioluminescens, type III sekresjon og produksjon av metalloprotease. HAI-1 produseres av proteinet LuxM og detekteres av LuxN, mens AI-2 produseres av LuxS, og detekteres av to proteiner, LuxP og LuxQ, som fungerer sammen. CAI-1 produseres av en autoindusersyntase kalt CqsA, og detekteres av sensoren CqsS. Resten av signalsporet er likt for de tre systemene (Figur 6) (Cao et al. 1989; Bassler et al. 1993; Bassler et al. 1994; Chen et al. 2002; Henke et al. 2004a; Henke et al. 2004b).



Figur 6 Modell av *Vibrio harveyi* quorum sensing systemene. *V.harveyi* har tre parallelle systemer som regulerer uttrykket av ulike gener. Hvert av systemene har sin egen autoinduser, HAI-1, AI-2 og CAI-1, som produseres av hver sine syntaser, og detekteres av hver sine sensorer (Waters et al. 2006).

For å belyse hvordan disse systemene virker, tas det her utgangspunkt i bakteriens evne til bioluminescens. Ved lav celledetthet, det vil si lav konsentrasjon av autoindusere, autofosforyleres LuxN og LuxQ. Fosforgruppene overføres så til LuxU, som er et fosfotransferaseprotein, som så overfører gruppene videre til LuxO. Dette fører til at LuxO aktiveres, som sammen med σ^{54} , aktiverer uttrykket av gener som koder for små regulatoriske RNA molekyler (sRNA). Disse vil, sammen med Hfq, et RNA chaperon, destabilisere *luxR* mRNA, og LuxR produseres ikke. Operonet *luxCDABE*, som koder for luciferase, vil da ikke transkribes, og bakteriene vil ikke kunne produsere lys. Ved høy celledetthet, det vil si høy konsentrasjon av autoindusere, endres LuxN og LuxQ til fosfataser, og fosfatgrupper fjernes fra LuxO. LuxO vil da inaktiveres, *luxR* uttrykkes, LuxR bindes til *luxCDABE* promotoren, noe som aktiverer uttrykket av operonet, og bakterien produserer lys (Defoirdt et al. 2004).

Mange virulensfaktorer hos patogene bakterier styres av quorum sensing. Å kunne forstyrre quorum sensing prosessen er fortsatt et relativt utforsket område, men de rapportene som foreligger tilsier at dette kan ha potensiale innen sykdomsbekjempelse blant akvatiske organismer. Defoirdt et al. (2004) har listet opp 5 ulike teknikker som kan brukes for å hindre quorum sensing:

1. Inhibering av biosyntesen av signalmolekyler.
2. Bruk av quorum sensing antagonist.
3. Kjemisk inaktivering av signaler brukt i quorum sensing.
4. Biologisk nedbryting av signalmolekyler.
5. Bruk av quorum sensing agonister.

I et forsøk utført av Defoirdt et al. (2006), ble det vist at *Artemia franciscana* kunne beskyttes mot patogene bakterier som *Vibrio harveyi*, *V. campbellii* og *V. parahaemolyticus*, ved bruk av brominerte furanoner. Bakterienes AI-2 baserte quorum sensing system regulerer virulensen mot *A. franciscana*. Dette systemet ble hindret ved bruk av en naturlig og en syntetisk brominert furanon, noe som førte til at *A. franciscanas* overlevelse økte. *V. harveyi* har også en negativ innvirkning på veksten til rotatorien *Brachionus plicatilis*. Tinh et al. (2007a) har gjennomført et forsøk og konkludert med at to av quorum sensing systemene til *V. harveyi* er nødvendige for at bakteriene skal ha en vekstreduserende effekt på *B. plicatilis*.

V. harveyi er en viktig patogen i oppdrett av blant annet reker. Karunasagar et al. (1994) fant ved undersøkelse av et tilfelle av massedød i et klekkeri for *Penaeus monodon*, at antibiotikaresistente linjer av *V. harveyi* kunne isoleres fra alle infiserte larver (Karunasagar et al. 1994). Problemet med antibiotikaresistente linjer av *V. harveyi*, gjør det nødvendig å finne nye metoder for å bekjempe sykdomsutbrudd grunnet denne bakterien. *V. harveyi* er en av mange bakterier som benytter AHL molekyler som signalmolekyler i quorum sensing. Ved å bruke bakteriesamfunn som kan bryte ned disse signalmolekylene, vil en muligens kunne redusere bakteriens patogene effekt ved å hindre quorum sensing.

1.4 Mål og delmål

Denne oppgavens mål var å studere torskelarve/bakterie interaksjoner ved hjelp av gnotobiotiske systemer. Torskelarvenes respons ble målt med genuttrykk, vekst og overlevelse. Målet ble delt opp i følgende to delmål:

1. Teste effekten av quorum sensing inhiberende bakterier på en patogens evne til å skade torskelarver.
2. Vurdere betydningen av levende versus døde bakterier for genuttrykk, vekst og overlevelse hos torskelarver.

2 MATERIALER OG METODER

2.1 Biologisk materiale

2.1.1 Bakteriefrie algekulturer

Bruk av marine mikroalger er svært utbredt i startfôringsforsøk med marine fiskelarver. Algene brukes i produksjon av rotatorier som brukes som levende fôr, og de gis også direkte til larvene sammen med rotatoriene (Naas et al. 1992; Reitan et al. 1993; Reitan et al. 1997). Denne metoden, som innebærer bruk av små mengder mikroalger, kalles grønt-vann metoden, og brukes i produksjon av de fleste marine fiskearter. Algen kan fungere som næring både for fiskelarver i tidlige utviklingsstadier og rotatorier. Det antas at bruken av mikroalger i startfôringsprosessen forbedrer næringsforholdene for fiskelarvene på to måter. Enten direkte, eller ved å øke rotatoriens næringsverdi (Reitan et al. 1997). I følge Naas et.al (1992) vil tilsetning av alger i fisketankene føre til at lysforholdene i tankene og også fiskelarvenes spisevaner endrer seg.

Algen som ble brukt i forsøkene var *Isochrysis sp.*, og ble kjøpt fra Culture Collection. Der var den allerede gjort bakteriefri. Algen ble dyrket bakteriefritt i F/2 medium (Tabell V2.3) i dyrkningsflasker med aktiv lufting ved 20°C og konstant lys.

Ved bruk av alge som karbonkilde for rotatorier er det nødvendig å estimere mengde karbon i algekulturen. Dette ble gjort ved at den optiske tettheten (OD) til algen ble målt ved 750 nm, og resultatet etter målingene ble omregnet til mgC L⁻¹ ved hjelp av følgende empiriske formel (Reitan et al. 1994):

$$C_{\text{alge}} (\text{mgC L}^{-1}) = 133,5 X - 2,8055$$

Hvor:

OD₇₅₀ er optisk tetthet ved 750 nm i 1 cm kyvette.

2.1.2 Bakteriefrie rotatoriekulturer

Rotatorien som ble brukt i forsøkene var *Brachionus "Nevada"* (Sintef Fiskeri og Havbruk, Trondheim). Rotatoriekulturen hadde tidligere blitt gjort bakteriefrie av Phd stipendiat Torunn Forberg. Alle rotatorier ble dyrket bakteriefritt i FASV ved 20°C og konstant belysning, i flasker med aktivt luftesystem. *Isochrysis* sp. ble brukt som fôr. *B. "Nevada"* krever 2-4 mg C/L for maksimal veksthastighet (μ_{\max}). Maksimal veksthastighet kan antas å være 1,0 d⁻¹. For å finne optimal tilsats av alge brukes følgende formler:

Biomasse i kulturen etter ett døgn:

$$B_1 = B_0 \times e^{\mu}$$

Hvor:

B_1 og B_0 = Biomasse dag 1 og dag 0 (individ mL⁻¹)

μ = veksthastighet (d⁻¹)

Karbonproduksjonen i perioden:

$$P_{\text{ind}} = B_1 - B_0 \text{ eller } P_c = P_{\text{ind}} \times \mu \text{ g C/ individ}$$

Antar her at $\mu \text{ g C/ individ} = 0,3$

Karbonkonsumpsjonen i perioden:

$$K_c = P_c / Y$$

Hvor:

Y = vekstutbyttet, antas å være 0,3 mgC mgC⁻¹

Karbonkonsumpsjonen blir da:

$$K_c = 1,7 \mu \text{ g } C_{\text{alge}} / \mu \text{ g } C_{\text{rotatorie}} \times \text{d}^{-1}$$

$$K_{\text{ind}} = Kc \times \mu\text{g C/ individ} = 0,51 \mu\text{g } C_{\text{alge}} / \text{individ d}^{-1}$$

Mengde alge som skal tilsettes per mL rotatoriekultur kan så beregnes ut fra følgende formel:

$$\text{mL alge} = B_o \times K_{\text{ind}} / C_{\text{alge}}$$

For å bestemme antall rotatorier mL^{-1} , tas en prøve fra kulturen og antall rotatorier telles under lupe. Før telling fikseres rotatoriene ved tilsetning av sur Lugols løsning (Tabell V2.6). Ti dråper rotatoriekultur à 100 μL ble satt på en petriskål, og 1 dråpe lugol ble tilsatt før telling i lupe. Ved uttak av større prøvevolum ved lave rotatorietettheter, ble Lugols løsning tilsatt direkte til prøven. Prøven ble så latt stå urørt i 5 minutter slik at de fikserte rotatoriene sank. Det meste av prøven ble så fjernet, og restvolumet ble helt over i telleskip.

2.1.3 Bakteriekulturer

For å anslå antall bakterier i en bakteriekultur, ble den optiske tettheten (OD) målt ved 660 nm i et spektrofotometer, og resultatet etter målingene ble omregnet til CFU mL^{-1} (Colony Forming Units) ved hjelp av empiriske formler etablert for hver bakterielinje av Fjellheim (2006) (Tabell 3). Bakteriene ble dyrket i Marine Broth på risting, ved romtemperatur og i lys. De ulike bakterielinjene som ble brukt i forsøkene er presentert i Tabell 3.

Tabell 3 Bakterielinjer brukt i korttidsforsøk og startfôringsforsøk, sammen med empiriske formler for konvertering av OD_{660} til CFU mL^{-1} .

Bakterie	Linje	CFU mL^{-1} vs OD_{660} (=X)
<i>Vibrio</i> sp.	RD5-30	$2 \times 10^9 X - 5 \times 10^7$
<i>Roseobacter</i> sp.	RA4-1	$9 \times 10^8 X - 4 \times 10^7$
<i>Microbacterium</i> sp.	ND2-7	$2 \times 10^9 X - 4 \times 10^8$
<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	RA7-14	$1 \times 10^9 X - 4 \times 10^7$
<i>Listonella anguillarum</i>	HI6-10	$1200 \times 10^6 X$

For å kvantifisere bakterier som bryter ned quorum sensing signalmolekyler ble *Vibrio harveyi* linje BB120, og ulike mutante linjer brukt (Tabell 4). Alle linjene ble dyrket i Marine Broth på risting, ved 28°C i mørket.

Tabell 4 *Vibrio harveyi* linjer brukt for kvantifisering av AHL-molekyler (Fra Bonnie Bassler ved Departement of Molecular Biology, Princeton University, New Jersey, USA).

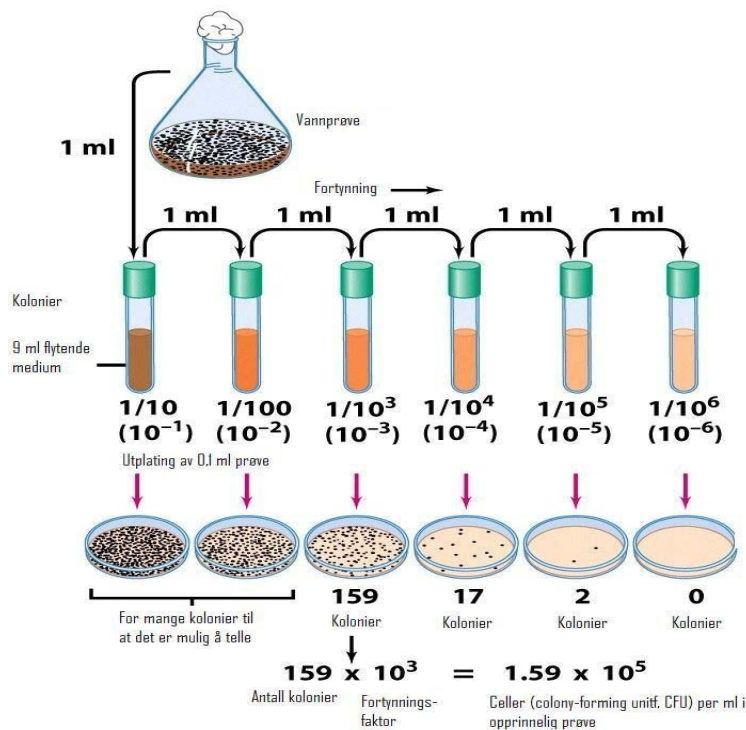
Linje	Egenskap
BB120	Villtype
JMH612	Ikkefungerende AI-2 og CAI-1 reseptorer
JMH597	Ikkefungerende HAI-1 og CAI-1 reseptorer
JAF375	Ikkefungerende HAI-1 og AI-2 reseptorer

2.1.4 Kvantifisering av bakterier

Det ble tatt ut vannprøver omtrent hver tredje dag i startfôringsforsøket, og bakterietetthet og eventuell kontaminering i disse ble undersøkt ved bruk av flytende og fast medium (Marine Broth og M65 (Tabell V2.1)). I tillegg ble det tatt ut vannprøver ved avslutning av både startfôringsforsøket og korttidsforsøkene, og CFU mL⁻¹ ble beregnet ved utplating av en fortynningsrekke på fast medium (Marine Broth og M65). Bakterietettheten ble også beregnet ved bruk av flow cytometri.

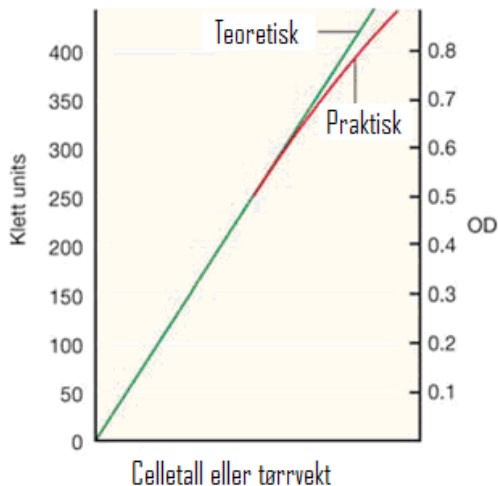
2.1.4.1 CFU (colony-forming units) og OD (optical density)

Ved utplating av prøver på fast medium ble 0,1 mL vannprøve strøket ut på agarplater ved hjelp av en glasstav eller glasskuler. Utplating av større prøvevolum enn dette anbefales ikke, da det kan føre til at overskuddsvæske ikke absorberes i agaren. Koloniene kan da vokse inn i hverandre og på grunn av dette bli vanskelig å telle. En annen faktor som kan føre til feiltelling, er om antallet bakterier i prøven er for høyt. Dersom det er for mange bakterier på en plate kan det skje at celler ikke danner kolonier, og voksende kolonier kan overlape (Madigan et al. 2006). For å unngå dette ble det her brukt fortynningsrekker ved utplating av vannprøver tatt ved avslutningen av forsøkene. Oppsett av en slik fortynningsrekke er vist i Figur 7. Ved å telle koloniene på platene og ta hensyn til fortynningsfaktoren kan en finne CFU mL⁻¹ i den opprinnelige prøven.



Figur 7 Prosedyre for telling av bakterier på fast medium ved hjelp av en fortynningsrekke (modifisert fra Madigan og Martinenko 2006).

En mer indirekte måte å måle bakterievekst på, er å se på turbiditeten i flytende medium. En bakteriesuspensjon vil se turbid ut på grunn av at bakteriecellen sprer lyset som går gjennom suspensjonen. Jo flere bakterieceller det er i suspensjonen, jo mer vil lyset spres og turbiditeten øker. Turbiditeten ble her målt ved hjelp av et spektrofotometer, som måler mengden lys som går gjennom suspensjonen. Bølgelengder som brukes i slike målinger er typisk 540 nm (grønn), 600 nm (oransje) eller 660 nm (rød). Reduksjonen av lys som går gjennom suspensjonen når antallet bakterieceller øker, blir oppgitt i optisk densitet (OD) for et spektrofotometer. Ved svært høye celletall kan målingene bli feil, på grunn av at lys som sendes bort når det støter på en celle, kan sendes tilbake av en annen celle. Ved slike tilfeller vil forholdet mellom OD og celletall ikke være lineært (Figur 8), og celledensiteten bør fortynnes (Madigan et al. 2006). I denne oppgaven ble dette gjort ved dyrking av bakterier som skulle brukes i de ulike forsøkene. Det ble målt OD ved 660 nm, og celletallet i suspensjonen ble så beregnet ut fra empiriske formler (Tabell 3).



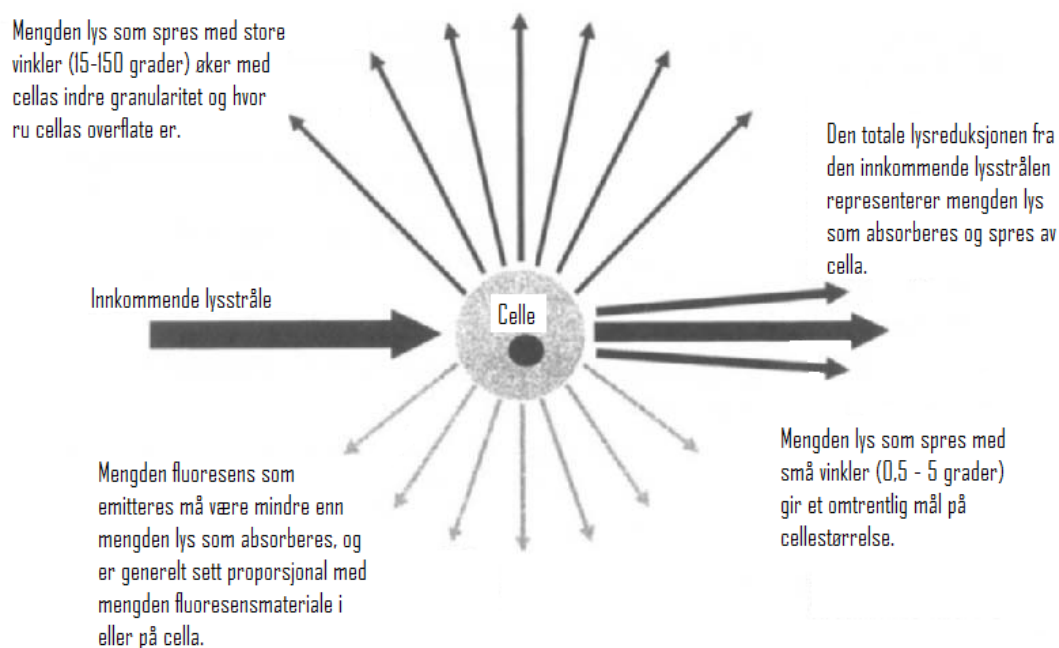
Figur 8 Forholdet mellom celletall eller tørrvekt, og turbiditetmålinger (OD). 1:1 forholdet mellom OD og celletall avviker fra lineariteten ved høy turbiditet (modifisert fra Madigan et al. 2006).

2.1.4.2 Flow cytometri

Den generelle definisjonen av cytometri er en prosess hvor enkeltcellers, eller andre biologiske eller ikke-biologiske partiklers, fysiske og/eller kjemiske karakteristikk måles. Metoden kan blant annet brukes for telling og identifisering av mikroorganismer. I flow cytometri gjøres målingene ved at cellene eller partiklene som skal undersøkes sendes i en væskestrøm gjennom en lysstråle med en viss bølgelengde. Partiklene blir som regel farget eller merket med fluoriserende merker (tags), noe som fører til at de kan detekteres elektronisk når de passerer gjennom en laserstråle (Marie et al. 1997; Marie et al. 1999; Davey et al. 1999). Flere detektorer er rettet mot punktet hvor strømmen av partikler passerer lysstrålen. En detektor går i samme retning som lysstrålen (Forward Scatter, FSC), og flere går vinkelrett på lysstrålen (Side Scatter (SSC) og en eller flere detektorer for fluoresens) (Marie et al. 1997; Marie et al. 1999; Davey et al. 1999; Shapiro 2003). I dette forsøket ble det benyttet FACSScan flow cytometry (Becton Dickinson, USA) utstyrt med en laser (15 mW, 488 nm) og standard oppsett av filter (beskrevet i Marie et al. 1999).

Hver partikkel eller celle som passerer lysstrålen vil spre dette lyset på en viss måte (Figur 9), og fluoriserende materialer på eller i partiklen kan eksiteres slik at det sender ut lys som har en lengre bølgelengde enn lyskilden. Denne kombinasjonen av spredt og fluoriserende lys plukkes opp og analyseres av de ulike detektorene. Ut fra denne informasjonen kan en si noen

om de fysiske og kjemiske egenskapene til partiklene som går gjennom lysstrålen. FSC gir informasjon om partiklenes volum, og SSC om den indre strukturen til partiklene.



Figur 9 Spredning av lys i møte med en celle (modifisert fra Shapiro 2003).

I denne oppgaven ble metoden brukt til å kvantifisere antall bakterier i vannprøver fra de ulike behandlingene i startfôringsforsøket. Dette for å følge med på de tilsatte bakterienes utvikling med hensyn til vekst, og for å undersøke eventuell kontaminering i bakteriefrie behandlinger, behandlinger tilsatt døde bakterier og bakteriefrie rotatorie- og algekulturer. Det ble tatt ut vannprøver til undersøkelse på dag 6, 10 og 17 (avslutning av forsøket) etter klekking, og rotatorie- og algekulturene ble undersøkt ved avslutning av forsøket.

Før måling ble alle prøvene fortynnet. Prøvene fra dag 6 etter klekking ble alle fortynnet 1:10 og kjørt på "low". På dag 10 og ved avslutningen av forsøket, ble prøven fra den bakteriefrie behandlingen fortynnet 1:10 og kjørt på "low", mens de andre prøvene ble fortynnet 1:50 og kjørt på "high". Flow rate for "low" og "high" var på henholdsvis $18,57 \mu\text{L min}^{-1}$ og $47,31 \mu\text{L min}^{-1}$.

For hver prøve ble det laget en 500 μL prøveblanding for måling. Før blandingen ble satt på apparatet, ble den inkubert i mørket ved romtemperatur i 15 minutter. Blandingene inneholdt følgende:

50 μL prøve

2 μL 1 μm monodisperse fluoriserende kuler (2 μL kuler, 498 μL MilliQ)

443 μL FASV

5 μL SYBR® green I (Molecular Probes)

Ved beregning av antall celler mL^{-1} fra antall "events" ble fortynningsfaktoren først tatt hensyn til, og deretter ble følgende formel brukt;

$$(\text{events} / \text{flow rate}) \times 1000 = \text{celler } \text{mL}^{-1}$$

2.2 Anriking av quorum sensing hemmende kandidater

Tinh et al. (2007c) isolerte bakteriesamfunn som kan bryte ned signalmolekyler fra tarmen til rekearten *Penaeus vannamei*, ved seleksjon med en miks av ulike N-acyl homoserinlaktone (AHL) molekyler (Tinh et al. 2007c). Dette hører til under teknikk 4 biologisk nedbryting av signalmolekyler brukt i quorum sensing fra Defoirdt et al. (2004), og vil bli fokusert på i denne oppgaven. Dette er en kombinert bruk av element 1 og element 2 i Vadstein et al. sin strategi for å oppnå mikrobiell kontroll i oppdrett av marine fiskelarver, nærmere bestemt overflatedesinfisering av egg, etterfulgt av enten seleksjon av ønskede bakterier eller tilførsel av selekterte bakterier.

Det ble her forsøkt isolert quorum sensing nedbrytende bakteriesamfunn fra torskefeces. Dette ble gjort ved anriking med en miks av ulike AHL molekyler. Ved anriking med AHL molekyler som eneste karbonkilde, kan en isolere bakterier som kan utnytte disse molekylerne som næringsstoffer.

2.2.1 Tillaging av cellefritt vann anriket med AHL

Det ble laget cellefritt vann anriket med AHL fra *L. anguillarum*, HI-610 og fra *V. harveyi*, BB120. Det ble brukt samme fremgangsmåte for begge linjene (Tinh et al. 2007c). Kulturene ble dyrket i Marine Broth til OD_{660} var på omtrent 1. Kulturene ble deretter overført til sterile sentrifugerør, og sentrifugert på 5000 rpm, 4°C i 10 minutter. Supernatanten ble så helt av, og pellet ble resuspendert i autoklavert NaCl-løsning (20 g L^{-1}). Kulturene ble så inkubert med risting ved 28°C i 30 minutter. Etter inkuberingen, ble de igjen sentrifugert på 5000 rpm, 4°C i 10 minutter. For å fjerne alle bakteriecellene, ble supernatanten filtersterilisert to ganger (0,2

µm Millipore sprøytefilter). Det cellefrie vannet ble oppbevart ved -30°C i maks én måned.

2.2.2 Anriking av AHL-nedbrytende kandidater fra torsk

Mikrobielle samfunn ble anriket fra feces og tarminnhold fra 3 individer av torsk, henholdsvis fisk 1, 2 og 3, fanget i Trondheimsfjorden (modifisert protokoll fra Tinh et al. 2007c). Fra hver fisk ble det tatt to prøver. Det ble klemt ut feces fra endetarmen (prøver F1, F2 og F3) og deretter ble tarmen tatt ut, og det resterende innholdet ble skrapet ut (prøver F1_{tarm}, F2_{tarm} og F3_{tarm}). Det ble også tatt ut to prøver av det resterende innholdet i plastposen fiskene hadde blitt oppbevart i (prøver Mix 1 og Mix 2).

Prøvene ble suspendert i 5 mL autoklavert NaCl-løsning (20 g mL⁻¹) og satt til inkubering ved romtemperatur i 2 timer. De ble deretter sentrifugert ved 1000 rpm i 1 minutt, og supernatanten ble tatt ut og oppbevart i 20 % glyserol ved -80°C.

De mikrobielle samfunnene som ble isolert fra torsken ble brukt videre som startmateriale for å isolere AHL-degraderende bakterier. Dette ble gjort ved at 200 µL av supernatanten ble inokulert i et minimalt medium bestående av 20 mL NSS tilsatt PO₄ og sporelementer (Tabell V2.2, V2.4 og V2.5) og 5 mg L⁻¹ AHL miks (Tabell 5).

Tabell 5 AHL-molekyler brukt til anriking av bakteriesamfunn (Tinh et al. 2007c)

AHL-molekyl	Forkortelse
N-butyryl-DL-homoserin thiolakton	C ₄ -HST
N-butyryl-DL-homoserin lakton	C ₄ -HSL
N-heksanoyl-DL-homoserin lakton	C ₆ -HSL
N-octanoyl-DL-homoserin lakton	C ₈ -HSL
N-heptanoyl-DL-homoserin lakton	C ₇ -HSL

Kulturene ble så inkubert med risting ved 28°C. Dette ble gjort i 6 sykluser, som hver varte i 48 timer. Det ble laget 3 paralleller av hver prøve. Etter hver syklus, ble 200 µL av kulturen overført til en ny kolbe med friskt medium. Dersom det var tegn til vekst i kolbene, ble celletettheten bestemt ved måling av optisk tetthet (OD) ved 660 nm og ved utplating av 50 µL kultur på Marine agar.

2.2.3 Nedbryting av autoindusermolekyler fra *Vibrio harveyi*

Dette ble gjort ved hjelp av Tinh et al. (2007c) sin protokoll. De tre anrikingskulturene med høyest vekst ble inokulert i Marine Broth og dyrket ved 28°C med risting i 48 timer. Kulturene ble så inokulert i cellefritt vann fra *Vibrio harveyi* BB120, til en tetthet på 10^6 CFU mL⁻¹. Kontrollen inneholdt cellefritt vann fra BB120. Det ble laget 3 paralleller for hver prøve. Kulturene ble så inkubert ved 28°C med risting i 24 timer, og deretter sentrifugert ved 5000 rpm i 10 minutter. For å fjerne alle bakteriecellene ble supernatanten filtersterilisert over 0,2 µm Millipore sprøytefilter.

For å beregne mengden *V. harveyi* autoindusere som fortsatt var i supernatanten ble evnen til å indusere bioluminescens i *V. harveyi* dobbeltmutanter (Tabell 6). Hver av mutantene fungerte som reporterlinje for en av de tre autoinduserene *V. harveyi* bruker i sitt quorum sensing system, ved at to av tre reseptorer var ikke-fungerende. Mengden av de ulike autoinduserene i supernatanten ble beregnet ut fra mutantenes evne til å indusere bioluminisens.

Tabell 6 *V. harveyi* dobbeltmutanter brukt i denne oppgaven

Linje <i>V. harveyi</i> dobbeltmutanter	Autoinduser mutanten er reporter for
JMH612	HAI-1
JMH597	AI-2
JAF375	CAI-1

Dobbeltmutantene ble dyrket i Marine Broth, ved 28°C med risting, til OD₆₆₀ var på omtrent 1. Kulturene ble så fortynnet 1:5000 i friskt medium. 50 µL av hver av de fortyndede reporterlinjene ble så blandet med 50 µL av den filtersteriliserte supernatanten i eppendorfrør. Negativ kontroll var dobbeltmutanter i friskt Marine Broth, og positiv kontroll var dobbeltmutanter i cellefritt vann fra BB120. Det ble laget 3 paralleller av hver behandling, og en av negativ og positiv kontroll. Eppendorfrørene ble så inkubert ved 28°C med risting i 3 timer for JAF375-linjen, og 4 timer for JMH612- og JMH597-linjene. Intensiteten på bioluminiscensen til de ulike kulturene, ble så målt i “relative light units” (RLU) ved hjelp av et 20/20^h Luminometer (Turner Biosystems).

2.2.4 Anriking av *Listonella anguillarum* autoinduser-nedbrytende kandidater fra torsk

På samme måte som *V. harveyi* er *L. anguillarum* også en viktig fiskepatogen, som skaper problemer for oppdrettsnæringen. Ved å anrike bakteriesamfunn med cellefritt vann fra *L. anguillarum*, kan en isolere bakterier som kan nyttiggjøre seg forbindelsene *L. anguillarum* bruker som signalmolekyler i quorum sensing.

Det ble laget cellefritt vann fra *L. anguillarum*, HI-610, som beskrevet tidligere. 50 µL av de ulike suspensjonene fra fiskene, ble inokulert i 5 mL cellefritt vann fra HI-610 og deretter inkubert med risting ved 28°C i 48 timer. Dette ble gjort i 6 sykluser. Etter hver syklus ble 50 µL overført til 5 mL friskt cellefritt vann fra HI-610. Veksten i anrikingsmediet ble undersøkt ved måling av OD₆₆₀ og ved utplating av 50 µL kultur på Marine Agar.

2.2.5 Nedbryting av autoindusermolekyler fra *Listonella anguillarum*

Mengden av autoindusere i alle de ulike kulturrene, ble beregnet ut fra bioluminescens hos *V. harveyi* dobbeltmutanter (Tabell 6), på samme måte som tidligere beskrevet. For å få høy nok vekst til å gjennomføre luminescens assayet, ble kulturrene først podet over i Marine Broth, og satt til inkubering ved 28°C med risting, i 48 timer.

2.3 Torskelarveforsøk

2.3.1 Etablering av bakteriefrie torskeegg

I forsøket i april 2008, ble torskeeggene hentet fra Troms Marin Yngel (Tromsø, Norge). Disse eggene ble ikke desinfisert før ankomst. I forsøket i november 2008, ble eggene hentet fra Marine Breed AS (Sunndalsøra, Norge). Disse eggene ble desinfisert med 400 mg L⁻¹ glutaraldehyd på Sintef Sealab en gang før ankomst.

Ved ankomst ble eggene vasket i to liter filtrert (0,22 µm Micropore filter), autoklavert sjøvann (FASV), og deretter overført til to liter friskt FASV. Dette vannet ble så tilsatt glutaraldehyd (400 mg L⁻¹, 25 % løsning), og eggene ble desinfisert i 10 minutter ved å røre eggene forsiktig rundt i desinfiseringsvannet (Salvesen et al. 1995; Salvesen et al. 1997). Eggene ble deretter skylt i to liter FASV tre ganger. Eggene ble så pipetert over til store petriskåler, som inneholdt FASV tilsatt 10ppm hver av ampicillin og rifampicin. All behandling av torskeeggene ble gjort i sterilbenk og med sterilt utstyr. Petriskålene med egg

ble satt til klekking i et temperaturregulert rom, med lyset av. Temperaturen i rommet var da 8°C fram til eggene var klekket, og ble deretter gradvis økt med ca. 1°C pr døgn, inntil temperaturen i rommet nådde 12°C. Eggene klekket da de var ca 90 døgngrader. Før overføring til dyrkningsflaskene ble larvene overført til store petriskåler med friskt FASV for å fjerne antibiotika (Salvesen et al. 1997).

2.3.2 Korttidsforsøk

I korttidsforsøkene ble det benyttet gjennomsiktige, sterile plastflasker med ventil for lufting (NUNC™). Flaskene inneholdt 50 mL FASV, og det ble overført 30 larver til hver flaske. Flaskene ble så tilsatt ulike typer bakterier. Flaskene ble oppbevart liggende, under samme temperatur og lysforhold som for startfôringsforsøket. Antall døde torskelarver ble talt opp hver dag.

Ved avslutning av korttidsforsøket, ble vannprøver fra alle flaskene platet ut på M65, for å finne antall bakterier (CFU mL⁻¹) i vannet. For oppbevaring av bakterieprøver fra vannet til senere analyser, ble 2 mL vann fra hver flaske sprøytet gjennom DynaGard®-filter (0,2 µm). Dette er filter som består av fiber dannet av en hydrofil blanding cellulose estere. Filtrene ble oppbevart ved -20°C.

Fiskelarvene ble så helt ut, og vasket raskt i friskt FASV, før de ble overført til FASV tilsatt dødelig dose Ethyl 3-Aminobenzoate (metomidat) (98%, Sigma-Aldrich®) (0,5 g L⁻¹). Larvene ble deretter vasket raskt to ganger i MilliQ-vann, før de ble overført til eppendorfrør med RNAlater Soln. (Ambion®). Rørene ble satt i til avkjøling på 4°C over natt, og deretter oppbevart ved -20°C.

2.3.2.1 Levende og døde probiotiske kandidater

I dette forsøket ble effekten på torskelarvene av eksponering for levende versus døde bakterier vurdert. Bakteriene ble tilsatt på dag 0. Forsøket omfattet fire forskjellige bakterier tilsatt en og en eller i blanding, samt en kontroll med bakteriefrie torskelarver. Hver behandling hadde tre paralleller. De probiotiske kandidatene som ble brukt var *Vibrio* RD5-30 (P1), *Roseobacter* RA4-1 (P2) og *Microbacterium* ND2-7 (P3). Forsøk 2 (Tabell 7), ble satt opp på samme måte, men da ble *Roseobacter* sp. byttet ut med en fjerde probiotisk kandidat, *Pseudoalteromonas* RA7-14 (P4). Dette på grunn av at veksten av *Roseobacter* sp. var for

høy i forsøk 1. Egenskaper til de ulike bakterielinjene er presentert i Tabell 2 (Fjellheim et al. 2006b).

Døde bakterier ble laget ved autoklaving (120°C, 20 minutter) av bakteriekulturene. Bakteriene ble tilsatt slik at den endelige bakteriekonsentrasjonen var på 10^6 CFU mL⁻¹ (Fjellheim et al. 2006a). I behandlingene med ulike sammensetninger av de probiotiske kandidatene, ble det tilsatt like mye av hver bakterielinje. I flaskene 28-33, ble det ved en feil tilsatt bakterier slik at den endelige bakteriekonsentrasjonen var på 10^9 CFU mL⁻¹. Flaske 1, 2 og 3 var bakteriefri kontroll.

Tabell 7 Ulike behandlinger i forsøk 2 med levende og døde probiotiske kandidater.

Behandling	Tilsats av levende bakterier (flaskenummer)	Tilsats av døde bakterier (flaskenummer)
<i>Vibrio</i> RD5-30 (P1)	4, 5, 6	7, 8, 9
<i>Microbacterium</i> ND2-7 (P3)	10, 11, 12	13, 14, 15
<i>Pseudoalteromonas</i> RA7-14 (P4)	16, 17, 18	19, 20, 21
<i>L. anguillarum</i>	22, 23, 24	25, 26, 27
Miks P1+P3+P4	28, 29, 30	31, 32, 33
Miks P1+P4	34, 35, 36	37, 38, 39
Miks P3+P4	40, 41, 42	43, 44, 45
Miks P1+P3	46, 47, 48	49, 50, 51

2.3.2.2 Quorum sensing nedbrytende kandidater

Torskelarvene ble fordelt på 8 ulike behandlinger (Tabell 8). Hvilke bakteriekulturer som ble tilsatt, ble bestemt ut fra luminiscencemålingene i anrikingsforsøket. Det ble valgt å bruke bakteriekulturene fra Mix 1 og Mix 2 fra anrikingen av AHL-degraderende bakterier fra torsk (kalt henholdsvis AHL 1 og AHL 2). Bakteriekulturen fra Mix 2, fra anrikingen av *L. anguillarum* autoinduser-degraderende bakterier fra torsk, ble også brukt i en behandling (kalt LAQ). Bakteriene ble tilsatt slik at den endelige bakteriekonsentrasjonen var 10^6 CFU mL⁻¹. I fire av behandlingene ble det tilsatt levende *L. anguillarum* til en tetthet på 10^6 CFU mL⁻¹, på dag 3 etter klekking.

Tabell 8 Ulike behandlinger i korttidsforsøk med potensielt quorum sensing hemmende kandidater.

Behandling	Uten <i>Listonella anguillarum</i> (flaskenummer)	Med <i>Listonella anguillarum</i> (flaskenummer)
Bakteriefri	1, 2, 3	22, 23, 24
AHL 1	4, 5, 6	7, 8, 9
AHL2	10, 11, 12	13, 14, 15
LAQ	16, 17, 18	19, 20, 21

2.3.3 Startfôringsforsøk

2.3.3.1 Eksperimentelt oppsett

Etter klekking ble larvene overført til flasker med FASV (2 L, 30 larver L⁻¹). Det ble benyttet 9 flasker (2 L, NALGENE®), fordelt på tre ulike behandlinger, med tre paralleller for hver behandling (Tabell 9). Alle flaskene hadde et luftesystem (0,2 µm, Millex), og mulighet for uttapping av vann (Figur 10). Luftingen ble holdt konstant gjennom hele forsøket.



Figur 10 Oppsett av flasker med luftesystem og mulighet for uttapping av vann.

Tabell 9 Ulike behandlinger i startfôringsforsøk

Behandling	Flaskenummer
Bakteriefri kontroll	1, 2, 3
Levende <i>Microbacterium</i> ND2-7	4, 5, 6
Død <i>Microbacterium</i> ND2-7	7, 8, 9

For flaske 4-9 ble det tilsatt henholdsvis levende og døde bakterier slik at den endelige bakteriekonsentrasjonen var på 10^6 CFU mL⁻¹. I flaske 7-9 ble det på dag 9 igjen tilsatt døde bakterier, slik at celletettheten var på omtrent 10^6 CFU mL⁻¹.

2.3.3.2 Fôring og røkting

På dag tre etter klekking, ble lyset i rommet slått på, og fôring av torskelarvene ble igangsatt. Rotatorien *Brachionus "Nevada"* ble brukt som levende fôr. Antall torskelarver ble anslått ved telling og røkting av døde larver, og den daglige fôrmengden ble beregnet ut fra Tabell 10. Røktingen ble foretatt omtrent annenhver dag for å fjerne døde torskelarver og algerester. Det ble gjort ved å bruke en automatpipette til å suge opp avfall fra bunnen av flaskene. Noe av vannet som ble tatt ut ved røktingen ble brukt til bakterieskjekk. Dette ble gjort ved å overføre vann fra pipetta til Marine Broth, Marine Agar, flytende M65 og M65-agarplater. Rør og plater ble satt til inkubering ved romtemperatur, henholdsvis med og uten risting.

Tabell 10 Skjema for daglig fôring av torskelarver under startfôringsforsøk (Olsen, Y., pers. med.).

Dag etter klekking	Biomasse $\mu\text{g C larve}^{-1}$	Vektøkning per dag $\mu\text{g C larve}^{-1} \text{ dag}^{-1}$	Fôrbehov $\mu\text{g C larve}^{-1} \text{ dag}^{-1}$	Fôrbehov rotatorier per larve
	52,4			
1	53,0			
2	53,8			
3	54,7	0,92	4,58	25
4	55,8	1,13	5,67	31
5	57,2	1,40	7,00	39
6	59,0	1,73	8,65	48
7	61,1	2,14	10,69	59
8	63,7	2,64	13,2	73
9	67,0	3,26	16,3	91
10	71,0	4,03	20,2	112
11	76,0	4,98	24,9	138
12	82,2	6,15	30,7	171
13	89,7	7,60	38,0	211
14	99,1	9,40	46,8	260
15	110,7	11,6	57,8	321
16	124,9	14,3	71,3	396
17				

For å unngå overfôring av torskelarvene, ble overskuddet av rotatorier i flaskene beregnet. Dette ble gjort ved å telle rotatorier i en vannprøve på omtrent 10-15 mL. Tilsatt fôrmengde ble justert ut fra dette antallet.

2.3.3.3 Avslutning av forsøket

Ved avslutning av startfôringsforsøket, ble vannprøver fra alle flaskene platet ut på M65, for å finne antall bakterier (CFU mL⁻¹) i vannet. Platene ble inkubert ved romtemperatur. For oppbevaring av bakterieprøver fra vannet for senere bruk, ble 5 mL vann fra hver flaske sprøytet gjennom DynaGard®-filter (0,2 μm) ved hjelp av engangssprøyter. Filtrene ble oppbevart ved -20°C. Det ble også tatt ut 50 mL vannprøver, for måling av total ammonia i vannet.

Fiskelarvene ble helt ut, og vasket raskt i friskt FASV, før de ble overført til FASV tilsatt metomidat (0,5 g L⁻¹). Larvene ble deretter vasket forsiktig i MilliQ-vann to ganger, før de ble tatt bilde av over milimeterpapir, for beregning av larvenes lengde. De ble så overført til

eppendorfrør med RNAlater Soln. (Ambion®). Rørene ble så satt i til avkjøling på 4°C over natt, og deretter oppbevart ved -20°C.

2.4 Analytiske metoder

2.4.1 Måling av total ammonia

Før måling av total ammonia, ble saltet i vannprøvene fjernet ved hjelp av Dr.Lange kit: LCW 925. Denne metoden fjerner klorid (opp til 20 g L⁻¹) ved bruk av sølvoksid. Klorid felles ut som sølvklorid som fjernes. Dette gjøres på følgende måte med sprøyter inneholdende sølvoksid:

1. 4 mL vannprøve ble trykket opp i sprøyta.
2. Sprøyta ble holdt opp-ned og 0,5 mL luft ble trukket inn.
3. Sprøyta med prøven ble deretter ristet opp og ned i 1 minutt, og prøven ble deretter sprøytet ut i et oppbevaringsbeger.

Total ammonia i prøvene ble deretter målt ved hjelp av et Dr.Lange kyvette kit: LCK 304. Prinsippet bak denne metoden er at ammonium ioner reagerer med hypokloritt- og salicylsyreioner og danner indofenolblått ved pH 12,6 dersom natrium nitroprusside er til stede som en katalysator. Denne metoden kan brukes til å måle ammonia i for eksempel overflatevann, avløpsvann, drikkevann og badevann. Mengde ammonia i prøvene bestemmes så spektrofotometrisk. 5 mL prøve pipetteres i Dr.Lange-kyvetta og denne ristes kraftig 2-3 ganger. Maksimum absorbans i prøvene nås etter 15 minutter inkubering, og forblir så konstant i ytterligere 15 minutter. pH i prøvene bør være mellom 4-9 og temperaturen bør ligge på 20°C.

2.4.2 Primersekvenser for genuttrykk hos torsk

Primersekvenser er korte, syntetiske oligonukleotider, som vanligvis er mellom 17 og 30 basepar lange med et GC innhold på ca 50 %. Sekvensene brukes blant annet i PCR. I hver PCR brukes to ulike primere, ett såkalt primerpar, som flankerer det ønskede DNA-fragmentet som skal amplifiseres. De to primerene er komplementære til hver sin DNA-tråd,

og bindes ved DNA-hybridisering. Primerene blir da startpunkt for DNA-syntesen (Reece 2004).

For at primere skal fungere godt, er det mange kriterier som må oppfylles. Primerene må være selektivt komplementære til området som skal amplifiseres, slik at ikke andre, uønskede produkter blir dannet. To primere som brukes i samme reaksjon bør ikke kunne hybridisere med hverandre slik at det dannes primerdimere, men ha nærliggende smeltepunkt. Primerene bør heller ikke kunne danne stabile sekundærstrukturer (Reece 2004).

Ut fra resultatene fra Rawls et al. (2004) og svært like tilgjengelige sekvenser fra torsk i GenBank, ble qPCR primere designet for å amplifisere gener som koder for complement component C3 (*C3*), fasting induced adipose factor (*Fiaf*), farnesyl diphosphate synthetase (*Fdps*), integrin β -1-binding protein 3 (*Itgb1bp3*), Cyp1a1 (*Cyp1a1*), glutathione peroxidase (*Gpx2*) og tryptophanyl t-RNA synthetase (*WARS*). Serum ameloid A1 er en av genene som reguleres av bakterier i zebrafisk, men siden tilsvarende sekvens ikke er tilgjengelig for torsk, ble primere for serum lectin (*CLECT*) designet i stedet. De ulike genene og deres funksjoner er gitt i Tabell 11 (Rawls et al. 2004). For å finne passende primere for disse genene, ble programmet Primerexpress brukt. Alle de potensielle primersekvensene ble deretter kjørt gjennom programmet BLAST, for å sjekke at de ikke var komplementære mot andre sekvenser i GenBank. Primerenes ulike målgen og det amplifiserte fragmentets lengde er presentert i Tabell 12, og sekvensene til primerene som ble designet i denne oppgaven er presentert i Tabell 13.

Tabell 11 Åtte utvalgte gener og deres funksjoner og Accession number fra GenBank.

Gen	Funksjon	Accession number
<i>C3</i>	Koder for Complement component 3. Proteinet spiller en sentral rolle i komplement systemet, som er en del av det ikke-spesifikke immunsystemet.	AY739672
<i>CLECT</i>	Koder for serum lectin. Generelt er lektiner reseptorer for karbohydrater, og mange er involverte i immunresponser.	EB67705
<i>Cyp1a1</i>	Koder for et protein i cytochrom P450 superfamilien. Proteinet er involvert i den xenobiotisk metabolismen.	DQ270488
<i>Fdps</i>	Koder for farnesyl-diphosphate synthetase; et nøkkelenzym i et biosyntesepor som danner C ₁₅ precursorer for ulike steroler, dolicholer og ubiquinoner. Enzymet er involvert i fiskens næringsmetabolisme.	EB677097
<i>Fiaf</i>	Koder for fasting induced adipose factor; et sekretert protein som inhiberer lipoprotein lipase. Proteinet er involvert i fiskens næringsmetabolisme.	CO542358
<i>Gpx2</i>	Koder for Glutathione peroxidase. Proteinet beskytter organismen mot oksidativ ødeleggelse.	EB677081
<i>Itgb1bp3</i>	Koder for Integrin beta 1 binding protein 3.	CO542430
<i>WARS</i>	Koder for Tryptophanyl-tRNA syntetase som katalyserer aminoacetyleringen av tRNA _{trp} med tryptofan. Dette er en essensiell funksjon i en celled proteinsyntese.	CO542316

Tabell 12 Primerenes målgen og fragmentets lengde

Primerpar	Målgen	Fragmentets lengde
p25 F/R	<i>CLECT</i>	78 bp
p26 F/R	<i>WARS</i>	71 bp
p27 F/R	<i>C3</i>	76 bp
p28 F/R	<i>Cyp1a1</i>	70 bp
p29 F/R	<i>Fdps</i>	67 bp
p30 F/R	<i>Fiaf</i>	65 bp
p31 F/R	<i>Gpx2</i>	69 bp
p33 F/R	<i>Itgb1bp3</i>	68 bp

Tabell 13 Tabellen viser sekvensen til primere designet til bruk i denne oppgaven, samt deres smeltepunkt.

Primer	Sekvens	Smeltepunkt (°C)
p25 F	CGTCCAAAGATTGGCAGTTGA	67,2
p25 R	ATGGCACCGACTGCTACAAAT	65,5
p26 F	TCGTCACAGGCCATGCAT	66,8
p26 R	TCGAACACATCCTGTAGCCATT	65,5
p27 F	GTGGGAAACTACGCACCTTCA	66,1
p27 R	AGATAGCTCGCATTGTGTTTCAGA	64,8
p28 F	CCAACGCCACCATGAAGAG	66,7
p28 R	GTGACGATCTTCTGCACAAAGG	65,9
p29 F	CGGCTGCAGGAGCTCATT	66,8
p29 R	TGGCAAATTGAGGAACACTGA	66,5
p30 F	ACCTCAGTGCGGACGTCAA	67,1
p30 R	TCCGCAACTGCTGAACCA	67
p31 F	ATGACCCCAATTCCTCATG	65,8
p31 R	AGATGTCGTTCCGGCAGACT	66,1
p33 F	GATCACTGCGTCCACGAACTT	66,5
p33 R	GGATCGTGAAAGGACCGAAA	66,1

Primere benyttet under amplifisering av housekeeping genet *β-actin* er vist i Tabell 14.

Tabell 14 Primere brukt for amplifisering av *β-actin* (Eurofins MWG Synthesis GmbH)

Primer	Sekvens	Smeltepunkt (°C)
B-actin F	TACAGCTTCACCACCACAGC	59,4
B-actin R	ATGCCACAAGACTCCATTCC	57,3

2.4.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR brukes til å amplifisere ett bestemt DNA-fragment i en populasjon av andre DNA-molekyler. Dette gjøres *in vitro* gjennom en serie med reaksjoner, som repeteres til ønsket mengde av fragmentet er oppnådd. PCR-reaksjon gjennomføres ved å tilsette deoksyribonukleotidtrifosfater (dNTP), to oligonukleotid-primere og en varmestabil DNA polymerase til en løsning som inneholder buffere og DNA templat.

En PCR syklus består av tre ulike trinn (Berg et al. 2002; Reece 2004; Klug et al. 2006):

1. Denaturering: Dobbeltrådig DNA denatureres ved å varme prøven opp til ca 94°C og det dannes da enkelttrådig DNA-molekyler.
2. Hybridisering: Løsningen avkjøles så hurtig til ca 50-60°C, slik at primerene kan hybridiseres til hver sin DNA-tråd. Primerene er enkelttrådig DNA-molekyler, som er syntetisert ut fra sekvensen til DNA-templatet slik at en primer er komplementær til 3' enden,

og den andre til 5' enden av fragmentet. Når primerene tilsettes en prøve med enkelttrådig DNA, vil primerene hybridisere med komplementære nukleotider som flankerer fragmentet som skal amplifiseres.

3. Forlenging av primere: Løsningen blir så varmet opp igjen til 72°C, og DNA polymerasen starter syntesen av dobbeltrådig DNA ved forlenging av primerene i 5' til 3' retning på begge enkelttrådig DNA-molekyler. DNA polymerasen som er mest brukt er *Taq* DNA polymerase, som er isolert fra den termofile bakterien *Thermus aquaticus*. Denne har en optimumstemperatur på 72°C, og DNA syntesen skjer derfor ved denne temperaturen. Grunnen til at det brukes en varmemestabil DNA polymerase, er at PCR løsningen varmes og avkjøles mange ganger, og andre DNA polymeraser vil ødelegges ved høye temperaturer.

Disse tre trinnene utgjør en syklus i PCR amplifisering av det ønskede DNA-fragmentet. Antall sykluser etter hverandre bestemmer hvor mye av DNA-fragmentet en sitter igjen med til slutt. Amplifiseringen skjer eksponentielt, og en vil da, etter n sykluser, ha amplifisert DNA-fragmentet 2^n ganger (Berg et al. 2002; Reece 2004; Klug et al. 2006).

PCR-produkter ble rensed ved bruk av QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Det ble brukt mikrosentrifuge under rensingen, og all sentrifugering ble utført ved 13000 rpm. Først ble 5 deler buffer PBI blandet med én del PCR-prøve. Deretter ble PCR-produktet rensed som beskrevet av forhandleren. DNA ble eluert ved tilførsel av 30 µl elueringsbuffer direkte til membranen i kolonna, inkubering ved romtemperatur i ett minutt, og sentrifugering i ett minutt. Det rensede PCR-produktet ble oppbevart ved -20°C.

2.4.4 Isolering av RNA og syntese av cDNA

Det ble isolert RNA fra torskelarver både fra startfôringsforsøket og korttidsforsøket med levende og døde probiotiske kandidater. Dette for å se nærmere på torskelarvenes genuttrykk etter ulike behandlinger. Fra startfôringsforsøket ble det isolert to paralleller for hver behandling, mens det fra korttidsforsøket ble isolert tre paralleller fra hver behandling.

RNA ble isolert ved bruk av en metode som baserer seg på kolonner med silikamembraner; E.Z.N.A.® Total RNA Isolation Protocol. Disse membranene binder RAN, mens cellebestanddelene og andre kontamineringer vaskes gjennom kolonna ved sentrifugering. Alle buffere og løsninger som ble brukt under isoleringen var laget av produsenten. DEPC-behandlet vann (Vedlegg 2) ble benyttet for å beskytte prøvene mot RNaser.

- 1) Før homogenisering av torskelarvene, ble rotor-stator først vasket med 70% etanol i DEPC-vann, og deretter i rent DEPC-vann. Etter homogenisering ble den rengjort først i DEPC-vann, deretter i 70% etanol i DEPC-vann.
- 2) 10 fiskelarver fra hver prøve ble homogenisert i 350 μL TRK Lysis Buffer tilsatt 2-mercaptoetanol (20 $\mu\text{L mL}^{-1}$ TRK Lysis Buffer), ved bruk av rotor-stator. Samme volum (350 μL) etanol (70% i DEPC-vann), ble deretter tilsatt, og prøven ble blandet ved vortexing.
- 3) Lysatet ble så overført til HiBind®RNA kolonne ved hjelp av pipette. Kolonna ble plassert i et oppsamlingsrør, og sentrifugert ved $10000 \times g$ i 15 sekunder, ved romtemperatur. Oppsamlingsrøret ble tømt og kastet etter bruk.
- 4) Kolonna ble så overført til et nytt oppsamlingsrør, tilsatt 300 μL RNA Wash Buffer I, og sentrifugert ved $10000 \times g$ i 15 sekunder, ved romtemperatur. Oppsamlingsrøret ble tømt og kastet.
- 5) For hver kolonne ble det laget 75 μL DNase I digestion mix, som bestod av OBI DNase I Digestion Buffer (73,5 μL), og RNase-fri DNase I (20 Kunitz units μL^{-1}) (1,5 μL). Mixen ble pipettert direkte på membranen i kolonna, som ble satt til inkubering ved romtemperatur (20-30°C) i 15 minutter.
- 6) Etter inkubering ble kolonna overført til et nytt oppsamlingsrør, tilsatt 500 μL RNA Wash Buffer I, og satt til inkubering ved romtemperatur i 5 minutter. Kolonna ble deretter sentrifugert ved $10000 \times g$ i 15 sekunder, ved romtemperatur. Oppsamlingsrøret ble tømt, og brukt på nytt.
- 7) Kolonna ble tilsatt 500 μL RNA Wash Buffer II og sentrifugert ved $10000 \times g$ i 15 sekunder. Dette ble gjort to ganger. Oppsamlingsrøret ble tømt og brukt på nytt. For å tørke kolonnemembranen helt, ble kolonna sentrifugert på full hastighet i ett minutt.
- 8) For å eluere RNA fra kolonna, ble den overført til et rent eppendorfrør, og 50 μL DEPC-vann som var varmet opp til 70°C, ble pipettert direkte på membranen i

kolonna. Kolonna ble inkubert ved romtemperatur i 5 minutter for å øke utbyttet av RNA, og deretter sentrifugert på full hastighet i ett minutt.

- 9) RNAkonsentrasjonen ble målt ved NanoDrop™, og RNA eluatet ble oppbevart ved -20°C.

For å undersøke kvaliteten på RNA som ble isolert, ble det kjørt agarosegelelektroforese. Hvis det er bra kvalitet på det isolerte RNA'et, vil sterke bånd kunne sees på gelen. Dersom det har blitt degradert vil båndene være utflytende nedover gelen. Oppskrift på gel er presentert i Tabell 15.

Tabell 15 Oppskrift agarosegel, for undersøkelse av isolert RNA.

Innhold	Mengde
Agarose	0,5 g
1 × MOPS	47,3 mL (Tabell V2.7)
Formaldehyd (37%)	2,7 mL

Før påsetting på gel, ble 5 µL RNA tilsatt 10 µL loading buffer (Tabell V2.8). Dette ble satt til denaturering ved 65°C i 10 minutter. Prøvene ble deretter satt på is i ett minutt, og tilsatt 1 µL etidiumbromid (1 mg mL⁻¹). Gelen ble kjørt på 4 V/cm (60-70 V) i cirka to timer. Running buffer var 1 × MOPS buffer (Tabell V2.7).

Før kjøring av Real-time PCR, ble isolert RNA omdannet til cDNA ved hjelp av revers transcriptase.

Ved syntese av cDNA ble det brukt et iScript cRNA Synthesis kit. Alle forbindelser som ble brukt under cDNA syntesen, var laget av produsenten. Den ferdige reaksjonsmiksen som ble benyttet bestod av følgende:

Reaction mix	4 µL
Reverse transcriptase	1 µL
Nuclease free water	X µL
RNA template	X µL

Mengde RNA templat i hver reaksjon var 1 µg, omregnet til µL isolert RNA. Mengde vann ble tilpasset slik at totalt volum ble 20 µL. cDNA ble lagret ved -20 °C.

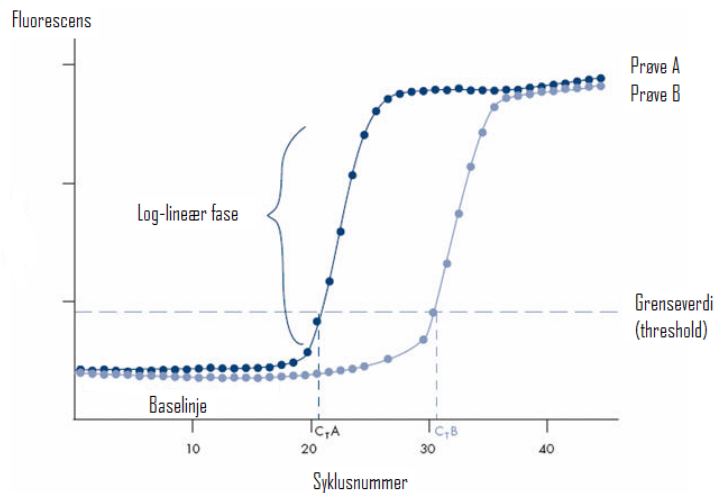
Programmet som ble brukt under cDNA syntesen er presentert i Tabell 16.

Tabell 16 Program brukt ved syntese av cDNA

Temperatur (°C)	Tid	Syklus
25	5 min	1
42	30 min	1
85	5 min	1
4	Hold	

2.4.5 Kvantifisering av genuttrykk med kvantitativ real time PCR (qPCR)

Kvantitativ PCR (qPCR) er av Ginzinger (2002) definert som en pålitelig detektering og måling av produkter som genereres i hver enkelt syklus i PCR-prosessen. Mengde PCR produkt er proporsjonal med den mengden templat en har før PCR-prosessen starter. Denne beregningen er mulig på grunn av at mengde PCR-produkt måles i den eksponentielle fasen av PCR prosessen. For å kunne gjøre dette, brukes ulike metoder, som for eksempel SYBR Green I TM, som er en forbindelse som bindes til ”minor groove” i dobbeltrådig DNA. Forbindelsen eksiteres ved hjelp av blått lys med en bølgelengde på 480 nm, og emitterer grønt lys med en bølgelengde på maksimum 520 nm (Wilhelm et al. 2003). DNA-SYBR Green komplekset fluoriserer 1000 ganger mer enn ikke-bundet SYBR Green. I PCR-prosessen vil mengde fluorescens i prøven detekteres for hver syklus, og økningen i fluorescens kan slik følges ”real-time”, det vil si mens det skjer. Fluorescensen blir så plottet mot antall sykluser i prosessen, og en får et såkalt amplifiseringsplott (Figur 11).



Figur 11 Figuren viser et generelt amplifiseringsplott for qPCR med baselinje, grenseverdi og C_T -verdier (modifisert fra QIAGEN 2003-2009).

Ut fra dette plottet blir en terskelverdi (threshold) bestemt automatisk, og syklusen hvor fluorescensen går over dette nivået kalles C_T -verdien (threshold cycle) til prøven. Prøver som inneholder lite initielt cDNA-templat, vil trenge flere sykluser på å komme over terskelverdien enn prøver som inneholder mye DNA-templat. Det vil si at jo lavere C_T -verdi en prøve har, jo mer DNA-templat er det i prøven. På grunn av at mengde DNA fordobles for hver syklus i den eksponentielle fasen i PCR-prosessen, vil en prøve som krysser grenseverdien 3 sykluser tidligere enn en annen prøve, ha 2^3 ganger mer DNA-templat i prøven.

qPCR har mange bruksområder, blant annet absolutt og relativ kvantifisering av DNA- og RNA-molekyler, og kvantifisering av genuttrykk eller kopitall (Wilhelm et al. 2003). Absolutt kvantifisering, også kalt standardkurve-kvantifisering (Ginzinger 2002), bestemmer antall kopier RNA- eller DNA-fragmenter (total mengde RNA eller DNA) i prøven ved hjelp av en standardkurve, mens relativ kvantifisering beskriver den relative endringen i genuttrykk i forhold til en referanse. Referansen kan være en ubehandlet prøve, en prøve tatt ved tid "null" i undersøkelser som dreier seg om genuttrykk som endres med tiden (Livak et al. 2001), eller såkalte housekeeping gen. Dette er gener som er involvert i grunnleggende funksjoner som trengs i alle celler i en organisme, og som alltid er uttrykt i cellene.

I dette forsøket ble det foretatt både absolutt og relativ kvantifisering. For den absolutte kvantifiseringen ble det laget en standardkurve med kjente konsentrasjoner av plasmid plottet

mot de tilhørende C_T verdiene. Antall kopier av plasmidet brukt i standardkurva ble beregnet ut fra DNA-konsentrasjoner målt ved NanoDrop™. Ved å sette de ukjente prøvenes C_T verdier inn for X i standardkurvas regresjonsligning, ble antallet kopier av DNA-templatet i de ulike prøvene bestemt. Omregning fra nanogram DNA til antall kopier ble gjort på følgende måte:

$$M_n = (\text{antall nukleotider} \times 607,4) + 157,9 \text{ (Ambion 2009)}$$

$$\text{Mol} = \text{gram} / M_n$$

$$\text{Antall kopier} = \text{Mol} \times N_A$$

Hvor:

M_n = Molvekt til plasmid med insert

N_A = Avogradros tall = $6,0221415 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$

Ved relativ kvantifisering ble β -actin brukt som referansegene (Sæle et al. 2009). Det ble kjørt qPCR på β -actin på samme måte som de andre genene, og antall kopier av genet ble beregnet. Disse resultatene ble så brukt for normalisering av uttrykket i de andre genene, ved følgende utregninger.

Trinn 1: Beregning av gjennomsnitt, standardavvik (SD) og standarderror (SE) for prøveresultatene

Trinn 2: Beregning av normaliserte verdier (N) og standarderror til normaliserte verdier (SE_N)

$$N = A_x / A_{HK}$$

Hvor:

A_x = gjennomsnittlig antall kopier av prøve

A_{HK} = gjennomsnittlig antall kopier av housekeeping gen

$$SE_N = N \times \sqrt{(SE_x / A_x)^2 + (SE_{HK} / A_{HK})^2}$$

Hvor:

SE_x = Standarderror til det aktuelle genet

SE_{HK} = Standarderror til housekeeping gen

Trinn 3: Beregning av forholdstall (fold change) mellom normaliserte prøveverdier og normalisert kontrollverdi.

$$\text{Forholdstall} = N_x / N_k$$

Hvor:

N_x = Normalisert verdi for aktuell prøve

N_k = Normalisert verdi for kontroll

I denne oppgaven ble den bakteriefrie behandlingen brukt som kontroll, og forholdstall mellom denne og de andre behandlingene ble beregnet. Et forholdstall høyere enn 2, tilsier at endringen i genuttrykk er signifikant. Dersom den beregnede verdien er lavere enn 1 (nedregulering) må følgende gjøres;

$$1 / \text{Forholdstall} < 1 = \text{Faktisk forholdstall}$$

2.4.5.1 Testing av amplifiseringseffektivitet

I dette forsøket var det ikke kjent hvor stort uttrykket til de ulike genene kunne være, og på grunn av dette var det viktig å benytte primere som kunne detektere cDNA-konsentrasjoner over et vidt spenn. Kvaliteten av de 10 ulike primerparene ble testet ved absolutt kvantifisering. For hvert primerpar ble det laget en standardkurve ut fra fortynningsrekker med kjente konsentrasjoner av plasmid. Innklonet i plasmidene var DNA-sekvensen til primerparets målsekvens. C_T -verdiene ble så plottet mot logaritmen til fortynningsfaktoren. Ved hjelp av dette og stigningstallet til standardkurva, ble så amplifiseringseffektiviteten, E , til det testede primerparet beregnet ved hjelp av følgende formel:

$$E = 10^{(1/\text{stigningstall})} - 1$$

Effektiviteten kan ligge mellom 0 og 1, hvor 1 er det beste og tilsvarer en effektivitet på 100%. Stigningstallet vil da være på -3,33. R^2 verdien til regresjonsligninga til standardkurva,

bør ligge så nært opp mot 1 som mulig. I tillegg til primerenes effektivitet, er det svært viktig at et primerpar kun amplifiserer ett produkt. Dette kan sees ut fra dissosiasjonskurva for PCR-produktet.

2.4.5.2 Kvantitativ analyse av genuttrykk i torskelarver

Hos torskelarver fra startfôringsforsøket, ble uttrykket av 8 ulike gener (Tabell 11) undersøkt ved hjelp av qPCR. Det ble kjørt qPCR på to ulike RNA-prøver fra hver behandling, med tre tekniske replikater for hver prøve. Hos torskelarver fra korttidsforsøket med levende og døde probiotiske kandidater, ble uttrykket av ett gen undersøkt, ved hjelp av primerparet p28 F/R. Det ble her brukt 3 ulike RNA-prøver fra hver behandling, med tre tekniske replikater for hver prøve. Det ble også kjørt en standard for hver primer, som bestod av en fortynningsrekke av tilsvarende plasmid. Før tillaging av prøver til qPCR ble cDNA fortynnet 1:6.

Reaksjonsmiksen for prøvene med ukjent konsentrasjon var som følger:

- 12,5 µL SYBR ® Green I
- 0,5 µL fwd primer (10pmol µL⁻¹)
- 0,5 µL rev primer (10pmol µL⁻¹)
- 6,5 µL MilliQ vann (autoklavert)
- 5 µL cDNA (fortynnet)

I reaksjonsmiksen for standardprøvene ble det benyttet ufortynnet cDNA, og det ble derfor tilsatt 1 µL cDNA og 10,5 µL MilliQ vann (autoklavert). Programmet som ble brukt under qPCR prosessen er satt opp i Tabell 17.

Tabell 17 Program brukt under kjøring av qPCR

Temperatur (°C)	Tid	Antall sykluser
95	3 min	1
95	30 sek	}
60	30 sek	
72	20 sek	}40
95	1 min	
70	30 sek	1
95	30 sek	1

qPCR-produkter ble verifisert på agarosegel (2%). Gelen ble kjørt på 70 V i omtrent 2 timer. Før påsetting på gel, ble 5 μL cDNA tilsatt 1 μL 5 \times Loading Dye (GelPilot, Fermentas). Det ble brukt en 100 bp DNA Ladder (GeneRuler, 1 μg μL^{-1} , Fermentas) (Vedlegg 3). Running buffer var 1 \times TAE buffer (Tabell V2.9).

2.5 Bioinformatiske metoder

2.5.1 BLAST

Forkortelsen BLAST står for Basic Local Alignment Search Tool (Altschul et al. 1990; BLAST 2009). Dette er et verktøy som brukes for å sammenligne nukleotid- eller aminosyresekvenser med sekvenser som ligger i ulike databaser som GenBank, EBI (European Bioinformatics Institute) og DDBJ (DNA Data Bank of Japan). Dersom to sekvenser er homologe vil de ha korte sekvenser som er identiske eller tilnærmet like, og det er dette BLAST er basert på. Dersom en søker på en ukjent sekvens vil BLAST programmet prøve å finne den beste "local alignment" (sammenstilling) mellom den ukjente sekvensen og sekvenser i databasen, det vil si den med høyest likhetsscore og færrest mulig mellomrom (gaps). Dette gjøres ved at programmet lager en rekke korte sekvenser ("nabosekvenser") av en viss lengde (3 for proteiner og ca 12 for DNA) som har en likhetsscore til den ukjente sekvensen som ligger over en viss satt verdi. BLAST skanner så databasen for sekvenser som får en likhetsscore høyere enn et visst nivå når sekvensene settes sammen med deler av den ukjente sekvensen. Sammenstillingen utvides så i begge retninger til likhetsscoren faller under en viss verdi.

I denne oppgaven ble det brukt BLASTN, et program som sammenligner en proteinsekvens med nukleotidsekvenser i databasen. Dette brukes ofte til å finne homologe proteinkodende regioner i nukleotidsekvenser som for eksempel expressed sequence tags (EST) (NCBI 2009a).

3 RESULTATER

3.1 Forsøk med levende og døde probiotiske kandidater

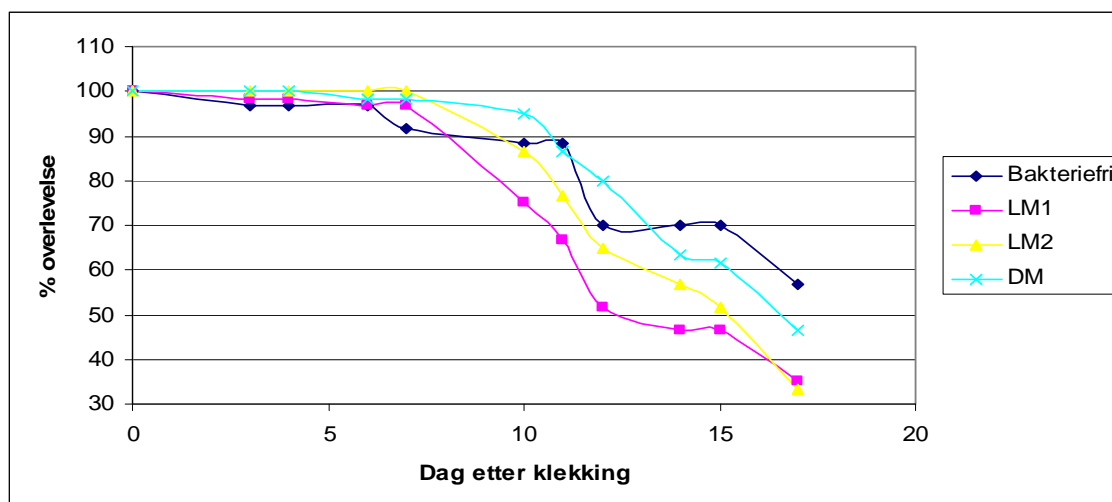
3.1.1 Startfôringsforsøk

I startfôringsforsøket ble det undersøkt om tilsats av levende og død *Microbacterium* sp. ND2-7, hadde innvirkning på torskelarvenes overlevelse og vekst. Det var i utgangspunktet 3 ulike behandlinger, med 3 paralleller på hver (Tabell 19), men på grunn av fôrmangel og kontamineringer, ble det endelige forsøksoppsettet som følger:

Tabell 19 Forsøksoppsett for 17 dagers startfôringsforsøk for torskelarver med behandlinger med levende og død probiotisk kandidat og bakteriefri kontroll.

Flaske	Behandling	Forkortelse
Flaske fra Torunn Forberg	Bakteriefri kontroll	Bakteriefri
Flaske 4	Levende <i>Microbacterium</i> 1	LM1
Flaske 5	Levende <i>Microbacterium</i> 2	LM2
Flaske 8	Død <i>Microbacterium</i>	DM

Torskelarvenes overlevelse ble observert ved telling av døde torskelarver gjennom forsøket (Figur 14).



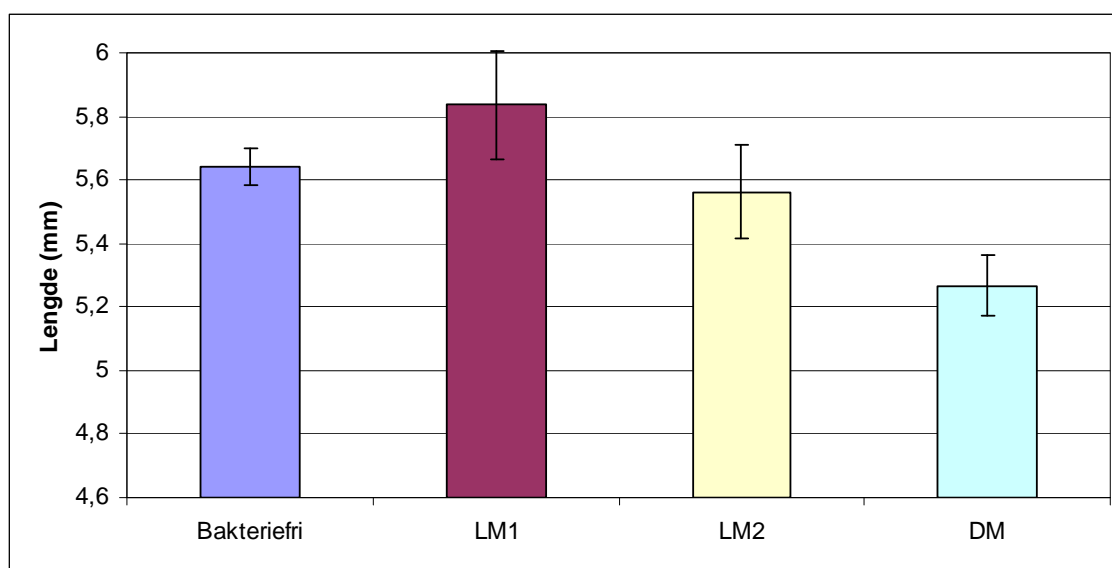
Figur 14 Utvikling av torskelarvenes prosentvise overlevelse gjennom startfôringsforsøket fra dag 0 til dag 17 etter klekking.

For å sammenligne overlevelsen fra de ulike behandlingene, ble det utført chi-kvadrat test ($\alpha=0,05$, d.f.=1), på tellingene fra dag 10 og dag 17 etter klekking. Dag 10 ble valgt på grunn av at torskelarvene da går over til kun exogen fôring (Kjørsvik et al. 2004), og en har tidligere på dette tidspunktet sett stor økning i torskelarvenes dødlighet.

På dag 10 etter klekking var det signifikant forskjell i overlevelsen kun mellom behandlingene LM1 og DM ($P= 0,002$). På dette tidspunktet var det høyere overlevelse i behandlingen tilsatt døde bakterier, enn i behandlingen tilsatt levende bakterier.

På dag 17 etter klekking er det signifikante forskjeller mellom den akseniske behandlingen og behandlingene LM1 og LM2 (henholdsvis $P= 0,017$ og $P= 0,010$). I begge tilfeller var det høyere overlevelse i den akseniske behandlingen, enn i behandlingene tilsatt levende bakterier.

For å undersøke om de ulike behandlingene hadde noen innvirkning på torskelarvenes vekst, ble lengden til hver larve målt ved forsøkets slutt (Figur 15). Det var kun signifikant forskjell mellom lengden på torskelarvene i LM1-behandlingen og DM-behandlingen ($P=0,005$) (Tukey's Honestly-Significant-Difference Test). Det var dårligst vekst hos torskelarvene fra behandlingen med døde bakterier (DM).



Figur 15 Torskelarvenes gjennomsnittlige lengde (i millimeter) ved startfôringsforsøkets slutt. Hver søyle representerer en behandling, og error bars er standarderror.

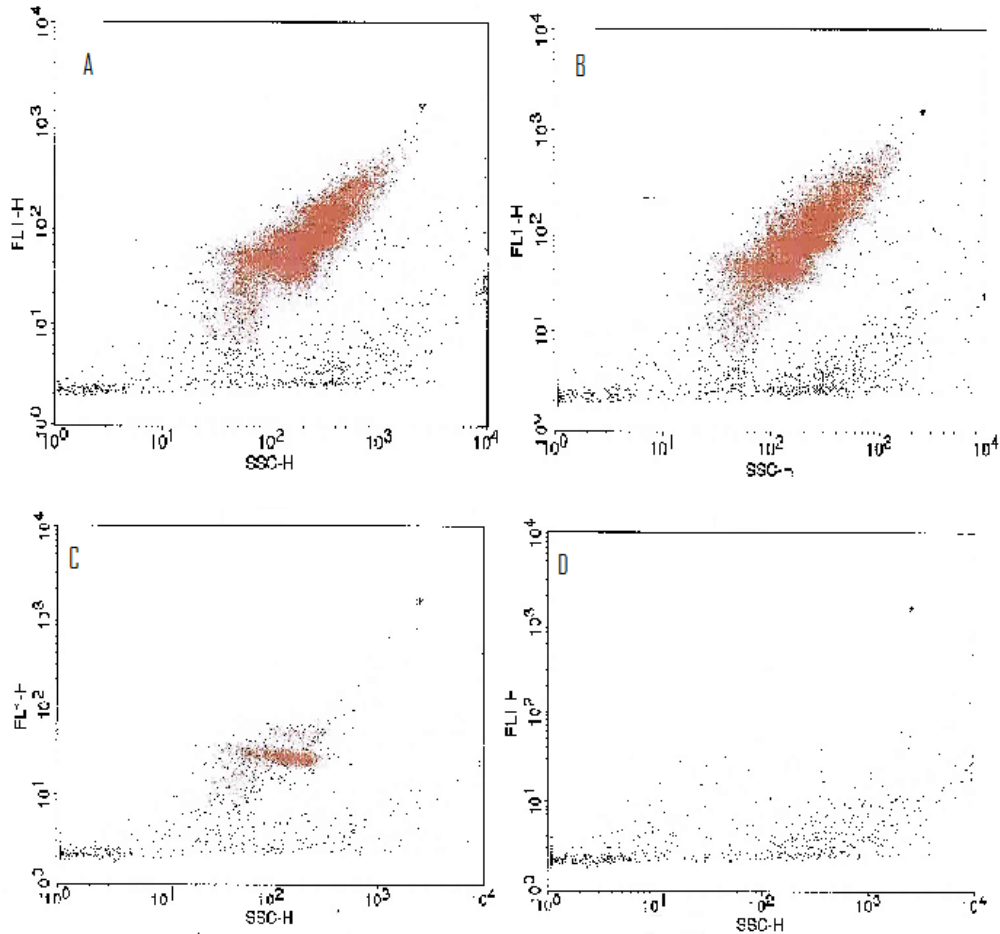
3.1.1.1 Kvantifisering av bakterier

Utplating av vannprøver på Marine Agar og M65 ved avslutning av forsøket, viste kontaminering i de bakteriefrie behandlingene og i en av behandlingene med død *Microbacterium*. Ved utplating av vannprøver fra de to behandlingene med levende *Microbacterium* (LM1 og LM2) ble det kun funnet en type bakteriekolonier, og det ble antatt at dette var *Microbacterium*. Platene med 10^{-4} fortynning ble undersøkt, og det ble talt 124 (LM1) og 119 (LM2) kolonier på platene. Dette tilsvarer en CFU mL⁻¹ på henholdsvis $1,24 \times 10^6$ og $1,19 \times 10^6$

På dag 6 og 10 etter klekking og ved avslutning av forsøket ble det foretatt målinger av de ulike behandlingenes bakterieinnhold ved hjelp av flow cytometri (Tabell 20 og Figur 16). Figur 16 viser tellinger gjort av de ulike behandlingene ved avslutning av forsøket. Det var en klar forskjell i antall celler mellom den bakteriefrie behandlingen og behandlingene med levende *Microbacterium* sp. De to parallelle behandlingene derimot, viste relativt lik utvikling og like resultater. Behandlingen med døde *Microbacterium* sp. lå mellom den bakteriefrie behandlingen og behandlingene med levende *Microbacterium* sp. med hensyn til antall celler.

Tabell 20 Resultater etter flow cytometri på dag 6 og 10 og ved avslutning av forsøket. Resultatene er oppgitt som celler/mL. (LM: levende *Microbacterium* sp.; DM: død *Microbacterium* sp.)

Behandling	Dag 6	Dag 10	Dag 17
Bakteriefri	$1,5 \times 10^5$	$2,6 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$
LM1	$3,4 \times 10^6$	$1,9 \times 10^7$	$4,5 \times 10^7$
LM2	$4,0 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7$	$3,9 \times 10^7$
DM	$3,6 \times 10^5$	$1,4 \times 10^6$	$3,3 \times 10^6$



Figur 16 Bilder tatt ved flow cytometri (SSC) ved avslutning av forsøket: a) LM1; b) LM2; c) DM; d) Bakteriefri. De to behandlingene med levende *Microbacterium* sp. (LM1 og LM2) har et større antall celler enn de to andre behandlingene. For DM-behandlingen har bakteriene blitt detektert selv om de er døde.

3.1.1.2 Måling av total ammonia i vannet

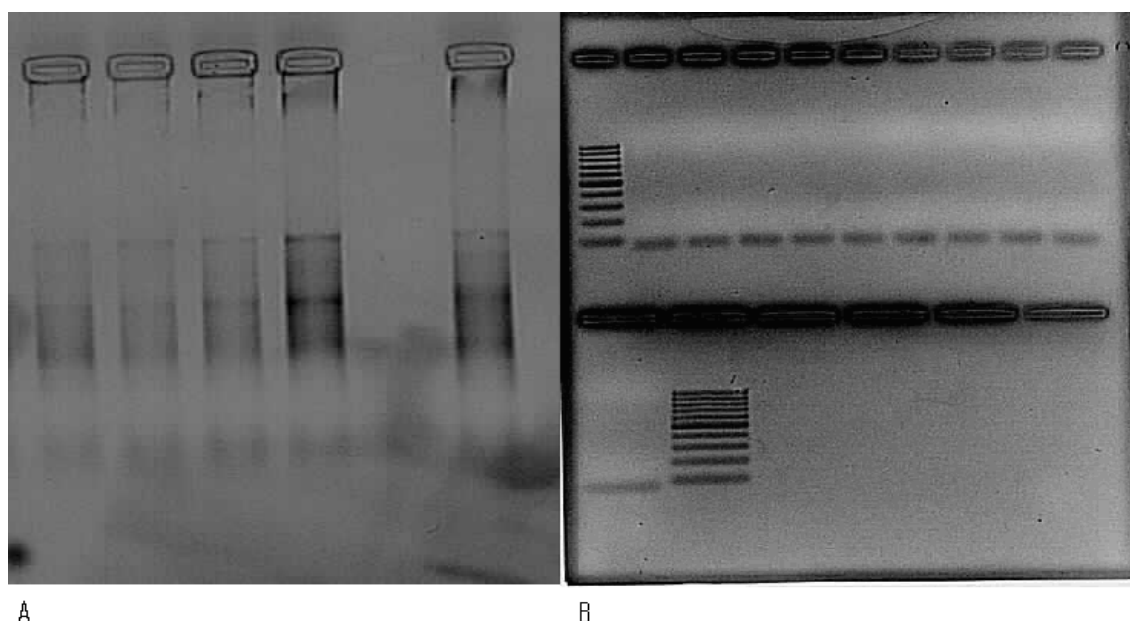
Ved forsøkets avslutning ble det målt total ammonia i vannet (Tabell 21). Målingene viste en total ammoniakonsentrasjon i vannet som lå mellom 0,2 og 1,2 mg L⁻¹. Behandlingen med døde bakterier (DM) hadde lavest konsentrasjon og LM1-behandlingen hadde høyest konsentrasjon. Det var cirka 3 ganger høyere konsentrasjon i LM1-behandlingen enn i LM2-behandlingen.

Tabell 21 Måling av total ammonia i vannprøver fra avslutning av startfôringsforsøket, gjort ved hjelp av Dr.Lange kyvette test nummer 304.

Behandling	Ammonia i vannet (mg L ⁻¹)
Bakteriefri	1,019
Levende <i>Microbacterium</i> 1	1,237
Levende <i>Microbacterium</i> 2	0,489
Død <i>Microbacterium</i>	0,234

3.1.1.3 Analyse av genuttrykk hos torskelarver fra startfôringsforsøk

For startfôringsforsøket ble torskelarvenes uttrykk av 8 ulike gener kvantifisert ved bruk av qPCR. Uttrykket av to av disse genene ble også testet for korttidsforsøket med levende og døde probiotiske kandidater. Før det ble kjørt qPCR ble det isolert RNA fra torskelarvene, og kvaliteten på dette ble undersøkt ved gelelektroforese (Figur 17A). Dette ble gjort for alle RNA isolat. Alle qPCR produkter ble også verifisert ved hjelp av gelelektroforese (Figur 17B). Gelene viste at det isolerte RNA'et var av god kvalitet (Figur 17A), og at det ved kjøring av qPCR kun ble amplifisert ett fragment i hver prøve. Dette fragmentet var på omtrent 70 basepar (Figur 17B).



Figur 17 A) Gelbilde etter kjøring av gelelektroforese på prøver med isolert RNA. På dette gelbildet kan en se klare bånd for alle prøver, noe som indikerer at det isolerte RNA'et ikke var degradert, men av god kvalitet. B) Gelbilde etter kjøring av gelelektroforese på prøver

med qPCR-produkter. På dette gelbildet kan en se klare bånd på samme plass i alle brønner. Dette tilsier at kun ett fragment på ca 70 basepar har blitt amplifisert, og at dette har skjedd i alle prøvene.

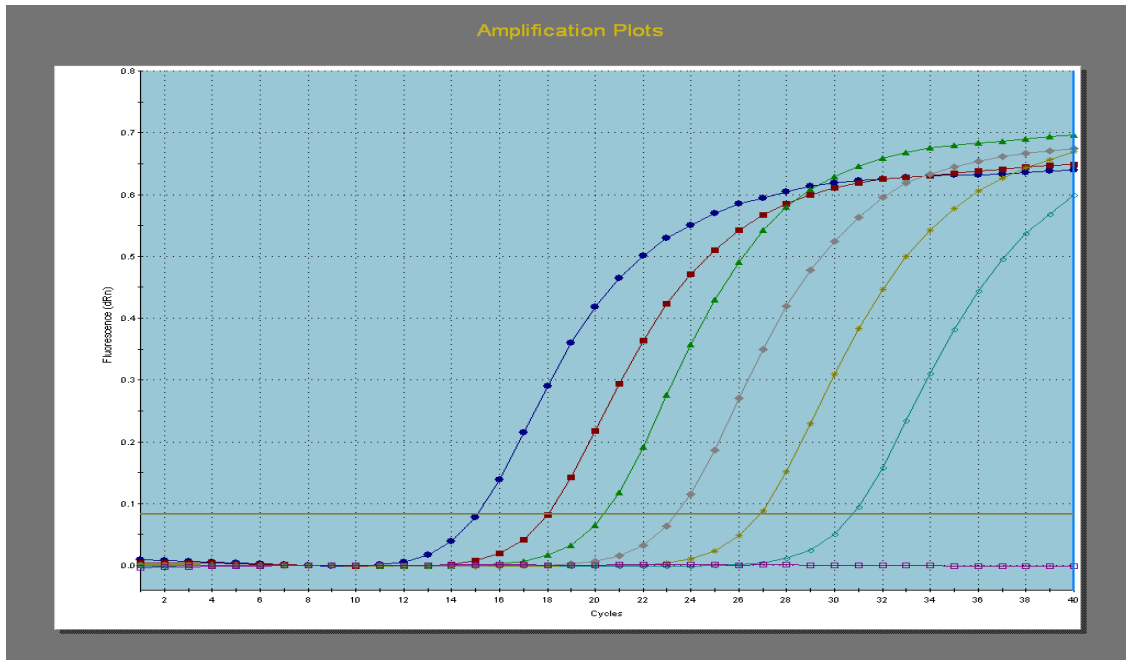
3.1.1.4 Testing av primereffektivitet

Som et eksempel på testing av primereffektivitet er resultatene til primerparet p26 F/R vist her. Dette primerparet er designet for å kvantifisere genet *tryptophanyl tRNA synthetase* (*WARS*). Tilsvarende evaluering ble også gjort med alle de andre primerene, og alle primerparene bortsett fra p32 F/R og p33 F/R viste tilfredsstillende resultater når det gjaldt amplifiseringseffektivitet og renhet av PCR-produktet. Testing av primerkvaliteten ble gjort i samarbeid med PhD stipendiat Torunn Forberg. Dette omfattet evaluering av amplifiseringseffektivitet og renhet av PCR-produkt.

Primerparet ble testet ved hjelp av en fortynningsrekke av plasmid DNA hvor deler av genet, inkludert primersekvensene, var klonet inn. Antall kopier av plasmidet per μL ble beregnet ut fra DNA konsentrasjoner målt på plasmid med insert. Plasmidet som ble brukt i forsøket kalles pDrive Cloning Vector og er 3,85 kb stort.

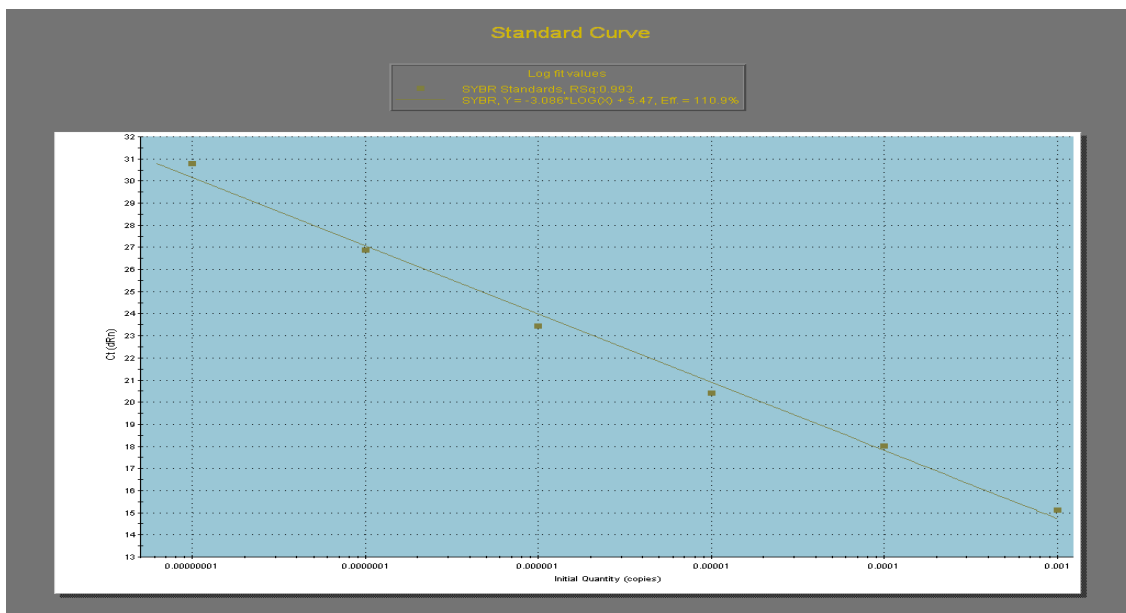
- A: $1,77 \times 10^7$ kopier/ μL
- B: $1,77 \times 10^6$ kopier/ μL
- C: $1,77 \times 10^5$ kopier/ μL
- D: $1,77 \times 10^4$ kopier/ μL
- E: $1,77 \times 10^3$ kopier/ μL
- F: $1,77 \times 10^2$ kopier/ μL
- G: 0 kopier/ μL

Fortynningsrekka ble behandlet som forklart i kapittel 2.4.7.2., og amplifikasjonsplottet som ble generert ved kjøring med primerparet p26 F/R er vist i Figur 18. Kurvene viser amplifikasjonen av DNA fragmentet gjennom qPCR-prosessen. Konsentrasjonen av templat i prøvene reduseres fra venstre mot høyre og $10\times$ fortytning gir en forskyvning mot høyre på cirka 3 sykler. C_T -verdiene er punktene hvor kurvene krysser den horisontale linjen (terskelfluorescens).



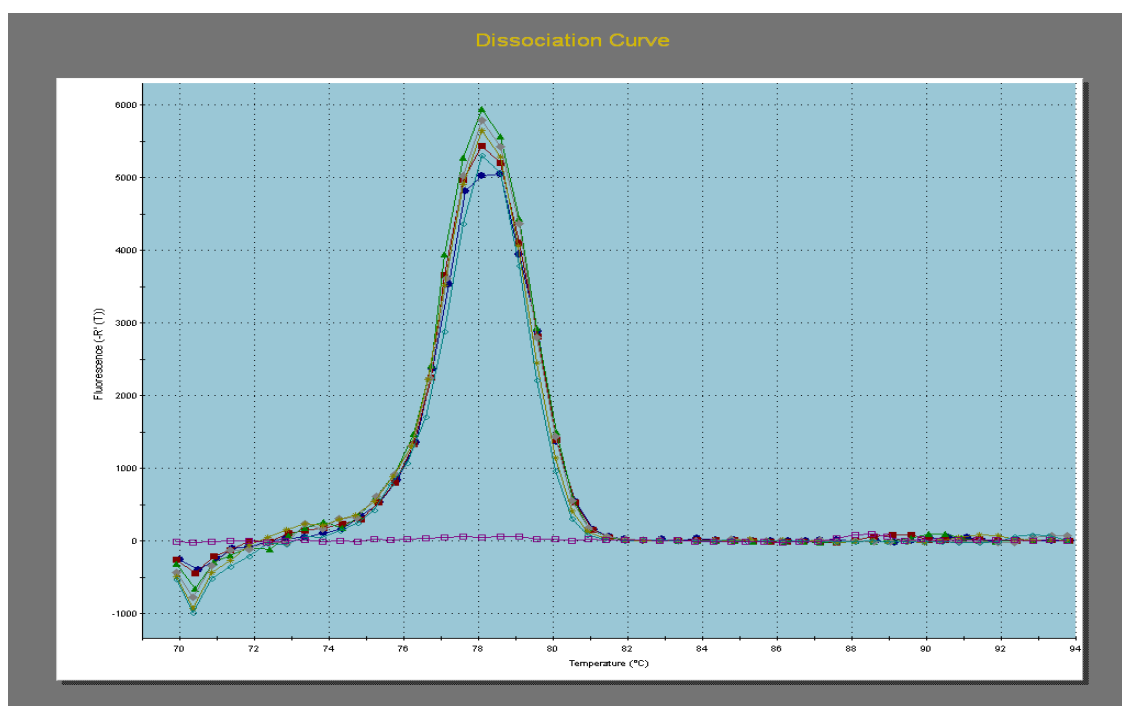
Figur 18 Amplifikasjonsplott for fortynningsrekke for primerparet p26 F/R. Fluorescens som indikasjon på mengde PCR-produkt plottet mot antall amplifikasjonssyklus. Kurvene er for fortynningsrekke (10×) av templat og for kontroll. Horisontal linje er terskelfluorescens.

Ut fra de kjente DNA konsentrasjonene og de ulike C_T -verdiene, ble det generert en standardkurve (Figur 19). Stigningstallet på $-3,086$ indikerer en amplifiseringseffektivitet på 110,9 %. Amplifiseringen var lineær i hele konsentrasjonsområdet.



Figur 19 Standardkurve for primerparet p26 F/R. Kurven er viser terskelsyklus (C_T) som som funksjon av logaritmen til antall templat ($\log C_0$). Stigningstallet til kurven ble $-3,086$ med $R^2 = 0,993$.

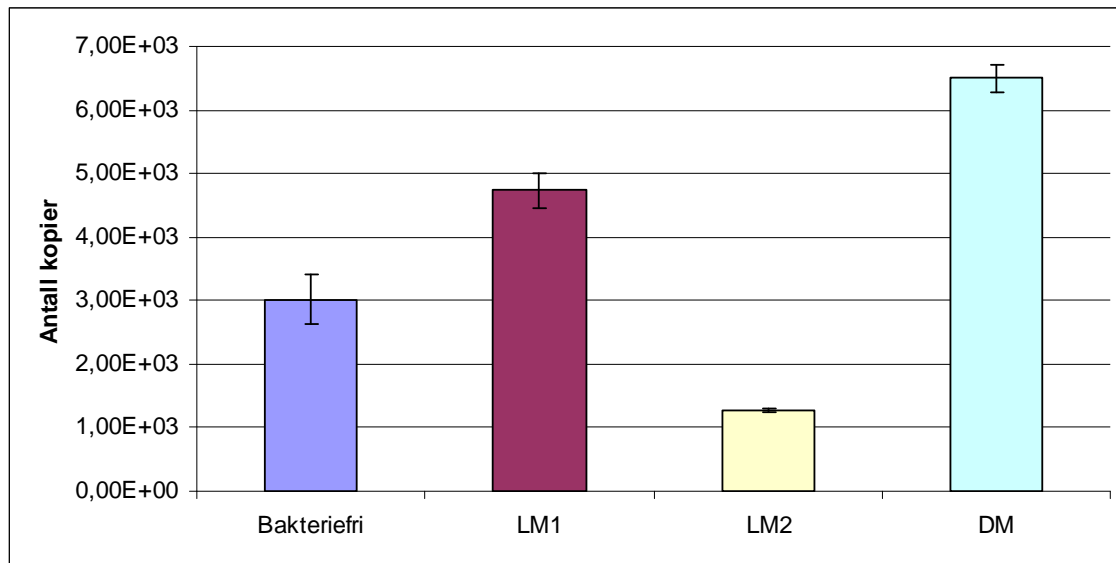
Det ble også generert en dissosiasjonskurve (Figur 20). Alle kurvene har samme dissosiasjonstemperatur, noe som viser at det mest sannsynlig kun ble laget ett qPCR-produkt ved bruk av dette primerparet.



Figur 20 Dissosiasjonskurve for primerparet p26 F/R. Kurva viser den deriverte av smeltekurven som funksjon av temperatur for prøvene som ble brukt til å generere standardkurven.

3.1.1.5 Analyse av uttrykk av β -actin

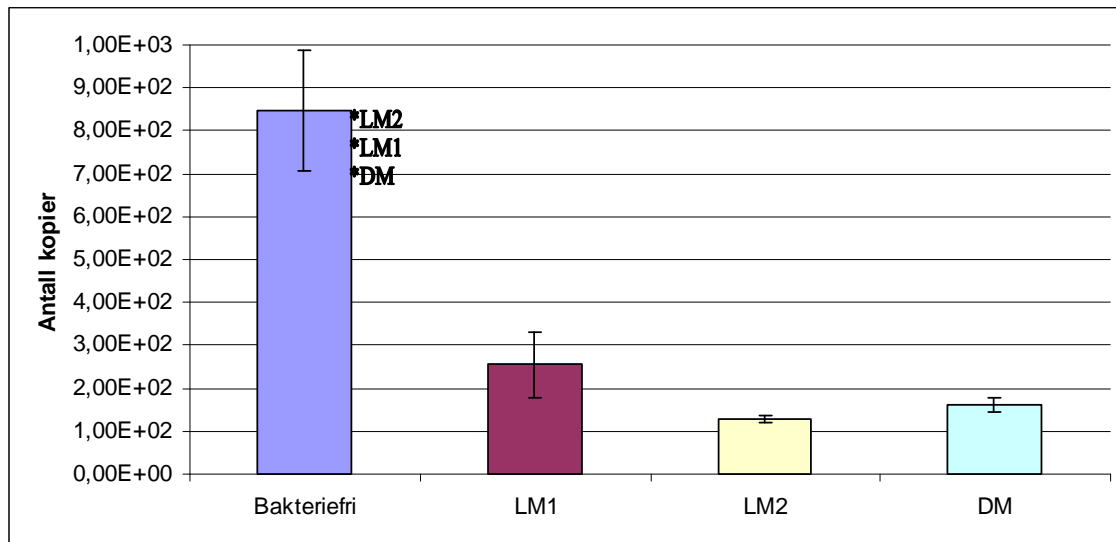
β -actin ble brukt som housekeeping gen for normalisering av genuttryksresultatene. Resultatene etter kjøring av qPCR på β -actin er fremstilt i Figur 21.



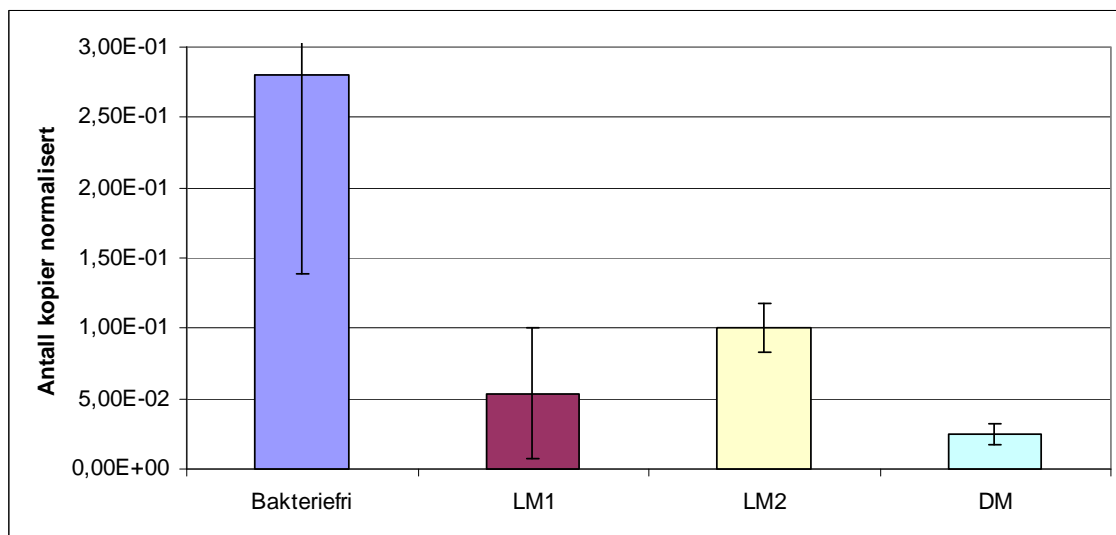
Figur 21 Genuttrykk for β -actin for ulike behandlinger med levende (LM) og døde (DM) probiotiske kandidater og en bakteriefri kontrollbehandling. Søylene viser antall kopier RNA, og hver søyle representerer en behandling. Error bars er standard error.

3.1.1.6 Kvantifisering av genuttrykk hos torskelarver

Resultatene er presentert som antall kopier per standardmengde RNA isolert fra torskelarvene (Figur 22 og 24, signifikante forskjeller er på disse figurene merket med stjerne (*)) og som antall kopier normalisert til antall kopier av housekeeping genet β -actin i samme prøve (Figur 23-31). Ikke normaliserte resultater er kun vist for *C3* og *Cyp1a1*. Kun disse genene ble kvantifisert for korttidsforsøket med levende og døde probiotiske kandidater, og resultatene fra dette forsøket ble ikke normalisert. De beregnede konsentrasjonene av RNA i de ulike prøvene ble parvis sammenlignet ved hjelp av Tukey's Honestly-Significant-Difference Test, og ut fra disse sammenligningene ble det bestemt at uttrykket av genene *C3* og *Cyp1a1* skulle kvantifiseres for korttidsforsøket med levende og døde probiotiske kandidater. Forholdet (fold change) mellom den bakteriefrie behandlingen og de andre behandlingene ble beregnet for de normaliserte verdiene. Kun forholdstall høyere enn 2 blir oppgitt her.

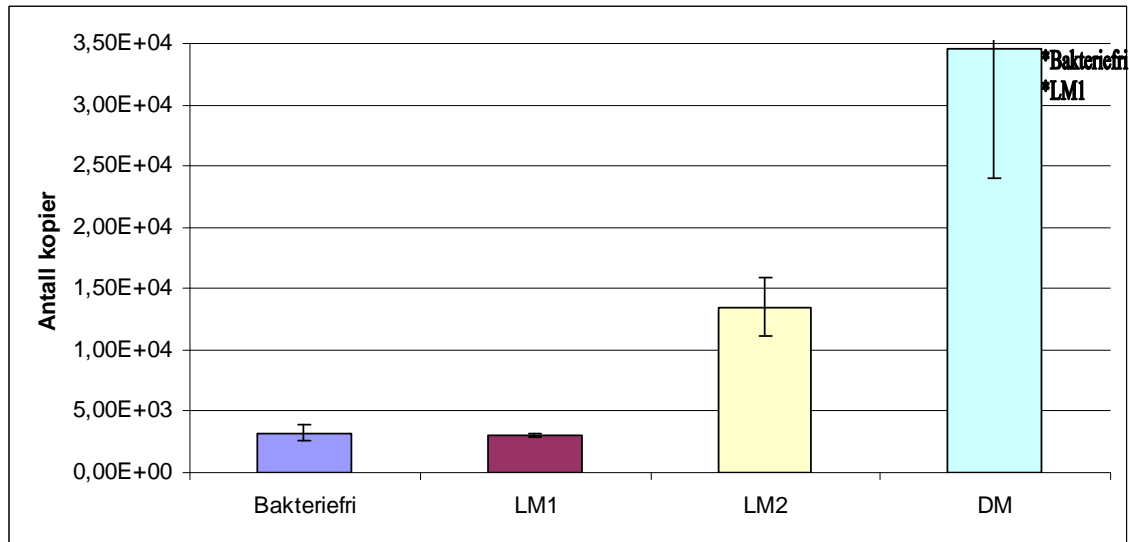


Figur 22 Genuttrykk for *C3* for de ulike behandlingene. Det var signifikante forskjeller i genuttrykket mellom den bakteriefrie behandlingen, og behandlingene LM1 ($P= 0,0039$), LM2 ($P= 0,0011$) og DM ($P= 0,0015$), med høyest genuttrykk i den bakteriefrie behandlingen. Søylene viser antall kopier av *C3* per $0,04 \mu\text{g}$ isolert RNA Error bars er standard error.

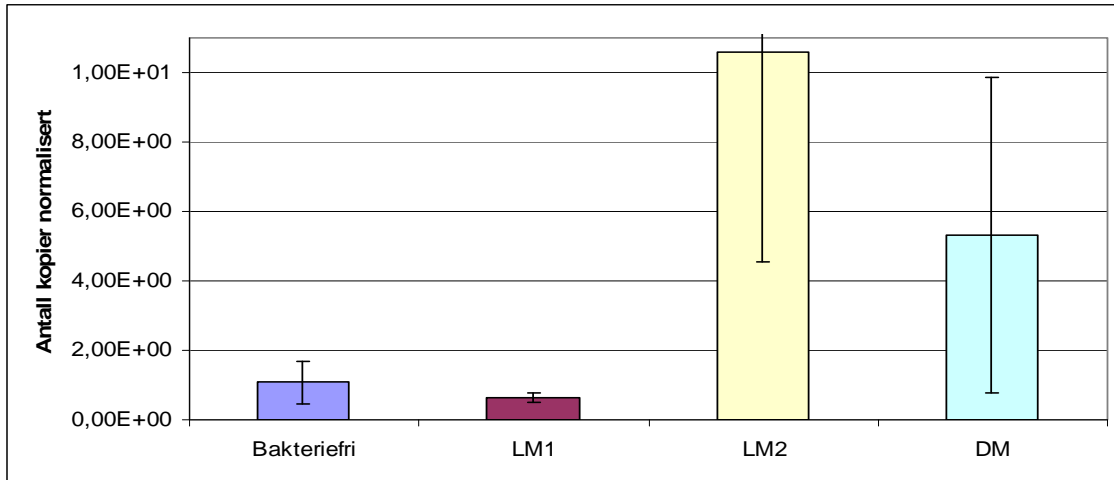


Figur 23 Genuttrykk for *C3* for de ulike behandlingene normalisert mot β -actin. Hver søyle representerer en behandling. 95 % konfidensintervall (error bars) viste at det var signifikante forskjeller i genuttrykket mellom den bakteriefrie behandlingen og alle de andre behandlingene. Det er også signifikant forskjell mellom LM2-behandlingen og DM-behandlingen. Forholdet mellom den bakteriefrie behandlingen og LM1-, LM2- og DM-behandlingen var på henholdsvis 5,21, 2,80 og 11,4.

Uttrykket av *C3* viste samme mønster både før og etter normalisering ved at det for begge metoder var høyest uttrykt i torskelarvene fra den bakteriefrie behandlingen. Uten normalisering var det ikke signifikante forskjeller mellom de andre behandlingene, men etter normalisering ble genet signifikant høyere uttrykt i torskelarvene fra LM2-behandlingen enn i DM-behandlingen.

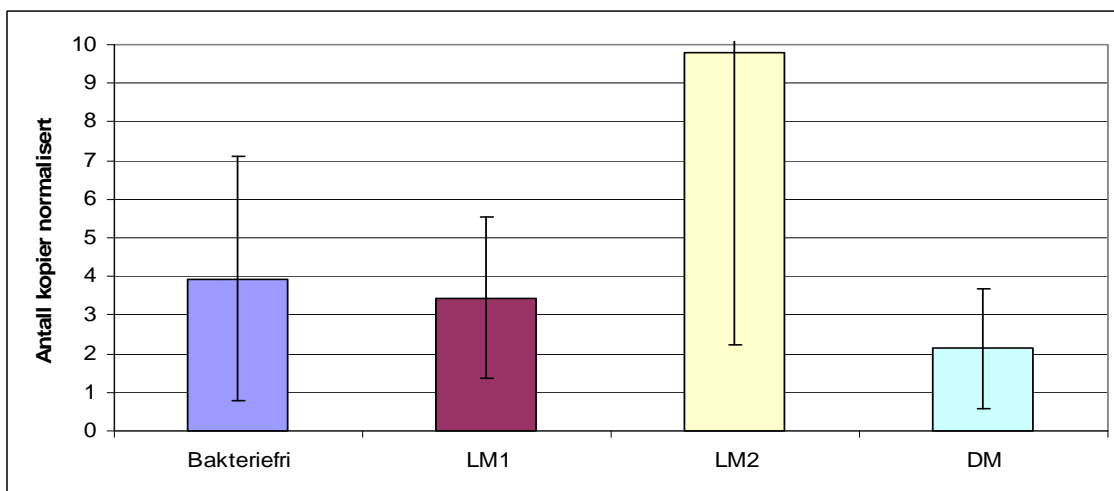


Figur 24 Uttrykk av *Cyp11a1* for de ulike behandlingene. Det er her signifikante forskjeller i genuttrykket mellom DM-behandlingen og behandlingene Bakteriefri ($P= 0,0174$) og LM1 ($P= 0,0394$), med høyest genuttrykk i DM-behandlingen. Søylene viser antall kopier av *Cyp11a1* per 0,04 μg isolert RNA Error bars er standard error.

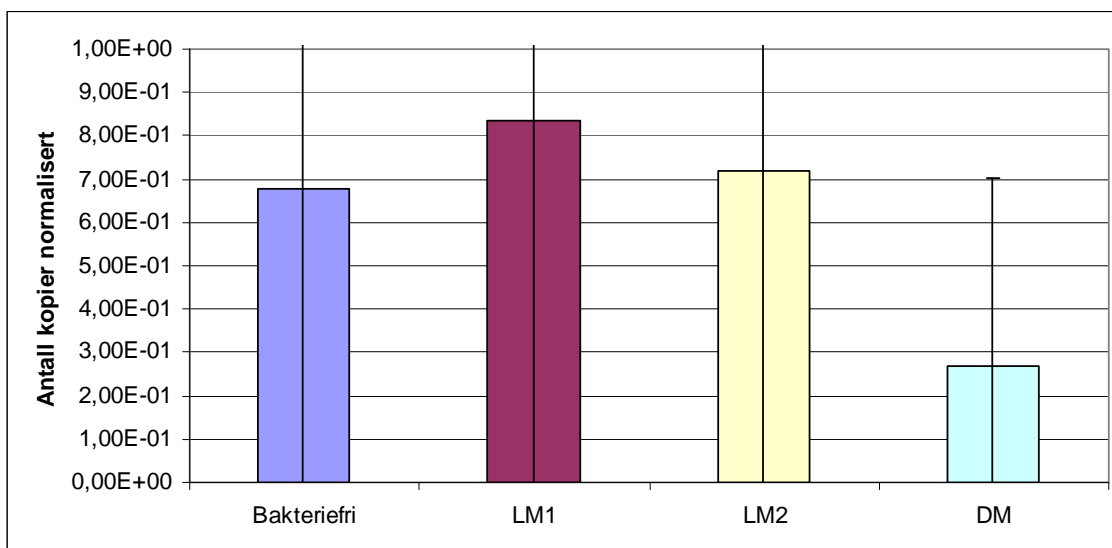


Figur 25 Uttrykk av *Cyp11a1* for de ulike behandlingene normalisert mot uttrykket av β -actin. Hver søyle representerer en behandling. 95 % konfidensintervall (error bars) viser at det var signifikante forskjeller i genuttrykket mellom LM2-behandlingen og LM1-behandlingen og den bakteriefrie behandlingen. Forholdet mellom den bakteriefrie behandlingen og LM2- og DM-behandlingen, var på henholdsvis 9,89 og 4,99.

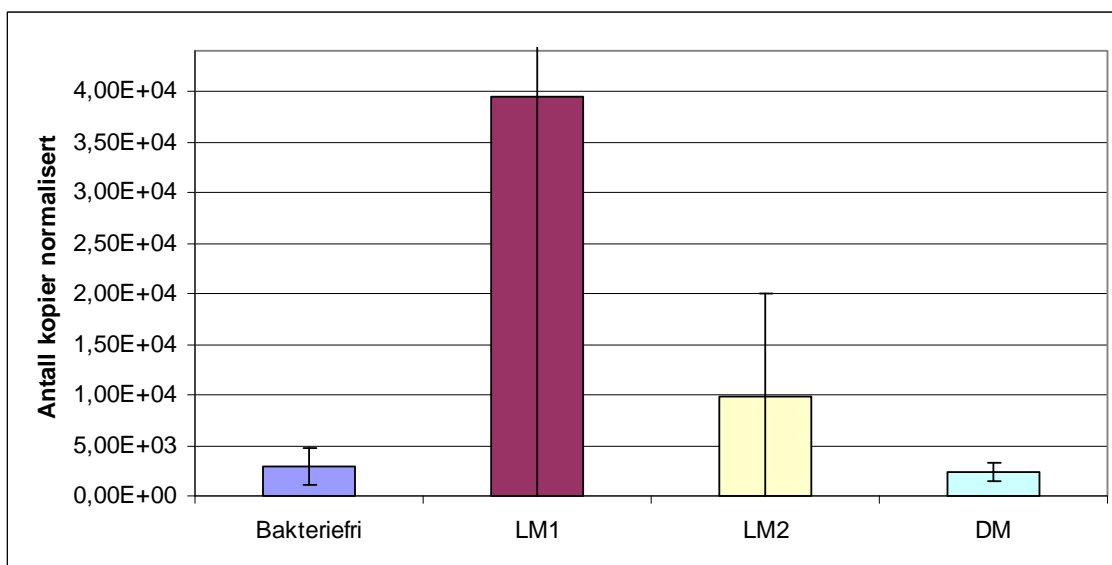
Uttrykket av *Cyp11a1* var ikke likt før og etter normalisering. Det gikk fra å være høyest uttrykt i torskelarvene fra DM-behandlingen, til å være høyest i larvene fra LM2-behandlingen. Før normaliseringen var det signifikant forskjell mellom DM- og LM1-behandlingen, men denne forskjellen forsvant etter normalisering.



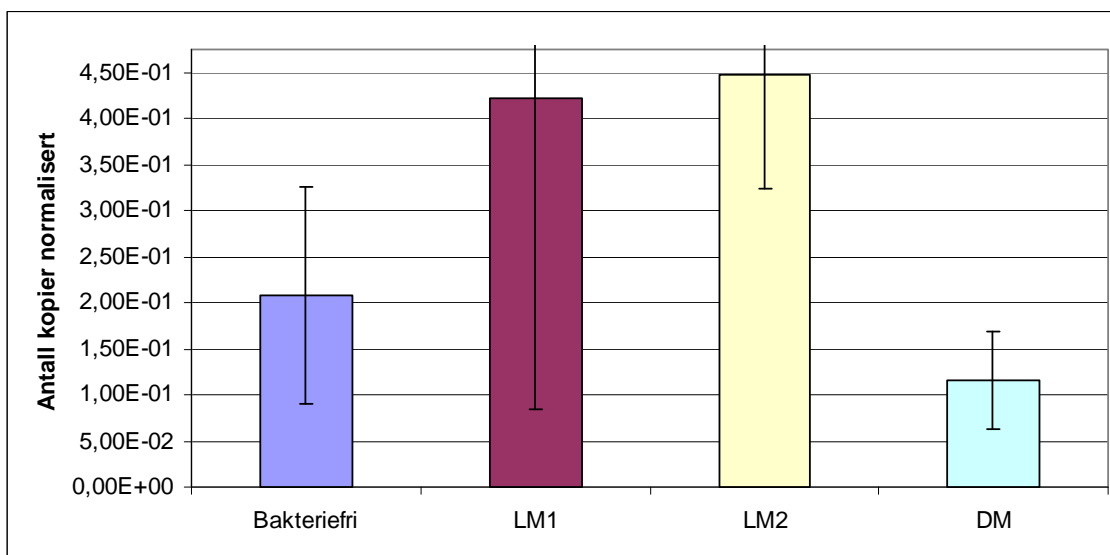
Figur 26 Genuttrykk for *CLECT* for de ulike behandlingene normalisert mot β -actin. Det var ingen signifikante forskjeller mellom genuttrykket i de ulike prøvene. 95 % konfidensintervall er vist med error bars. Forholdet mellom den bakteriefrie behandlingen og LM2-behandlingen, var på 2,48.



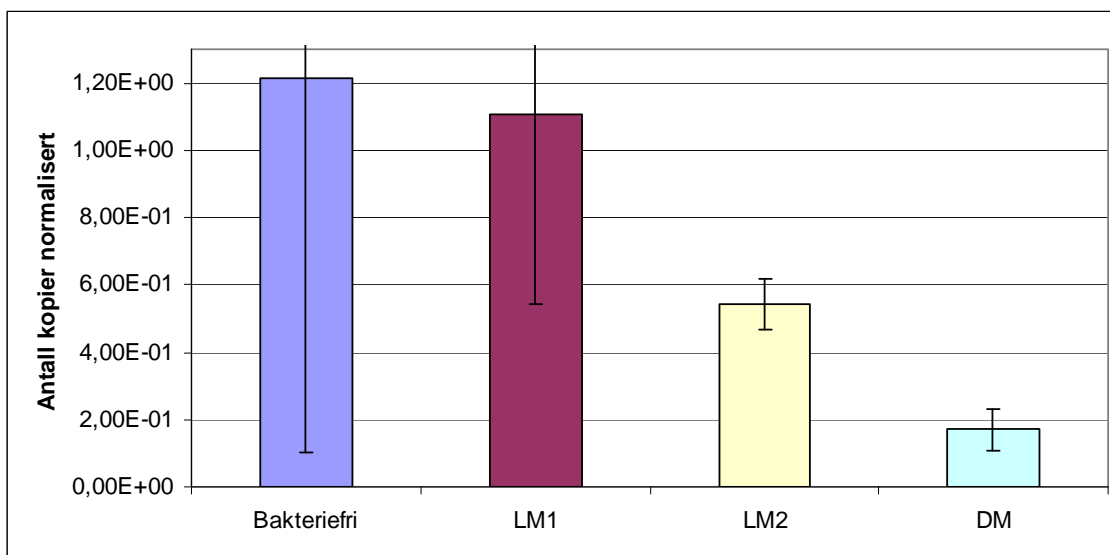
Figur 27 Genuttrykk for *WARS* for de ulike behandlingene normalisert mot β -actin. Hver søyle representerer en behandling. Det var ikke noen signifikante forskjeller i genuttrykket mellom behandlingene. Forholdet mellom den bakteriefrie behandlingen og DM-behandlingen var på 2,51. Error bars er 95 % konfidensintervall.



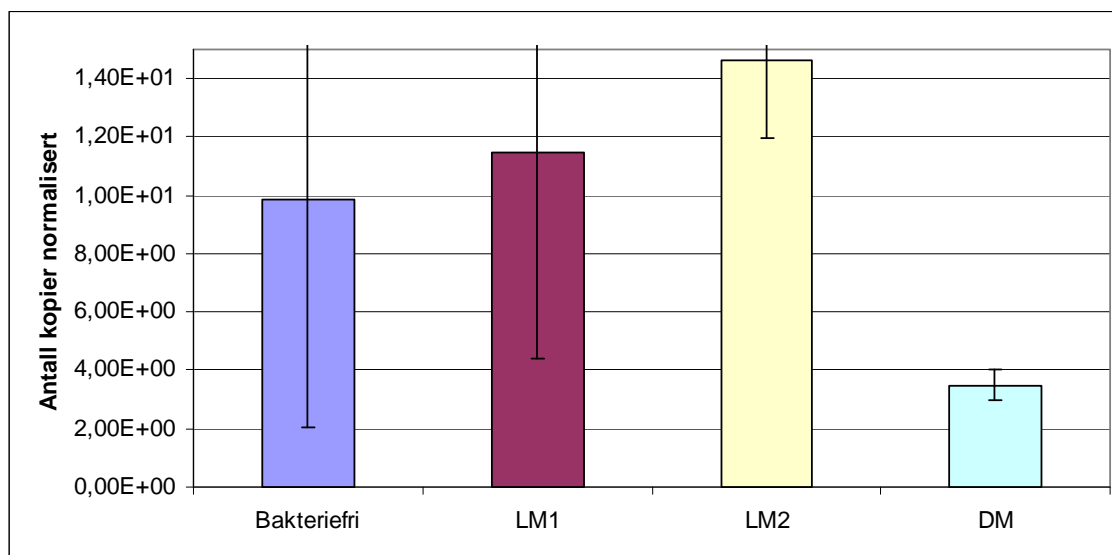
Figur 28 Genuttrykk for *Fdps* for de ulike behandlingene normalisert mot β -actin. Hver søyle representerer en behandling. Det var ingen signifikante forskjeller mellom de ulike behandlingene. Forholdet mellom den bakteriefrie behandlingen og LM1-behandlingen var på 13,1 og mellom den bakteriefrie behandlingen og LM2-behandlingen var forholdet på 3,39. Error bars er 95 % konfidensintervall.



Figur 29 Genuttrykk for *Fiaf* for de ulike behandlingene normalisert mot β -actin. Hver søyle representerer en behandling. Det var signifikant lavere genuttrykk i DM-behandlingen enn i LM2-behandlingen. Forholdet mellom den bakteriefrie behandlingen og LM1- og LM2-behandlingen var på henholdsvis 2,03 og 2,15. Error bars er 95 % konfidensintervall.



Figur 30 Genuttrykk for *Gpx2* for de ulike behandlingene normalisert mot β -actin. Hver søyle representerer en behandling. Det var signifikante forskjeller mellom DM-behandlingen og de to behandlingene med levende bakterier (LM1 og LM2). Forholdet mellom den bakteriefrie behandlingen og LM2- og DM-behandlingen var på henholdsvis 2,24 og 7,14. Error bars er 95 % konfidensintervall.



Figur 31 Genuttrykk for *Itgb1bp3* for de ulike behandlingene normalisert mot β -actin. Hver søyle representerer en behandling. Det var signifikant lavere genuttrykk i DM-behandlingen enn i LM1- og LM2-behandlingen. Forholdet mellom den bakteriefrie behandlingen og DM-behandlingen, var på 2,82. Error bars er 95 % konfidensintervall.

For *C3* og *Cypl1* utgjorde normaliseringen ikke så store endringer i resultatene. For *C3* var uttrykket høyest i den bakteriefrie behandlingen, og for *Cypl1* gav LM2- og DM-behandlingene høyest uttrykk både før og etter normalisering. For *Cypl1* gav DM-behandlingen signifikant høyere uttrykk enn den bakteriefrie- og LM1-behandlingen før normalisering, mens det etter normalisering kun var LM2-behandlingen som gav signifikante forskjeller i genuttrykket.

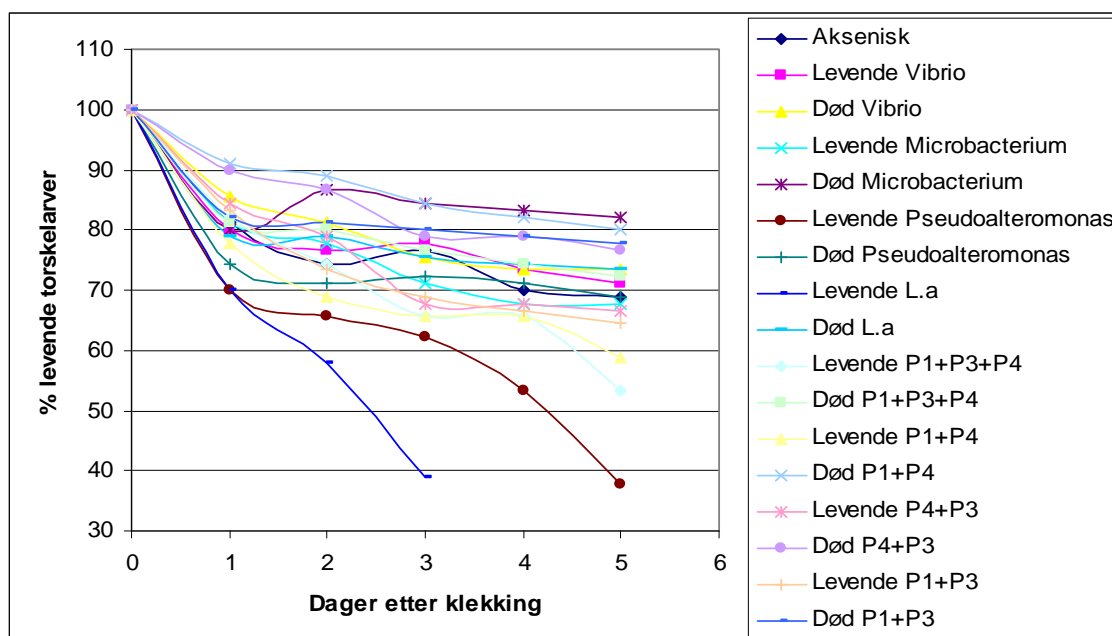
For *CLECT* utgjorde normaliseringen ingen endringer i resultatene, da det ikke var noen signifikante forskjeller mellom de ulike behandlingene verken før eller etter normalisering. For *WARS* var uttrykket i torskelarvene fra LM1-behandlingen signifikant høyere enn uttrykket i larvene fra LM2-behandlingen før normalisering, mens forskjellen etter normalisering ikke lenger var signifikant. DM-behandlingen gav da det laveste uttrykket. Uttrykket av både *Fiaf* og *Fdps* var signifikant høyere i larvene fra LM1-behandlingen enn i larvene fra de andre behandlingene før normalisering. Etter normalisering hadde dette endret seg betraktelig. For *Fiaf* gav da LM2-behandlingen det høyeste uttrykket og det var signifikant høyere enn det laveste uttrykket som var i larvene fra DM-behandlingen. For *Fdps*

var det ingen signifikante forskjeller mellom de ulike behandlingene etter normalisering. For *Gpx2* var det ingen signifikante forskjeller før normalisering, men etter normalisering var uttrykket i larvene fra de to behandlingene med levende bakterier signifikant høyere enn uttrykket i larvene fra DM-behandlingen. Uttrykket av *Itgb1bp3* endret seg fra ikke å ha signifikante forskjeller mellom de ulike behandlingene, til at LM1- og LM2-behandlingen gav signifikant høyere uttrykk enn DM-behandlingen.

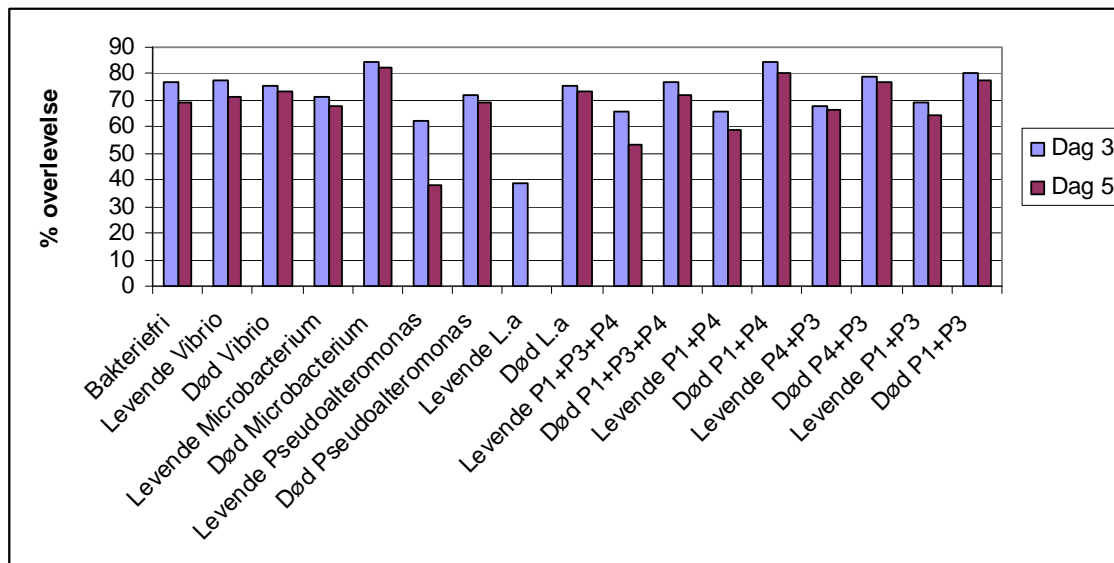
Generelt sett gav behandlingen med døde bakterier lavere uttrykk enn de andre behandlingene også den bakteriefrie behandlingen, etter normalisering, selv om forskjellen ikke alltid var signifikant. Unntaket fra dette var uttrykket av *Cyp1a1* hvor den bakteriefrie behandlingen og LM1-behandlingen gav lavere uttrykk enn DM-behandlingen. For de fleste genene var uttrykket svært forskjellig i de to behandlingene med levende bakterier, noe som kan tyde på at forholdet i flaskene var så forskjellig at det overstyrte effekten bakteriene hadde på uttrykket av genene.

3.1.2 Korttidsforsøk med levende og døde probiotiske kandidater

Torskelarvenes prosentvise overlevelse ble beregnet ved daglige tellinger av døde torskelarver gjennom forsøket (Figur 34 og 35).



Figur 34 Tidsutvikling av prosent levende torskelarver for behandlinger med levende og døde bakterier beregnet etter daglige tellinger av torskelarvene. P1: *Vibrio* sp.; P3: *Microbacterium* sp.; og P4: *Pseudoalteromonas* sp.



Figur 35 Torskelarvenes prosentvise overlevelse på dag 3 og 5. P1: *Vibrio* sp.; P3: *Microbacterium* sp.; og P4: *Pseudoalteromonas* sp.

For å sammenligne overlevelse for behandlingene med levende og døde bakterier, ble det utført chi-kvadrat test ($\alpha=0,05$, d.f.=1). For å se eventuell utvikling gjennom forsøket ble dette gjort for resultatene fra dag 3 og 5 etter klekking. I behandlingen hvor det var tilsatt levende *L. anguillarum*, var dødligheten så høy, at flaskene måtte avsluttes på dag tre for å kunne ta vare på noen av torskelarvene til analyse av genuttrykk. For de fleste behandlingene avtok overlevelsen gradvis gjennom forsøket, og var mellom 50 og 85% på dag 5 etter klekking. Unntaket var behandlingene med levende *Pseudoalteromonas* sp. hvor overlevelsen var 38% og behandlingen med levende *L. anguillarum* hvor det ble antatt at overlevelsen ville vært på 0% på dag 5 etter klekking. Forskjellen i torskelarvenes overlevelse for behandlinger med døde versus levende bakterier var på 2-31% for de probiotiske kandidatene.

For å vurdere om bakteriene måtte være aktive for å ha noen effekt på torskelarvenes overlevelse, ble behandlingene med levende og døde probiotiske kandidater, og behandlingene med levende og død *L. anguillarum*, sammenlignet. På dag 3 etter klekking var det få forskjeller, men for behandlingene tilsatt *L. anguillarum*, og *Microbacterium* og P1+P4-miks, var overlevelsen signifikant lavere for behandlingene tilsatt levende bakterier (henholdsvis $P=6,6 \times 10^{-7}$; $P=3,14 \times 10^{-2}$; og $P=3,43 \times 10^{-3}$). På dag 5 var det høyere

overlevelse ved tilsats av døde bakterier enn ved tilsats av levende bakterier, for alle behandlingene bortsett fra P4+P3-miks. For denne behandlingen var det ingen signifikante forskjeller mellom behandlingene med døde og levende bakterier.

Ved sammenligning av den bakteriefrie behandlingen og behandlingene tilsatt levende bakterier, var det på dag 3 kun behandlingen tilsatt levende *L. anguillarum* som hadde signifikant lavere overlevelse enn den akseniske behandlingen ($P=2,88 \times 10^{-7}$). Ved tilsats av døde bakterier var det ingen signifikante forskjeller i forhold til den bakteriefrie behandlingen. Dette viste at *L. anguillarum* induserte økt dødlighet hos torskelarvene. På dag 5 var det lavere overlevelse i behandlingene tilsatt levende *Pseudoalteromonas* sp., P1+P4-miks og P1+P3+P4-miks, i forhold til den bakteriefrie behandlingen (henholdsvis $P=2,87 \times 10^{-5}$; $P=0,004$; og $P=0,032$). For behandlingene med døde bakterier, var det lavere overlevelse ved tilsats av *Microbacterium* sp. enn i den bakteriefrie behandlingen ($P=0,037$).

3.1.2.1 Kvantifisering av bakterier

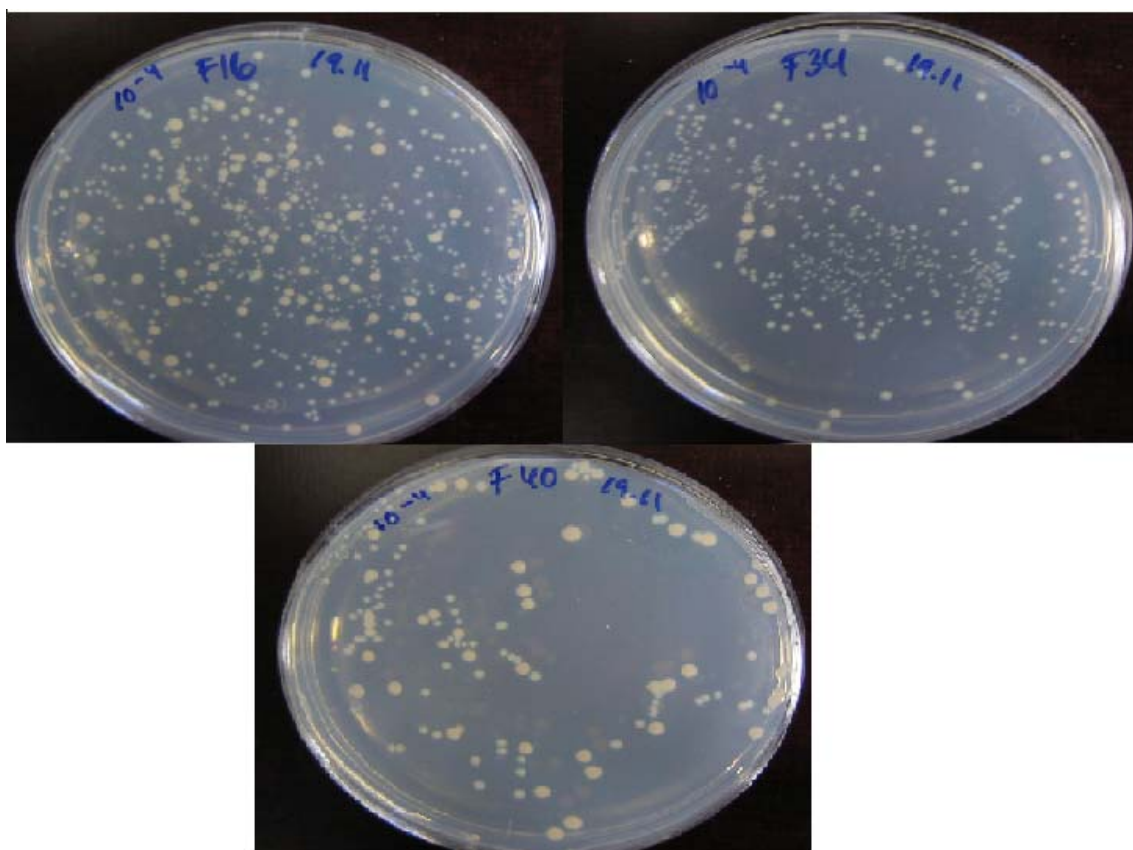
Etter uplating av fortynningsrekker av vannprøver fra de ulike behandlingene, ble CFU mL⁻¹ bestemt for behandlingene med kun en type bakterie (Tabell 23). Ved starten av forsøket ble det tilsatt bakterier slik at bakterietettheten var på $1,0 \times 10^6$ CFU mL⁻¹.

Tabell 23 CFU mL⁻¹ for behandlinger med en type bakterie tilsatt.

Behandling	CFU/mL
Levende <i>Vibrio</i> sp.	$0,04 \times 10^6$
Levende <i>Microbacterium</i> sp.	$0,188 \times 10^6$
Levende <i>L. anguillarum</i> sp.	$0,04 \times 10^6$

For behandlingene med flere typer bakterier ble det problematisk å telle kolonier på platene, da de ulike bakteriene dannet kolonier med ulik størrelse og farge, og ofte vokste over hverandre. Vannprøvene til behandlingene med alle tre typer bakterier gav vekst av kun to typer kolonier på platene, og på platene for behandlingene med P1+P3 vokste det kun opp en type koloni. Platene for behandlingene med P1+P3 lignet svært mye på platene for behandlingene med levende *Microbacterium* sp., og CFU mL⁻¹ ble her anslått å være $0,066 \times 10^6$.

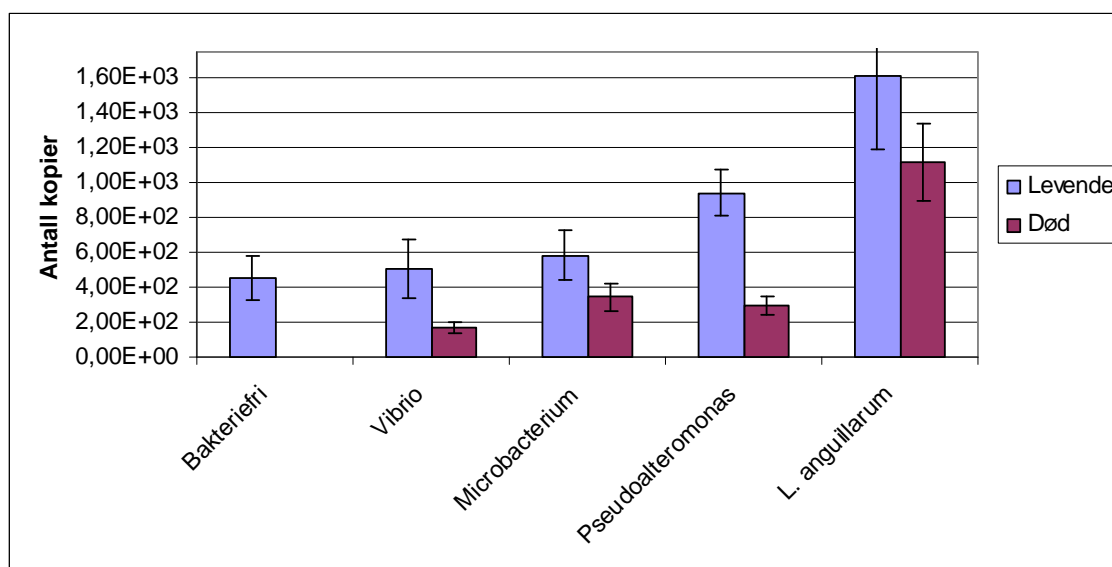
Ved bakteriesjekk og kvantifisering viste utplating av vannprøver fra de tre parallelle behandlingene med levende *Pseudoalteromonas* sp. vekst av to typer kolonier på platene. På grunn av at det ble samme type vekst på alle platene, kan en anta at dette ikke er en tilfeldig kontaminering, men at flaskene har blitt tilsatt feil type bakterier. Platene fra flaske 16-18 var svært lik platene fra flaskene som inneholdt en blanding av *Pseudoalteromonas* sp. og *Vibrio* sp. eller *Microbacterium* sp. (Figur 36). Muligheten for at *Vibrio* sp. eller *Microbacterium* sp. har blitt tilsatt i tillegg til *Pseudoalteromonas* sp., er derfor overhengene. Om dette også er tilfelle for behandlingen med død *Pseudoalteromonas* sp. er vanskelig å si uten videre undersøkelser, da dette ikke kan sees ut fra utplating. Til tross for at behandlingen med levende *Pseudoalteromonas* sp. var feil, ble det besluttet å bruke torskelarvene også fra denne behandlingen videre.



Figur 36 Bilder av agarplater etter utplating av vannprøver fra behandlinger med levende *Pseudoalteromonas* sp. (øverst til venstre), miks av *Pseudoalteromonas* sp. og *Vibrio* sp. (øverst til høyre) og miks av *Pseudoalteromonas* sp. og *Microbacterium* sp. (nederst).

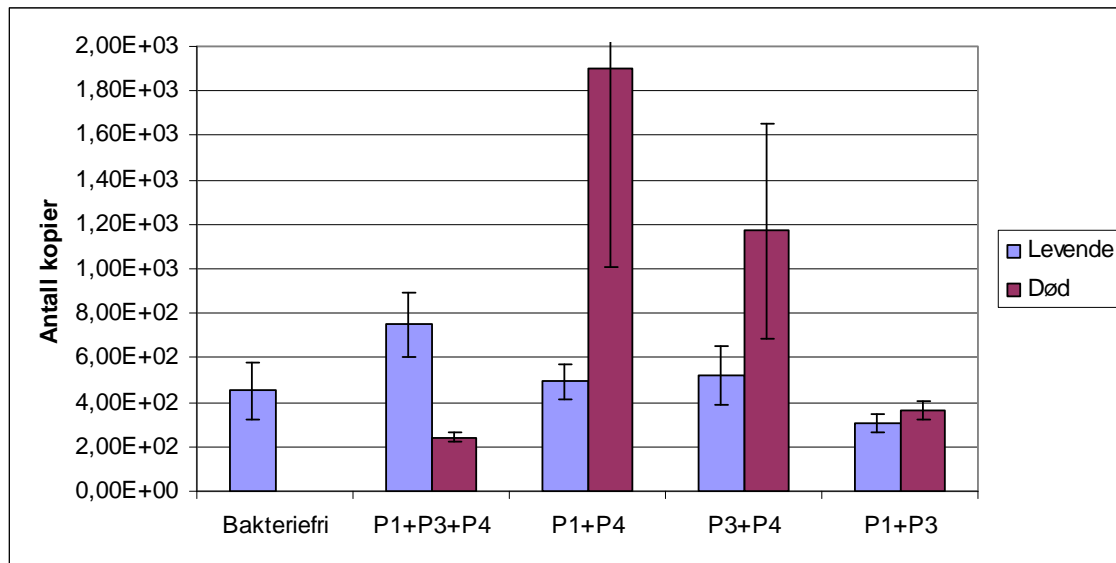
3.1.2.2 Kvantifisering av genuttrykk hos torskelarver

Ut fra resultatene for genuttrykk i startfôringsforsøket, ble det bestemt at uttrykket av *C3* og *Cypla1* skulle kvantifiseres hos de fem dager gamle torskelarvene fra korttidsforsøket med levende og døde probiotiske kandidater. Resultatene ble sammenlignet ved hjelp av Tukey's Honestly-Significant-Difference Test (Figur 37-40, i Figur 38 og 39 er de ulike probiotiske kandidatene kalt P1 (*Vibrio* sp.), P3 (*Microbacterium* sp.) og P4 (*Pseudoalteromonas* sp.) for enkelhets skyld. Resultatene er ikke normalisert mot β -actin.



Figur 37 Genuttrykk for *C3* i torskelarver for behandlingene bakteriefri, levende og død *Vibrio*, *Microbacterium*, *Pseudoalteromonas* og *L. anguillarum*. Søylene viser antall kopier av *C3* per 0,04 μ g isolert RNA. Error bars er standard error.

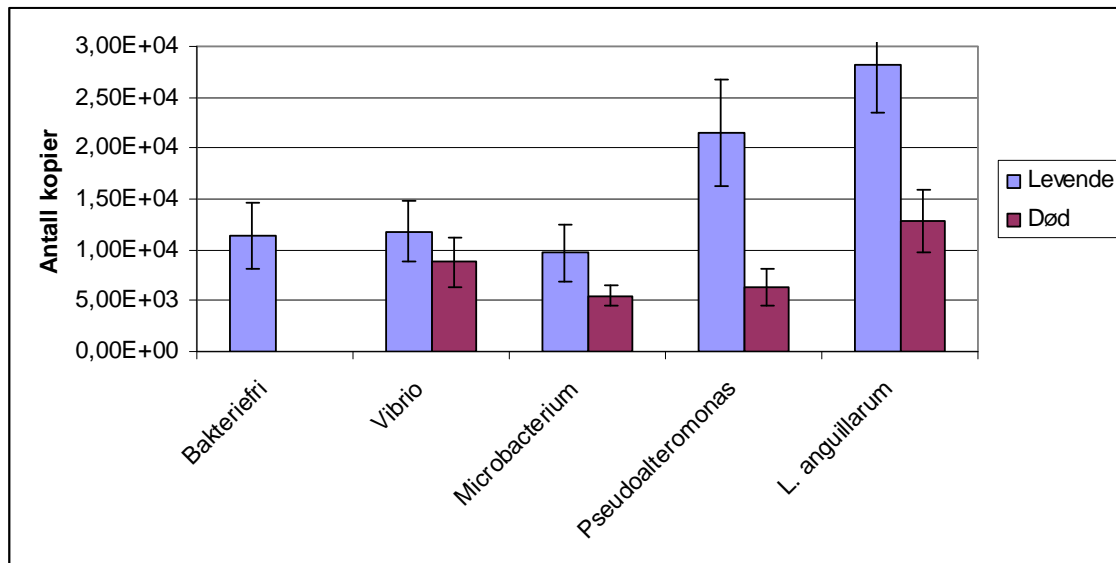
For genuttrykket av *C3* var det ingen signifikante forskjeller mellom behandlingene tilsatt levende eller døde bakterieceller av samme type (Figur 37). Behandlingene med døde bakterier gav lavere uttrykk av *C3* enn behandlingene med levende bakterier, men variasjonen mellom replikatene er så stor at forskjellen ikke blir signifikant. Uttrykket av *C3* er høyest i behandlingene med levende og død *L. anguillarum* selv om det kun er signifikant høyere enn de andre behandlingene i behandlingen med levende *L. anguillarum*. Unntaket er behandlingen med levende *Pseudoalteromonas* sp. hvor uttrykket av *C3* ikke er signifikant lavere enn i behandlingen med levende *L. anguillarum*.



Figur 38 Genuttrykk for *C3* i torskelarver for behandlingene med ulike blandinger av de probiotiske kandidatene og den bakteriefrie behandlingen. P1: *Vibrio* sp.; P3: *Microbacterium* sp.; og P4: *Pseudoalteromonas* sp. Søylene viser antall kopier av *C3* per 0,04 µg isolert RNA. Error bars er standard error.

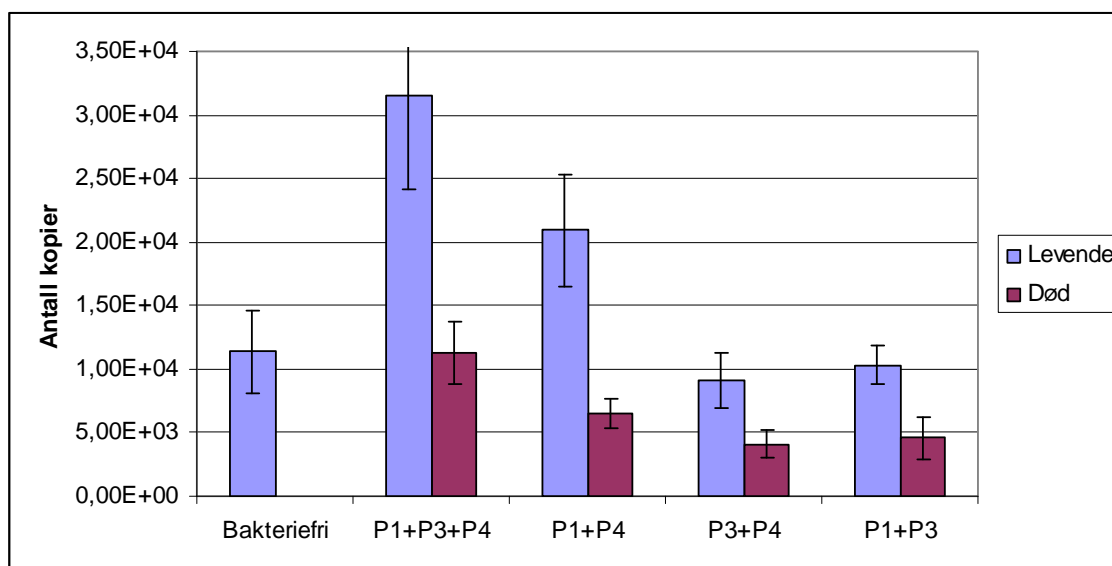
Også for behandlingene hvor det ble tilsatt blandinger av bakterier var variasjonen i uttrykk av *C3* mellom de ulike replikatene så stor at det blir lite signifikante forskjeller (Figur 38). Behandlingen med død P1+P4 gav signifikant høyere uttrykk av *C3* i forhold til behandlingene med død P1+P3+P4 og død P1+P3. Det var ingen signifikante forskjeller mellom den bakteriefrie behandlingen og de andre behandlingene, eller mellom behandlingene med levende og død bakteriemiks av samme type.

Genuttrykket av *C3* i behandlingene med levende bakterier lå på omtrent samme nivå for alle behandlingene, både for behandlingene med monokulturer og for behandlingene med miks av ulike probiotiske kandidater. Det var kun behandlingen med *L. anguillarum* som skilte seg ut ved å være høyere enn de andre. Det samme var tilfellet for uttrykket av *C3* i larvene fra behandlingene med døde bakterier tilsatt som monokulturer. Behandlingene med død P1+P4 og P3+P4 gav et høyere uttrykk enn behandlingene med døde monokulturer, mens uttrykket i behandlingene med død P1+P3+P4 og P1+P3 var på omtrent samme nivå som uttrykket i behandlingene med monokulturer.



Figur 39 Genuttrykk for *Cypl1* i torskelarver for behandlingene bakteriefri, levende og død *Vibrio*, *Microbacterium*, *Pseudoalteromonas* og *L. anguillarum*. Søylene viser antall kopier av *Cypl1* per 0,04 µg isolert RNA. Error bars er standard error.

For *Cypl1* viste sammenligningen av behandlinger med levende og døde bakterier av samme art, at det kun var *L. anguillarum* og *Pseudoalteromonas* sp. som gav signifikant høyere genuttrykk ved tilsats av levende bakterier i forhold til ved tilsats av døde bakterier (Figur 39). For disse to behandlingene var uttrykket av *Cypl1* ved tilsats av levende bakterier henholdsvis 2,2 og 3,4 ganger høyere enn ved tilsats av døde bakterier. Sammenligningen av behandlingene som var tilsatt én type levende eller døde bakterier hver, viste at uttrykket av *Cypl1* var høyest i behandlingen med *L. anguillarum* (Figur 39). Dette var signifikant høyere enn genuttrykket i alle de andre behandlingene bortsett fra behandlingen med levende *Pseudoalteromonas* sp.



Figur 40 Genuttrykk for *Cyp1a1* i torskelarver for behandlingene med ulike blandinger av de probiotiske kandidatene og den bakteriefrie behandlingen. P1: *Vibrio* sp.; P3: *Microbacterium* sp.; og P4: *Pseudoalteromonas* sp. Søylene viser antall kopier av *Cyp1a1* per 0,04 µg isolert RNA. Error bars er standard error.

For uttrykk av *Cyp1a1* ved tilsetning av blandinger av bakterier var det ingen signifikante forskjeller mellom behandlinger med levende og døde bakterier, bortsett fra de to behandlingene med P1+P3+P4 (Figur 40), men alle behandlingene gav høyere uttrykk av *Cyp1a1* ved tilsetning av levende bakterier enn ved tilsetning av døde bakterier. Dette gjaldt både ved tilsetning av renkulturer og blandinger av bakterier. Uttrykket av *Cyp1a1* ved tilsats av levende P1+P3+P4 var 2,8 ganger høyere enn ved tilsats av døde bakterier. Sammenligningen av behandlingene tilsatt ulike kombinasjoner av de tre probiotiske kandidatene i levende eller død form, viste at behandlingen med levende P1+P3+P4 gav signifikant høyere uttrykk av *Cyp1a1* enn alle de andre behandlingene bortsett fra behandlingen tilsatt levende P1+P4 (Figur 40).

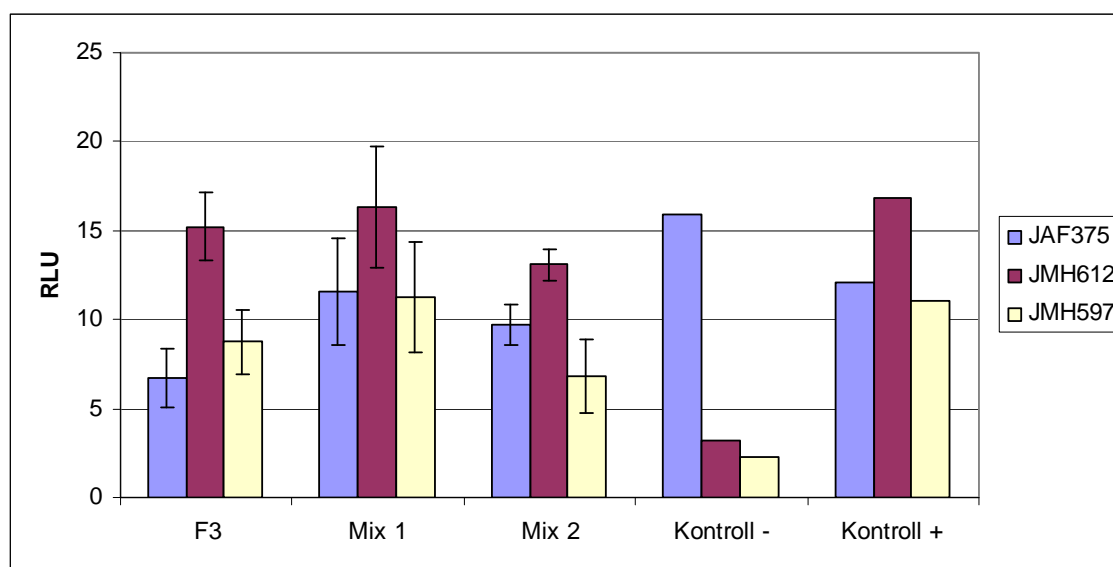
3.2 Forsøk med quorum sensing hemmende kandidater

I de to anrikingsforsøkene ble det forsøkt å anrike bakteriesamfunn fra torskfeces som kan bryte ned autoindusere fra *Vibrio harveyi* eller *Listonella anguillarum*. Bakterienes evne til å bryte ned slike autoindusere ble beregnet ved å undersøke de anrikede bakterienes evne til å redusere bioluminescens i cellefritt vann fra henholdsvis *V. harveyi* og *L. anguillarum*. Dette

ble gjort ved måling av RLU (relative light unit). Lave RLU målinger vil si at det var lite autoindusere igjen i det cellefrie vannet på grunn av at bakteriesamfunnene hadde klart å bryte dem ned.

3.2.1 Nedbryting av autoindusere fra *Vibrio harveyi*

Av bakteriesamfunnene som ble anriket i cellefritt vann fra *V. harveyi* BB120, hadde kun F3, Mix 1 og Mix 2 nok vekst til å kunne tas videre til måling av bioluminiscens (Figur 12).

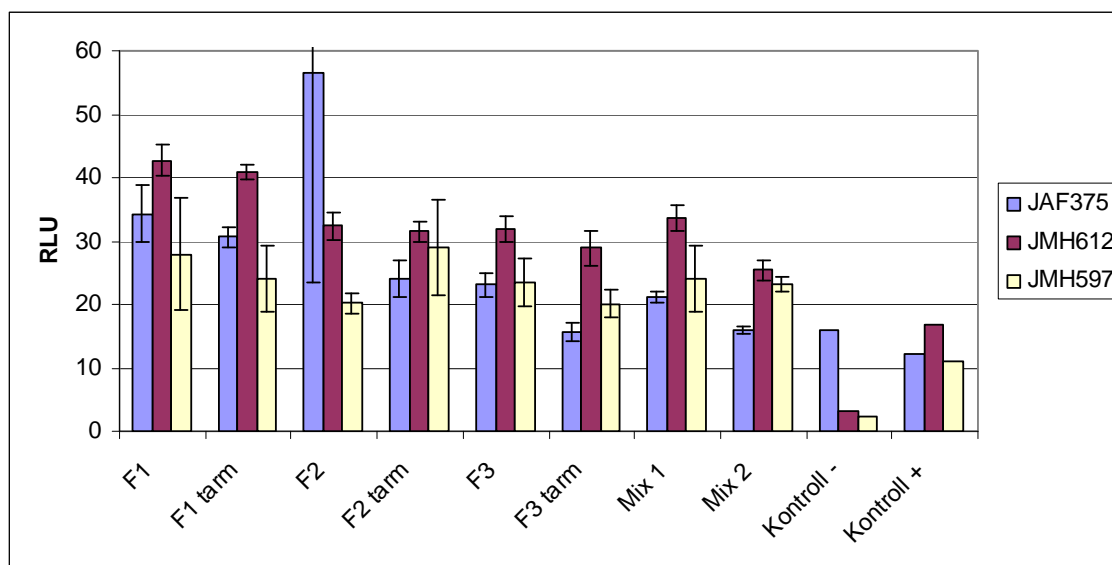


Figur 12 Gjennomsnittlige RLU-målinger (relative light units) for de tre ulike dobbeltmutantene i de ulike behandlingene. Negativ kontroll er dobbeltmutanter i Marine Broth, og positiv kontroll er dobbeltmutanter i cellefritt vann fra *V. harveyi* BB120. Error bars er standard error.

Det var ingen signifikante forskjeller mellom de ulike behandlingene (ANOVA og Tukey's Honestly-Significant-Difference Test). Dette kommer muligens av at variasjonen mellom de ulike replikatene var så stor at det ble vanskelig å påvise forskjeller. For JAF375 var den negative kontrollen høyere enn alle prøvene, mens den for JMH612 og JMH597 var lavere. Den positive kontrollen lå på omtrent samme nivå som prøvene for alle dobbeltmutantene. Bakteriesamfunn Mix 1 og Mix 2 ble likevel brukt videre i korttidsforsøket med quorum sensing nedbrytende kandidater.

3.2.2 Nedbryting av autoindusere fra *Listonella anguillarum*

Alle de ulike bakteriesamfunnene som ble anriket i cellefritt vann fra *L. anguillarum*, ble undersøkt for deres evne til å bryte ned autoindusere fra *L. anguillarum* (Figur 13).



Figur 13 Gjennomsnittlige RLU-målinger (relative light units) for de tre ulike dobbeltmutantene, i de ulike behandlingene. Negativ kontroll var dobbeltmutanter i friskt Marine Broth, og positiv kontroll var dobbeltmutanter i cellefritt vann fra BB120. Error bars er standard error.

Det var ikke noen signifikante forskjeller mellom RLU-målingene i prøvene inokulert med dobbeltmutantene JAF375 eller JMH597 (ANOVA og Tukey's Honestly-Significant-Difference Test). For prøvene som ble inokulert med dobbeltmutanten JMH612, ble noen signifikante forskjeller observert (Tabell 18).

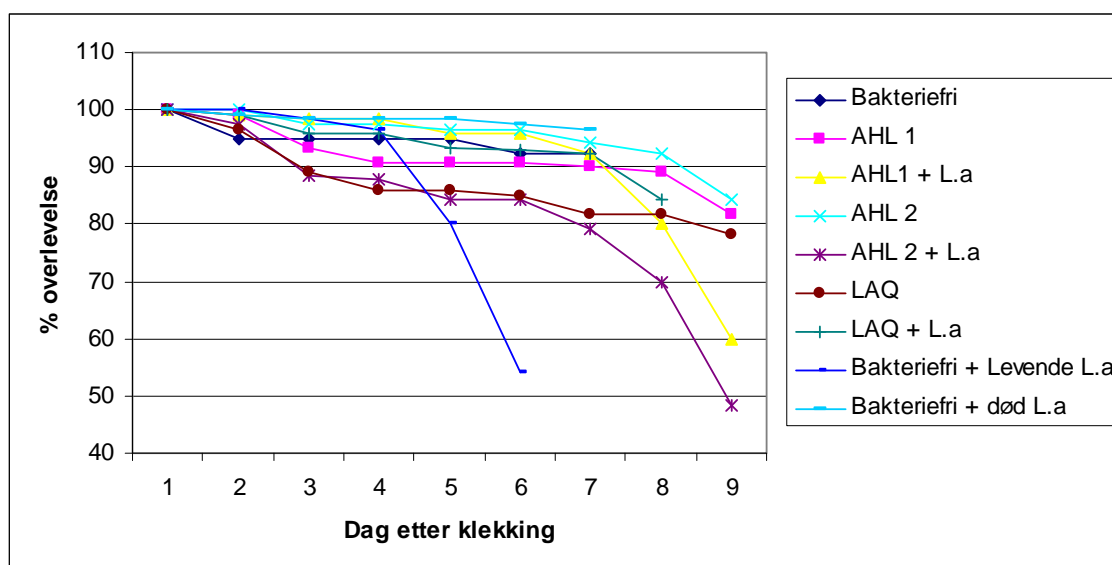
Tabell 18 Resultater etter parvis sammenligning RLU-verdier (Relative Light Units) ved hjelp av Tukey's Honestly-Significant-Difference Test for prøver inokulert med dobbeltmutant JMH612.

Behandling (høy verdi)	Behandling (lav verdi)	P verdi
F1	F2 tarm	0,030
F1	F3 tarm	0,005
F1	Mix 2	0,001
F1 tarm	F3 tarm	0,018
F1 tarm	Mix 2	0,002

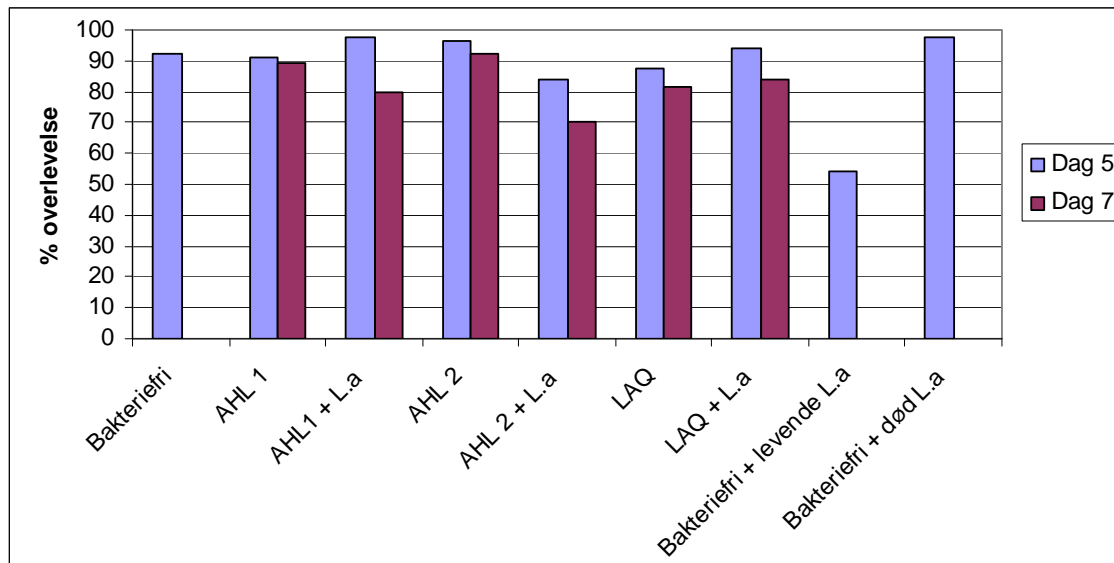
I tillegg hadde alle behandlinger signifikant høyere RLU-verdier enn den negative kontrollen, og alle unntatt F2 tarm, F3 tarm og Mix 2 hadde signifikant høyere verdier enn den positive kontrollen.

3.2.3 Overlevelse for torskelarver

Utviklingen av torskelarvenes overlevelse i løpet av forsøket med quorum sensing nedbrytende kandidater, er presentert i Figur 32, og larvenes prosentvise overlevelse på dag 5 og 7 etter klekking er presentert i Figur 33. For å kunne ta vare på noen av torskelarvene måtte den bakteriefrie behandlingen som ble tilsatt levende *L. anguillarum* avsluttes på dag 5 etter klekking på grunn av at dødligheten ble så høy.



Figur 32 Torskelarvenes prosentvise overlevelse beregnet etter daglige tellinger. *L. anguillarum* ble tilsatt på dag 3 etter klekking.



Figur 33 Torskelarvenes prosentvise overlevelse på dag 5 og 7, beregnet ut fra antall døde torskelarver.

For å finne statistisk signifikante forskjeller mellom de ulike behandlingene, ble det benyttet chi-kvadrat test ($\alpha=0,05$, d.f.=1) på antall døde torskelarver. På dag 5 var det kun signifikante forskjeller mellom den bakteriefrie behandlingen og den bakteriefrie behandlingen tilsatt levende *L. anguillarum* ($P=1,26 \times 10^{-5}$), hvor overlevelsen var høyest i behandlingen uten *L. anguillarum*. Tilsatt av død *L. anguillarum* derimot, hadde ingen innvirkning på overlevelsen hos torskelarvene. Siden *L. anguillarum* induserer økt dødlighet hos torskelarvene viser det at det eksperimentelle oppsettet fungerer og dette er en patogen som kan brukes i en slik ”challenge test”.

For å undersøke om de anrikede bakteriesamfunnene interfererte med *L. anguillarum*, ble den bakteriefrie behandlingen tilsatt levende *L. anguillarum* sammenlignet med behandlingene tilsatt potensielle quorum sensing nedbrytende kandidater og *L. anguillarum*. Overlevelsen i den bakteriefrie behandlingen avtok drastisk raskt (mellom dag 4 og dag 5) etter tilsatt av *L. anguillarum*. For behandlingene med AHL1, AHL2 og LAQ avtok ikke overlevelsen på samme måte før mellom dag 7 og dag 8. Effekten av tilsatt *L. anguillarum* ble altså utsatt i omtrent 3 dager. På dag 5 var det signifikant høyere overlevelse i behandlingene med AHL1, AHL2 og LAQ ($P=4,48 \times 10^{-15}$, $P=4,85 \times 10^{-7}$ og $P=1,46 \times 10^{-12}$) som hadde en overlevelse på omtrent 90% i forhold til den bakteriefrie behandlingen tilsatt levende *L. anguillarum* som hadde en overlevelse på kun 54%. Selv om den bakteriefrie behandlingen tilsatt *L.*

anguillarum ble avsluttet på dag 5 i dette forsøket, kan en ut fra tidligere forsøk anta at den prosentvise overlevelsen for denne behandlingen ville vært lik null på dag 7 etter klekking (Fjellheim 2006a). I behandlingene tilsatt AHL1, AHL2 og LAQ var overlevelsen signifikant høyere enn null på dag 7, og en kan anta at de anrikede bakteriesamfunnene interfererte med *L. anguillarum*s patogene effekt.

AHL1-, AHL2- og LAQ-behandlingene med og uten tilsats av levende *L. anguillarum* ble også sammenlignet. På dag 5 var det signifikante forskjeller i overlevelse med og uten *L. anguillarum* for AHL1 og AHL2 behandlingene (chi-kvadrat test, $\alpha=0,05$, d.f.=1, $P=0,028$ og $P=0,001$). I behandlingene med AHL1, var overlevelsen høyest ved tilsats av *L. anguillarum*, mens det i AHL2 behandlingene var høyest overlevelse uten *L. anguillarum*. For LAQ behandlingene var det ingen forskjell mellom de to behandlingene. På dag 7 var det fortsatt signifikante forskjeller med og uten *L. anguillarum* for AHL2 behandlingene ($P=0,0006$), med høyest overlevelse uten tilsats av *L. anguillarum*. For AHL1 behandlingene var det ikke lenger var noen forskjell.

3.2.4 Kvantifisering av bakterier

Beregning av CFU ble gjort ved avslutning av forsøket ved hjelp av utplating av fortynningsrekker ved avslutning av forsøket (Tabell 22). Ved starten av forsøket ble det tilsatt $1,00 \times 10^6$ CFU/mL. I alle behandlingene bortsett fra behandlingen med LAQ og *L. anguillarum* har bakterietettheten økt fra starten til slutten av forsøket.

Tabell 22 Kvantifisering av bakterier ved utplating av fortynningsrekker ved avslutning av forsøk med quorum sensing nedbrytende kandidater.

Behandling	CFU/mL
AHL 1	$1,57 \times 10^6$
AHL 1 + <i>L. anguillarum</i>	$2,95 \times 10^6$
AHL 2	$2,06 \times 10^6$
AHL 2 + <i>L. anguillarum</i>	$3,84 \times 10^6$
LAQ	$1,45 \times 10^6$
LAQ + <i>L. anguillarum</i>	$0,51 \times 10^6$
Levende <i>L. anguillarum</i>	$2,93 \times 10^4$
Bakteriefri + <i>L. anguillarum</i>	$1,07 \times 10^6$

4 DISKUSJON

4.1 Evaluering av modellsystemet

Dyrkningsflaskene som ble brukt i startfôringsforsøkene var modifisert av PhD student Torunn Forberg til å passe dette formålet. I det første startfôringsforsøket var det problemer med stor dødlighet etter dag 10, og en kunne se at mange av torskelarvene hadde en litt deformert kroppsfasong. Det ble antatt at dette kom av at torskelarvene kræsjet med luftbobler fra luftesystemet og da ble slått i svime eller fikk andre skader. På dag 10, da larvene går fra plommesekkstadiet over til utelukkende eksogent matinntak, ble påkjennelsen for de skadde larvene for stor til at de klarte å overleve. I startfôringsforsøk nummer to ble det laget et nett rundt luftesystemet slik at torskelarvene ikke kunne være i nærheten av luftboblene. På denne måten fikk en sannsynligvis hindret ugunstige skader på larvene og mengden deformerte larver i flaskene ble redusert. Dette var mest sannsynlig årsaken til at dødligheten på dag 10 i forsøk nummer to var kraftig redusert i forhold til det første forsøket.

Fra det første startfôrings- og korttidsforsøket med levende og døde probiotiske kandidater, ble det ingen resultater, da de aller fleste flaskene var kontaminerte. Årsaker til kontamineringen kan være at eggene ikke var helt bakteriefrie ved starten av forsøket, eller dårlige rutiner og håndtering av utstyr under sterilarbeid. I forsøk 1 ble eggene behandlet med glutaraldehyd kun en gang, mens de i forsøk nummer to ble desinfisert en gang før ankomst, og deretter gjort bakteriefrie ved ankomst, og i forsøk nummer to var det ikke problemer med kontamineringer. Dette viser at metoden som ble brukt til å få bakteriefrie torskelarver (Salvesen et al. 1995; Salvesen et al. 1997) fungerte godt, men kun dersom eggene er desinfisert en gang før eggene gjøres bakteriefrie.

Samme type startfôringsforsøk med torskelarver er tidligere foretatt med litt andre resultater. I forsøket fra Fjellheim et al. (2006a) ble de samme probiotiske kandidatene benyttet, men uten en bakteriefri behandling. Den positive kontrollen i det aktuelle forsøket var ikke-sterilisert vann, noe som gav en overlevelse hos torskelarvene som var lavere enn overlevelsen ved tilsettelse av de probiotiske kandidatene. I denne oppgaven var den positive kontrollen en bakteriefri behandling som gav høyere overlevelse enn ved tilsats av bakterier. Det er mulig at den bakteriefrie behandlingen gav torskelarvene så gode forhold med så lite stress at

overlevelsen ble kunstig høye i forhold til det som er normalt. På grunn av dette burde det muligens vært en behandling med modent vann i forsøkene her også, slik at man på den måten kan se hvilken effekt den bakteriefrie behandlingen har på torskelarvene.

I startfôringsforsøket var det i utgangspunktet 3 biologiske replikater av hver behandling, men på grunn av kontamineringer ble det til slutt kun én parallell av den bakteriefrie behandlingen, og behandlingen med døde bakterier (DM), og to paralleller av behandlingen med levende bakterier (LM1 og LM2). Det viste seg at de to parallellene gav relativt ulike resultater. Når det gjelder overlevelse og vekst var det ikke signifikante forskjeller mellom LM1 og LM2, men det var større og signifikant forskjell mellom LM1 og DM, enn det var mellom LM2 og DM. Ved kvantifisering av genuttrykk var forskjellen mellom de to parallellene ofte stor, men store standardavvik bidro til at forskjellen ikke var signifikant bortsett fra for *Cypl1a1*.

Ved kvantifisering av bakterier i de ulike behandlingene var det ikke så store forskjeller mellom de to parallellene og CFU-målingene som ble tatt ved avslutningen av forsøket var svært like. I følge disse målingene hadde bakterietettheten holdt seg relativt stabilt siden starten av forsøket. Flow cytometri-målingene som ble tatt i løpet av forsøket derimot, viste at celletallet steg utover i forsøket og at det i LM1-behandlingen var høyere enn i LM2-behandlingen ved de to siste målingene. At celletallet øker utover i forsøket er naturlig, da både alger og bakterier vil formere seg som en respons til næringsstoffer og organisk materiale som dannes i flaskene. For å redusere mengden organisk materiale ble døde torskelarver og overskudd av alger fjernet jevnlig under forsøket. Dette er kanskje grunnen til at bakterietettheten ikke ble enda høyere. Mengden av ammonia i vannet ved avslutningen av forsøket var en del høyere i LM1-behandlingen enn i LM2-behandlingen. Ammonia er et biprodukt fra fordøyelse av proteiner og det viktigste nitrogenholdige avfallsstoffet fisk skiller ut (Masser et al. 1999). Både ammonia og nitritt er giftig for fisk og selv om sensitiviteten for nitrogen hos fisk er artsspesifikk, anbefaler Masser et al. (1999) at total ammonia holdes under 1 mg/L, at nivået av nitritt holdes under 0,5 mg/L, og at uionisert ammonia holdes på et nivå under 0,05 mg/L. I LM1-behandlingen var total ammonia over 1 mg/L noe som kan ha påvirket torskelarvenes genuttrykk.

Ut fra resultatene over kan det se ut til at de fysiske forholdene i flaskene var så ulike at dette hadde så stor innvirkning på torskelarvene at effekten av de tilsatte bakteriene ble forstyrret. Grunner til dette er vanskelig å fastslå, men ujevn lysfordeling kan være en av årsakene. Det

burde kanskje også vært målt pH under forsøket da mengden av uionisert ammonia, som er svært giftig for fisk, er avhengig av både pH og temperatur. Fisk kan tåle pH fra 6,0 til 9,5, men en rask endring i pH på to enheter eller mer er skadelig for fisk, spesielt for larver. Masser et al. (1999) foreslår at pH bør ligge mellom 7,0 og 8,0 for optimale forhold. For startfôringsforsøket vil det være vanskelig å ha mindre systemer, men for korttidsforsøkene vil det muligens være bedre å satse på å ha brønner med en og en fisk i. På den måten blir forholdene mer like og det blir lettere å ha flere biologiske replikater. Det blir også lettere å holde oversikten over torskelarvenes dødlighet.

I det første korttidsforsøket ble *Roseobacter* sp. linje RA4-1 brukt som en potensiell probiont. Denne linja var tidligere blitt brukt i forsøk med torskelarver med gode resultater når det gjaldt overlevelse (Fjellheim et al. 2006a). I det første korttidsforsøket ble overlevelsen relativt lav, og det ble problemer med for høy bakterievekst i flaskene og *Roseobacter* sp. linje RA4-1 ble byttet ut med *Pseudoalteromonas* sp. linje RA7-14 i korttidsforsøk nummer to. *Roseobacter* sp. linje 27-4 har blitt brukt i forsøk med piggvarlarver utsatt for *L. anguillarum* (Planas et al. 2006), med relativt gode resultater. Men i det aktuelle forsøket hadde de problemer med at vannet ble turbid på grunn av høy bakterievekst ved tilsats av høye konsentrasjoner av bakterier og ved tilsats av Marine Broth supernatant. I korttidsforsøkene i denne oppgaven ble bakteriene tilsatt sammen med Marine Broth. Planas et al. (2006) antar at næringsstoffene i Marine Broth mediet fremmet vekst av opportunistiske patogene bakterier som for eksempel Vibrionaceae i vannet, og at dette førte til økt dødlighet hos piggvarlarvene. Dette kan også ha vært tilfellet i dette korttidsforsøket, da alle flaskene var kontaminerte med ikke-identifiserte bakterier. I det andre korttidsforsøket ble samme framgangsmåte benyttet, men da var *Roseobacter* sp. byttet ut med *Pseudoalteromonas* sp., og det ble da ingen problemer med turbiditet i flaskene. I senere forsøk bør kanskje bakteriene fjernes fra Marine Broth og heller løses i for eksempel FASV før de tilsettes.

4.2 Effekt av levende og døde probiotiske kandidater på torskelarver

4.2.1 Overlevelse hos torskelarver

I et tidligere forsøk ble det konkludert med at formalininaktiverte probiotiske celler brukt som fôrtilskudd hadde en fordelaktig effekt på regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) med byller (furunculosis) (Irianto et al. 2003). Positive effekter av døde celler kunne ikke observeres i

forsøkene som ble utført i denne oppgaven. For de fleste behandlingene gav tilsats av levende probiotiske kandidater redusert overlevelse i forhold til tilsats av døde probiotiske kandidater, mens tilsats av døde bakterier ikke gav noen effekt i forhold til den bakteriefrie kontrollbehandlingen. Dette gjaldt både for korttids- og startfôringsforsøket. Resultatene fra forsøket utført her stemmer overens med et forsøk utført av Taoka et al. (2006). I det aktuelle forsøket ble tilapia (*Oreochromis niloticus*) infisert med *Edwardsiella tarda* behandlet med levende og døde probiotiske celler. Den probiotiske behandlingen førte blant annet til forbedret ikke-spesifikt immun system og økt overlevelse, men det ble konkludert med at bruken av levende probiotiske celler hadde best effekt og at cellene var levende spilte en viktig rolle. I et forsøk utført av Marques et al. (2005) ble det vist at døde bakterier hadde en positiv effekt på overlevelsen hos *Artemia franciscana*, men kun dersom det ble benyttet levende fôr av lav eller medium kvalitet. I denne oppgaven ble det brukt levende fôr av høy kvalitet, noe som kan være grunnen til at døde bakterier ikke påvirker overlevelsen her.

I en review diskuterer Verschuere et al. (2000) ulike måter probiotiske bakterier kan påvirke organismer innen akvakultur. Eksempler på dette kan være følgende: konkurranse om kjemikalier eller tilgjengelig energi; konkurranse om bindingssteder; forbedring av vertens immunrespons; forbedring av vannkvaliteten; interaksjon med fyttoplankton; kilde til makro- og mikronæringsstoffer; og enzymatisk bidrag til fordøyelsen (Verschuere et al. 2000). Alt dette, muligens med unntak av forbedring av immunresponsen og kilde til næringsstoffer, krever levende og aktive bakterier. Det er derfor logisk at levende probiotiske celler har større effekt på for eksempel vertens overlevelse enn døde celler.

Resultatene indikerer at døde bakterier ikke har noen positiv innvirkning på torskelarvenes overlevelse, og at bakteriene må være levende for å ha en eventuell probiotisk effekt. Det at tilsetning av levende probiotiske kandidater i dette forsøket førte til redusert overlevelse i forhold til den bakteriefrie kontrollen i de fleste behandlingene trenger ikke bety at kandidatene ikke har probiotiske effekter. De samme probiotiske kandidatene ble brukt av Fjellheim et al. (2006a) med gode resultater i forsøk hvor negativ kontroll var behandling med *L. anguillarum* og positiv kontroll var ikke-sterilisert vann (modent vann). Med hensyn til den negative kontrollen stemmer resultatene fra Fjellheim et al. (2006a) sitt forsøk godt overens med forsøkene utført i denne oppgaven, men en burde også i denne oppgaven hatt en behandling med modent vann.

4.2.2 Kvantifisering av genuttrykk hos torskelarver fra startfôringsforsøk

Rawls et al. (2004) gnotobiotiske zebrafisk (*Danio rerio*) til å finne evolusjonært konserverte responser på fiskens tarmbakterier. Homologer til åtte av genene som var sterkt opp- eller nedregulert i det aktuelle forsøket ble her kvantifisert for torskelarver. Genene som ble undersøkt i forsøket til Rawls et al. (2004) var involvert i blant annet næringsmetabolisme, xenobiotisk metabolisme og immunresponser.

Fiaf og *Fdps* er begge gener som er involvert i fiskens næringsmetabolisme, henholdsvis lipidnedbryting og isoprenoidbiosyntesen. Hos zebrafisk var uttrykket av *Fiaf* oppregulert i bakteriefrie fisk i forhold til i fisk som hadde hatt bakterier i sine omgivelser (Rawls et al. 2004), og i følge Rawls et al. (2004) var det samme tilfellet i forsøk med gnotobiotiske mus. Dette impliserer at de bakteriefrie fiskene har redusert evne til å ta opp næringsstoffer fordi de ikke klarer å ta opp energikilder i maten som normalt frigjøres av prosesser relatert til bakterier i tarmen, og metabolismen minner om metabolismen under en fasteperiode (Bates et al. 2006; Rawls et al. 2004). Hos torskelarvene fra startfôringsforsøket derimot ble uttrykket oppregulert hos larvene fra behandlingen med levende *Microbacterium* sp. i forhold til larvene fra den bakteriefrie behandlingen og behandlingen med døde *Microbacterium* sp. Men uttrykket var også oppregulert i larvene fra den bakteriefrie behandlingen i forhold til uttrykket av β -actin. Ut fra dette ser det ut til at *Microbacterium* sp. ikke bidrar til torskelarvenes næringsmetabolisme og at bakteriene kanskje bidrar til økt stress slik at larvenes evne til å ta opp næringsstoffer ble redusert i forhold til den bakteriefrie behandlingen. Uttrykket av *Fdps* i zebrafisk og mus (Rawls et al. 2004) var oppregulert i fisk og mus fra behandlinger med bakterier i forhold til bakteriefrie organismer. Dette var også tilfellet i dette forsøket, selv om det på grunn av store standardavvik ikke var signifikante forskjeller. Ut fra resultatene konkluderte Rawls et al. (2004) med at kolesterolmetabolismen reguleres av mikrobiota i både zebrafisk og mus, og dette ser ut til å stemme hos torskelarver også.

Cyp11a1 er involvert i fiskens xenobiotiske metabolisme (Rawls et al. 2004). Det vil si metabolske spor som modifierer forbindelser som ikke er en naturlig del av en organismes biokjemi (xenobiotika), og som kan være giftige for organismen (Oxford Biochemical Research 2009). Rawls et al. (2004) hevder at uttrykket av *Cyp11a1* bør være høyere i

bakteriefrie fisk, da mikrobiota også deltar i nedbryting av xenobiotika. I denne oppgaven ble uttrykket av genet høyest for torskelarver fra den ene behandlingen med levende *Microbacterium* sp., og uttrykket var også høyere i larvene fra behandlingen med døde bakterier enn den bakteriefrie behandlingen. Det er blitt vist at uttrykket av dette genet oppreguleres dersom mus utsettes for enkelte miljøgifter (Denison et al. 1995). Grunnen til at uttrykket av genet er oppregulert i LM2-behandlingen, kan skyldes at torskelarvene reagerer på forbindelser bakteriene produserer, selv om LM1-behandlingen ikke gav et oppregulert uttrykk av genet. Siden torskelarvene fra DM-behandlingen også viste et høyere uttrykk av *Cyp1a1* enn larvene fra den bakteriefrie behandlingen, kan det også være bestanddeler i bakteriene torskelarvene responerer på. Ut fra torskelarvenes overlevelse gjennom forsøket, kan det se ut til at larvene reagerer negativt på tilsetning av både levende og døde bakterier, og at levende bakterier gir mest respons også på dette området.

C3 og *Gpx2* er gener som er involvert i organismers medfødte immunresponser. *Gpx2* koder for et protein som er involvert i beskyttelse mot oksidativt stress, og *C3* koder for complement component 3, som er viktig i aktiveringen av komplementsystemet (Goldsby et al. 2003). Det er vist at uttrykket av disse genene er lavere både i bakteriefrie zebrafisk (Rawls et al. 2004) og mus (Esworthy et al. 2003) enn i dyr eksponert for bakterier. Dette var ikke tilfellet i denne oppgaven. Her var uttrykket av begge genene høyest i torskelarvene fra den bakteriefrie behandlingen, og lavest hos larvene fra DM-behandlingen. *CLECT* koder for serum lektin, som også er involvert i fiskens immunresponser. Hos fisk har en funnet lektin i serum, mukus og egg, og det har blitt vist at lektinene kan reagere med en rekke ulike patogener og det antas at de bidrar til vertens medfødte immunforsvar (Fock et al. 2000; Ottinger et al. 1999). Levende, patogene bakterier i torskelarvenes omgivelser vil da sannsynligvis føre til at uttrykket av *CLECT* øker i forhold til bakteriefrie behandlinger eller behandlinger med døde bakterier. I dette forsøket var det ingen signifikante forskjeller mellom de ulike behandlingene, men uttrykket fra LM2-behandlingen var en del høyere enn de andre behandlingene. Det kan da bety at *Microbacterium* sp. forårsaket en respons som førte til økt uttrykk av genet i denne behandlingen selv om denne bakterien i utgangspunktet ikke skulle ha en patogen virkning på larvene. Dette stemmer også godt overens med overlevelsesresultatene og uttrykket av *Cyp1a1* som også tilsier at *Microbacterium* sp. har en negativ effekt på torskelarvene.

WARS er et gen som koder for tryptofanyl-tRNA syntetase, som katalyserer aminoacyleringen av tRNA_{trp} med tryptofan noe som er en viktig funksjon i cellas proteinsyntese. I startfôringsforsøket ble det ingen signifikante forskjeller i uttrykket av dette genet mellom de ulike genene, men uttrykket var lavest i behandlingen med døde *Microbacterium* sp. og det var oppregulert i forhold til β -actin for alle behandlingene. *Itgb1bp3*, som koder for integrin β -1-binding protein 3, har samme uttrykksmønster som *WARS*, men her var det signifikante forskjeller mellom de to LM-behandlingene og DM-behandlingen. Integriner er reseptorer som sender signaler begge veier over plasmamembranen, og har slik en innvirkning på mange av cellas viktige prosesser. Dette inkluderer formering, bevegelse og overlevelse (Goldsby et al. 2003; Hervy et al. 2006). Homologer av genet er funnet både hos mus, menneske og kylling i tillegg til hos zebrafisk. Hos mus og mennesker er det vist at dette proteinet har evne til blant annet binding av ATP, kinase aktivitet, binding av proteiner og transferase aktivitet (NCBI 2009b). Mange medlemmer av integrin β -1 familien er involvert i celleadhesjon i utvikling av muskler (Li et al. 1999) og det er en mulighet for at proteinet *Itgb1bp3* koder for binder slike integriner. Uttrykket av *WARS* og *Itgb1bp3* indikerer da at torskelarvene hadde høy proteinsyntese og muskelutvikling, noe som stemmer godt da de var i en utviklings- og voksefase. At uttrykket var relativt likt i de fleste behandlingene impliserer at veksten var like stor hos alle torskelarvene bortsett fra larvene fra DM-behandlingen noe som stemmer godt overens med resultatene fra lengdemålingene, hvor det var signifikant forskjell mellom LM1- og DM-behandlingen.

4.2.3 Kvantifisering av genuttrykk hos torskelarver fra korttidsforsøk

Ved kvantifisering av genene *C3* og *Cyp1a1* i torskelarver fra behandlingene med monokulturer av bakterier, ble uttrykksmønsteret omtrent det samme for begge gener. Begge genene var høyere uttrykt i behandlingene med levende bakterier i forhold til behandlingene med døde bakterier. Uttrykket for begge gener er høyest i behandlingene med levende *L. anguillarum* og *Pseudoalteromonas* sp. Både *C3* og *Cyp1a1* er gener som er involvert i fiskens forsvarssystem, og med tanke på at både *L. anguillarum* og *Pseudoalteromonas* sp. førte til lave overlevelsestall, er det logisk at genene er høyest uttrykt i torskelarvene fra disse behandlingene. Dessverre viste det seg at behandlingene med levende *Pseudoalteromonas* sp. var kontaminert, så om det er *Pseudoalteromonas* sp. eller kontamineringene som førte til det høye uttrykket er vanskelig å si noe om.

For *C3* var uttrykket i behandlingen med død *L. anguillarum* høyere enn i den bakteriefrie kontrollbehandlingen og behandlingene med levende bakterier. Dette kan bety at *L. anguillarum* innehar bestanddeler som er med på å trigge immunsystemet til torskelarvene uavhengig av om bakteriene er aktive/levende eller ikke. For *Cyplal* er dette ikke tilfellet, noe som tilsier at bakteriene må være levende for å ha innvirkning på den xenobiotiske metabolismen, og at det sannsynligvis er forbindelser bakteriene produserer torskelarvene responderer på.

Det samme kan en også se igjen for behandlingene med flere typer bakterier. For *C3* er uttrykket mye høyere i torskelarvene fra behandlingene med død P1+P4 (henholdsvis *Vibrio* sp. og *Pseudoalteromonas* sp.) og død P3+P4 (henholdsvis *Microbacterium* sp. og *Pseudoalteromonas* sp.) enn i torskelarvene fra de andre behandlingene, mens det for *Cyplal* er høyest i torskelarvene fra behandlingene med levende bakterier. Dette gir også en indikasjon på at uttrykk av *C3* kan induseres av bestanddeler av bakteriene, mens *Cyplal* får et høyere uttrykk på grunn av forbindelser som bakteriene produserer.

4.3 Forsøk med quorum sensing hemmende kandidater

4.3.1 Effekt av quorum sensing hemmende kandidater på overlevelse hos torskelarver

I denne oppgaven ble gnotobiotiske torskelarver brukt som testorganisme. På denne måten ble bakteriesamfunn som var naturlig til stede i torskelarvenes miljø eliminert, og kunne derfor ikke ha noen effekt på quorum sensing systemet til *L. anguillarum*. All eventuell nedbryting av quorum sensing signaler ble derfor utført av tilsatte bakteriesamfunn. *L. anguillarum* er en kjent, patogen bakterie som finnes i de fleste marine fiskearter og i deres omgivelser. Bakterien har et quorum sensing system som minner om systemet hos *V. harveyi*, og styrer blant annet produksjon av metalloprotease, pigment og dannelse av biofilm (Milton et al. 1992; Milton et al. 1997; Croxatto et al. 2002; Croxatto et al. 2004). *L. anguillarum* har en negativ effekt på overlevelsen hos blant annet piggvarlarver (Munro et al. 1995; Sugita et al. 2008). Dette stemmer godt overens med resultatene i dette forsøket. Overlevelsen hos torskelarvene sank drastisk etter tilsats av levende *L. anguillarum* til i utgangspunktet bakteriefrie torskelarver. Tilsats av død *L. anguillarum* derimot, hadde ingen effekt på

torskelarvenes overlevelse. En kan da anta at bakterien må være aktiv for å ha en patogen innvirkning på torskelarvene.

Det har blitt vist at torskelarvers toleranse mot infeksjon av *L. anguillarum* kan økes ved hjelp av probiotiske bakterier (Taoka et al. 2006). I behandlingene med quorum sensing nedbrytende kandidater, og *L. anguillarum*, kan en se en tendens til at effekten av *L. anguillarum* ble utsatt i tre til fire dager i forhold til den bakteriefrie behandlingen tilsatt *L. anguillarum*. Dette gjelder både for LAQ-, AHL1- og AHL2-behandlingen. Det er rimelig å anta at dette kommer av at bakteriesamfunnene som ble tilsatt, bryter ned quorum sensing signaler fra *L. anguillarum* og på den måten forstyrrer bakterienes kommunikasjon. *L. anguillarum* må derfor oppnå en høyere populasjonstetthet før den får sin patogene effekt, enn tilfellet er dersom bakterien opptrer alene eller med bakterier som ikke bryter ned quorum sensing signalene.

I et tidligere forsøk ble det vist at probiotiske mikroorganismer isolert fra *Sparus aurata* (gilthead seabream) økte overlevelsen hos fisk utsatt for *L. anguillarum* (Chabrilion et al. 2006). Dette skjedde ved at probiotene utkonkurrerte *L. anguillarum* med hensyn til festesteder i fiskens mukus. Det kan være tilfellet at dette også har skjedd i denne oppgaven, og at effekten av de anrikede bakteriesamfunnene ikke kommer av deres nedbryting av *L. anguillarum*'s quorum sensing signaler. I et annet forsøk med probionter og ulike patogene bakterier ble det konkludert med at probiontene hindret de patogene bakterienes mulighet til å feste seg i fiskens mukus kun dersom probiotene ble tilsatt etter de patogene bakteriene (Vine et al. 2004b). Dersom probiontene ble tilsatt først var det de som ble utkonkurrert. I denne oppgaven ble de anrikede bakteriesamfunnene tilsatt før *L. anguillarum* og en kan på grunn av dette anta at deres effekt på torskelarvenes overlevelse ikke hadde noe med konkurranse om festesteder i mukus å gjøre.

Det har tidligere blitt vist at AHL-degraderende bakterier kan øke overlevelsen hos piggvar både ved tilsatt av bakterier direkte i vannet, og ved innkapsling av bakterier i rotatorier som ble brukt som levende fôr (Tinh et al. 2008). Dette ble ikke resultatet i denne oppgaven ved tilsatt av de ulike potensielle quorum sensing nedbrytende kandidatene alene. Torskelarvenes overlevelse ble da ikke endret i verken negativ eller positiv retning i forhold til den bakteriefrie behandlingen. Det er mulig at den bakteriefrie behandlingen øker overlevelsen i

forhold til naturlige systemer og at bakteriene kunne hatt en positiv effekt i et system med modnet vann.

4.3.2 Anriking av quorum sensing hemmende kandidater

Isoleringen av quorum sensing nedbrytende kandidater var basert på evnen bakteriesamfunn fra torskefeces hadde til å vokse i et næringsfattig medie med en blanding av AHL-molekyler som karbon- og nitrogenkilde. Prosedyren som ble brukt var lik den som ble brukt av Tinh et al. (2007c). Ved AHL-anriking av bakteriesamfunn fra torskefeces, var det svært vanskelig å få tette kulturer i anrikingsmediet. Hver syklus i anrikingen ble derfor utvidet fra å vare i 24 timer som det var i den opprinnelige protokollen, til å vare i 48 timer. Dette gjorde at biomassen steg litt, men det var fortsatt nødvendig å dyrke opp bakteriene i Marine Broth før luminisensassayet kunne gjennomføres. En mulig løsning på problemet med lav vekst i anrikingsmediet, kan være å tilsette natriumacetat som karbonkilde i tillegg til AHL forbindelsene som så blir bakterienes nitrogenkilde. Ved anriking i cellefritt vann fra *L. anguillarum* var veksten bedre.

I forsøket med AHL-nedbrytende bakterier, var det ingen signifikante forskjeller mellom RLU-målingene i de ulike prøvene. Den negative kontrollen for dobbeltmutantene JMH612 og JMH597 som detekterer henholdsvis HAI-1 og AI-2 var lavere enn behandlingene, men store variasjoner mellom replikatene og derfor store standardavvik førte til at disse forskjellene ikke var statistisk signifikante. For å unngå dette bør en ha flere replikater, for slik å øke nøyaktigheten på middelverdien slik at resultatene blir statistisk riktige. For dobbeltmutanten JAF375 som detekterer CAI-1 er den negative kontrollen høyere enn både den positive kontrollen og behandlingene, noe som gjør målingene svært usikre. Den positive kontrollen var ikke signifikant høyere enn behandlingene for noen av dobbeltmutantene. Dette kan skyldes at de tilsatte bakteriesamfunnene ikke bryter ned autoinduserene, men det kan også skyldes at RLU målingene ble påvirket av Marine Broth i behandlingene noe verken positiv eller negativ kontroll inneholdt. Til tross for at det ikke var noen signifikante forskjeller mellom de ulike behandlingene, ble de anrikede samfunnene Mix1 og Mix2 (kalt henholdsvis AHL1 og AHL2) likevel brukt videre i torskeforsøk på grunn av at disse hadde best vekst under anrikingen.

I forsøket med *L. anguillarum* autoinduser-nedbrytende bakterier, var det kun signifikante forskjeller mellom de ulike behandlingene for dobbeltmutanten JMH612 som detekterte HAI-1. For JMH612 gav nesten alle behandlingene signifikant høyere luminescens enn både negativ og positiv kontroll. Dette indikerer at autoinduserene fra *L. anguillarum* mest sannsynlig ikke brytes ned av de anrikede bakteriesamfunnene, eller at de produserer sine egne autoindusere som fører til økt luminescens hos dobbeltmutantene. Det har blitt fastslått at enkelte bakterier som produserer AHL-nedbrytende enzymer, også kan produsere AHL-molekyler selv (Gonzalez et al. 2006), noe som kan være tilfellet hos bakteriesamfunnene brukt i dette forsøket. Det kan også ha vært rester av Marine Broth i prøvene som forstyrret målingene. Tendensen var likevel at Mix 2 (kalt LAQ) gav lavere luminescens hos dobbeltmutanten JMH612 enn de andre prøvene som ble målt, og det ble derfor besluttet å bruke denne prøven videre selv om det er vanskelig å vite hvorfor RLU-målingene ble lavere hos denne mutanten.

Fordi at variasjonen mellom replikatene var så stor, burde det blitt foretatt flere replikate målinger for slik å øke nøyaktigheten på middelverdien (reducerer standard error). En mulig grunn til at replikatene ble så forskjellige kan være feilpipettering ved overføring av anrikede bakteriesamfunn eller dobbeltmutanter.

4.4 Forslag til videre arbeid

Etter de første forsøkene som ble kontaminerte, ble det forsøkt å isolere 16S DNA fra bakterier i torskelarvene for så å kjøre DGGE på disse prøvene for å forsøke å identifisere hvilke bakterier som var tilstede. Alle prøvene bortsett fra den blanke og renkulturen av *Vibrio* sp. delte svært mange bånd på DGGE gelen, noe som kan bety at alle prøvene var kontaminert av samme type bakterier. Men ved BLAST undersøkelser av primerene som ble brukt viste det seg at disse også amplifiserte DNA sekvenser fra torsk. Siden alle prøvene sannsynligvis inneholdt mye mer DNA fra torsk enn fra bakterier er muligheten stor for at de felles båndene stammer fra torsken og ikke bakteriene. En bør altså designe nye primere som ikke amplifiserer torske-DNA, for så å kjøre DGGE på prøver fra de ulike behandlingene.

Det bør også kjøres DGGE på prøver fra anrikingsforsøkene for så å identifisere hvilke bakterier som er tilstede for eksempel ved hjelp av sekvensering. Selve anrikingsforsøket bør også gjentas med tilsats av natriumacetat for å få bedre vekst i anrikingsmediet. Deretter bør

det gjennomføres korttidsforsøk med quorum sensing nedbrytende kandidater hvor det brukes brønner med en og en fisk i stedet for flasker med 30 fisk. Forholdene vil da antageligvis bli mer identiske enn ved bruk av flasker, og det vil bli lettere å få god oversikt over larvenes overlevelse. Dette gjelder også korttidsforsøk med levende og døde probiotiske kandidater. I framtidige forsøk bør en i tillegg til den bakteriefrie kontrollbehandlingen, ha en kontrollbehandling med modnet vann, for å se hvordan larvene responderer på mer naturlige omgivelser.

Når det gjelder korttidsforsøk med quorum sensing nedbrytende kandidater hadde det også vært interessant å kvantifisere genene som er involvert i torskelarvenes immunresponser for å se om de tilsatte bakteriesamfunnene har en innvirkning på uttrykket av disse genene. Ved senere qPCR forsøk bør antallet tekniske replikater økes for å forsøke å redusere standard error.

5 KONKLUSJON

Modellsystemet som ble brukt i denne oppgaven ble designet og modifisert av PhD student Torunn Forberg. Flaskene på 2 L med 30 torskelarver L^{-1} gav godt håndterbare systemer som det var mulig å holde bakteriefrie gjennom hele forsøket, og metoden som ble brukt for å få bakteriefrie torskelarver (Salvesen et al. 1995; Salvesen et al. 1997) fungerte godt da eggene var desinfisert en gang ankomst og egner seg bra til denne typen forsøk. Resultatene viste likevel at det var store forskjeller mellom behandlinger som i utgangspunktet skulle være like. For å forsøke å hindre dette bør flaskene flyttes minst mulig, og lys og lufting bør være konstant og likt i alle flasker.

Ut fra resultatene kan de se ut til at den bakteriefrie behandlingen gir torskelarvene for gode betingelser i forhold til det som er naturlig, og sammenligninger mellom den bakteriefrie behandlingen og behandlinger med monokulturer blir derfor usikre, og det blir vanskelig å bedømme om en probiotisk kandidat virkelig har en probiotisk effekt eller ikke. På grunn av dette bør en ha en kontrollbehandling med modent vann slik at man kan sammenligne behandlinger med monokulturer med så naturlige forhold som mulig. Fremtidige korttidsforsøk bør gjennomføres med brønner med en og en larve, slik at torskelarvenes omgivelser blir så identiske som mulig. En kan på denne måten også få flere replikater av hver behandling, uten at arbeidsmengden blir så mye større.

Forsøket med quorum sensing hemmende kandidater og *L. anguillarum* viste at bakteriesamfunnene, som var anrikt med cellefritt vann fra *L. anguillarum* eller AHL-molekyler, fra torskedefeces hadde en tendens til å utsette den patogene effekten av *L. anguillarum* i inntil 3 dager. Torskelarvene fra behandlingen med kun levende *L. anguillarum* døde raskt etter tilsetning av den patogene bakterien, mens torskelarvene fra behandlingene tilsatt anrikede bakteriesamfunn i tillegg til *L. anguillarum* hadde samme overlevelse som torskelarvene fra den bakteriefrie behandlingen til 3 dager etter tilsetning av *L. anguillarum*. Ved tilsetning av bakteriesamfunnene alene uten challenge fra *L. anguillarum* hadde de ingen effekt på torskelarvenes overlevelse. En kan da konkludere med at de anrikede bakteriesamfunnene i utgangspunktet ikke hadde en probiotisk effekt på torskelarvene, men at de sannsynligvis kan bryte ned signalmolekyler som *L. anguillarum* bruker i sitt quorum

sensing system. På den måten har de en positiv effekt på torskelarvenes overlevelse, da det tar lengre tid før *L. anguillarum* sin patogene effekt inntreffer.

Det ble utført både korttids- og startfôringsforsøk hvor det ble benyttet levende og døde probiotiske kandidater. Resultatene etter beregning av torskelarvenes overlevelse viste at torskelarvenes respons var større ved tilsats av levende bakterier enn ved tilsats av døde bakterier. Dette gjaldt både *Pseudoalteromonas* sp. og *L. anguillarum*, som gav lavere overlevelse ved tilsats av levende bakterier enn ved tilsats av døde bakterier. Ved tilsats av døde bakterier var det ingen signifikante forskjeller mellom behandlingene med døde bakterier og de bakteriefrie behandlingene. Dette indikerer at disse bakteriene må være levende for å ha en effekt på torskelarvene. Ved tilsats av *Microbacterium* sp. ble overlevelsen lavere enn i den bakteriefrie behandlingen også ved tilsats av døde bakterier, og det ble konkludert med at *Microbacterium* sp. har en negativ effekt i stedet for en probiotisk effekt hvis den tilsettes som monokultur.

Etter kvantifisering av genuttrykk for 8 ulike gener hos torskelarvene fra startfôringsforsøket og to gener hos larvene fra korttidsforsøket med levende og døde probiotiske kandidater, ble det konkludert med at torskelarvenes respons var, med enkelte unntak, høyere ved tilsats av levende bakterier enn ved tilsats av døde bakterier. Dette gjaldt både for startfôrings- og korttidsforsøket. Ut fra dette kan en også her konkludere med at bakteriene må være levende for å ha en effekt på torskelarvene. I de fleste tilfeller var uttrykket av de ulike genene også høyere hos torskelarvene fra den bakteriefrie behandlingen enn hos larvene fra behandlingene med døde bakterier, noe som kan indikere at den bakteriefrie behandlingen gir så høy respons hos torskelarvene, at en heller burde hatt en kontrollbehandling med modna vann.

LITTERATURLISTE

- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Meyers, E.W. og Lipman, D.J. (1990). "Basic Local Alignment Search Tool." Journal of molecular biology **215**(3): 403-410.
- Ambion. (2009). "Ambion's Appendix - DNA and RNA Molecular Weights and Conversions." Nedlastet 11.05.2009, fra http://www.ambion.com/techlib/append/na_mw_tables.html.
- Bassler, B. L., Wright, M., Showalter, R. E. og Silverman, M. R. (1993). "Intercellular signaling in *Vibrio harveyi* - sequence and function of genes regulating expression of luminescence." Molecular microbiology **9**(4): 773-786.
- Bassler, B. L., Wright, M. og Silverman, M. R. (1994). "Multiple signaling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi* - sequence and function of genes encoding a 2nd sensory pathway." Molecular microbiology **13**(2): 273-286.
- Bates, J. M., Mittge, E., Kuhlman, J., Baden, K. N., Cheesman, S. E. og Guillemin, K. (2006). "Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation." Dev Biol **297**(2): 374-86.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L. og Stryer, L. (2002). Biochemistry. New York, W.H. Freeman and Company.
- Bergh, Ø., Hjeltnes, B. og Skiftesvik, A. B. (1997). "Experimental infection of turbot *Scophthalmus maximus* and halibut *Hippoglossus hippoglossus* yolk sac larvae with *Aeromonas salmonicida* subsp *salmonicida*." Diseases of aquatic organisms **29**(1): 13-20.
- BLAST. (2009). "BLAST: Basic Local Alignment Search Tool." Nedlastet 27.07.2009, fra <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

- Børglum, A., Flint, T., Tommerup, N., Fleckner, J., Justesen, J. og Kruse, T. (1996). "Assignment of the human tryptophanyl-tRNA synthetase gene (WARS) to chromosome 14q32.2->q32.32." Cytogenetics and cell genetics **73**(1-2): 99-103.
- Cao, J. G. og Meighen, E. A. (1989). "Purification and structural identification of an autoinducer for the luminescence system of *Vibrio harveyi*." The Journal of biological chemistry **264**(36): 21670-21676.
- Chabrillon, M., Arijo, S., Diaz-Rosales, P., Balebona, M. og Morinigo, M. (2006). "Interference of *Listonella anguillarum* with potential probiotic microorganisms isolated from farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.)." Aquaculture research **37**(1): 78-86.
- Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorselaer, A., Pelczar, I., Bassler, B. og Hughson, F. M. (2002). "Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron." Nature **415**(6871): 545-549.
- Croxatto, A., Chalker, V., Lauritz, J., Jass, J., Hardman, A. og Williams, P. (2002). "VanT, a homologue of *Vibrio harveyi* LuxR, regulates serine, metalloprotease, pigment, and biofilm production in *Vibrio anguillarum*." Journal of bacteriology **184**(6): 1617-1629.
- Croxatto, A., Pride, J., Hardman, A., Williams, P., Camara, M. og Milton, D. (2004). "A distinctive dual-channel quorum-sensing system operates in *Vibrio anguillarum*." Molecular microbiology **52**(6): 1677-1689.
- Davey, H. M., Jones, A., Shaw, A. D. og Kell, D. B. (1999). "Variable selection and multivariate methods for the identification of microorganisms by flow cytometry." Cytometry **35**(2): 162-168.
- Defoirdt, T., Boon, N., Bossier, P. og Verstraete, W. (2004). "Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture." Aquaculture **240**(1-4): 69-88.

- Defoirdt, T., Crab, R., Wood, T. K., Sorgeloos, P., Verstraete, W. og Bossier, P. (2006). "Quorum sensing-disrupting brominated furanones protect the gnotobiotic brine shrimp *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio harveyi*, *Vibrio campbellii*, and *Vibrio parahaemolyticus* isolates." *Appl Environ Microbiol* **72**(9): 6419-23
- Denison, M. og Whitlock, J. (1995). "Xenobiotic-inducible Transcription of Cytochrome-P450 genes." *The Journal of biological chemistry* **270**(31): 18175-18178.
- Fiskeridirektoratet. (2007, 18.11.08). "Torsk - Fiskeridirektoratet." Nedlastet 08.06.2008, fra <http://www.fiskeridir.no/fiskeridir/statistikk/akvakultur/statistikk-for-akvakultur/torsk>.
- Fjellheim, A. J. (2006). Selection and administration of probiotic bacteria to marine fish larvae. Department of Biology. Trondheim, Norwegian University of Science and Technology. Philosophiae Doctor Thesis.
- Fjellheim, A. J., Klinkenberg, G., Skjermo, J. Aasen, I. M. og Vadstein, O. (2006a). Probiotic candidate bacteria from cod larvae. Upublisert manuskript i Fjellheim (2006).
- Fjellheim, A. J., Skjermo, J., Østensen, M-A. og Vadstein, O. (2006b). An *in vivo* test of probiotic candidates from the dominant and the antagonistic bacterial flora of cod larvae (*Gadus morhua* L.). Evaluation of colonization efficiency and viability of larvae. Upublisert manuskript i Fjellheim (2006).
- Ginzinger, D. (2002). "Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream." *Experimental hematology* **30**(6): 503-512.
- Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A. og Kuby, J. (2003). *Immunology Fifth Edition*. New York, W.H. Freeman and Company.
- Gonzalez, J. E. og Keshavan, N. D. (2006). "Messing with bacterial quorum sensing." *Microbiol Mol Biol Rev* **70**(4): 859-75.
- Gorospe, J. N., Nakamura, K., Abe, M. og Higashi, S. (1996). "Nutritional contribution of *Pseudomonas* sp in *Artemia* culture." *Fisheries science* **62**(6): 914-918.

- Gulliard, R.R.L. og Ryther, J.H. (1962). Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hudtedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* **8** (1962), pp. 229–239.
- Hansen, G. H., Bergh, Ø., Michaelsen, J. og Knappskog, D. (1992). "*Flexibacter ovolyticus* sp. nov., a pathogen of eggs and larvae of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L." International journal of systematic bacteriology **42**(3): 451-458.
- Hansen, G. H. og Olafsen, J. A. (1989). "Bacterial-colonization of cod (*Gadus morhua*) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs in marine aquaculture." Applied and environmental microbiology **55**(6): 1435-1446.
- Hansen, G. H. og Olafsen, J. A. (1999). "Bacterial Interactions in Early Life Stages of Marine Cold Water Fish." Microbial ecology **38**(1): 1-26.
- Henke, J. og Bassler, B. (2004a). "Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*." Journal of bacteriology **186**(20): 6902-6914.
- Henke, J. M. og Bassler, B. L. (2004b). "Quorum sensing regulates type III secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*." J Bacteriol **186**(12): 3794-805.
- Hervy, M., Hoffman, L. og Beckerle, M. (2006). "From the membrane to the nucleus and back again: bifunctional focal adhesion proteins." Current opinion in cell biology **18**(5): 524-532.
- Hessen, D. og Andersen, T. (1990). "Bacteria as a source of phosphorus for zooplankton." Hydrobiologia **206**(3): 217-223.
- Higgs, P. G. og Attwood, T. (2005). Bioinformatics and Molecular Evolution. Malden, Blackwell Publishing.

- Irianto, A. og Austin, B. (2003). "Use of dead probiotic cells to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)." Journal of fish diseases **26**(1): 59-62.
- Karunasagar, I., Pai, R., Malathi, G. R. og Karunasagar, I. (1994). "MASS MORTALITY OF PENAEUS-MONODON LARVAE DUE TO ANTIBIOTIC-RESISTANT VIBRIO-HARVEYI INFECTION." Aquaculture **128**(3-4): 203-209.
- Kjørsvik, E., Pittman, K. og Pavlov, D. (2004). From Fertilization to the End of Metamorphosis - Functional Development. Culture of Cold-Water Marine Fish. E. Moksness, E. Kjørsvik og Y. Olsen, Blackwell Publishing Ltd.: 204-278.
- Klug, W. S., Cummings, M. R. og Spencer, C. A. (2006). Concepts of Genetics. Upper Saddle River, Pearson Education Inc. Pearson Prentice Hall.
- Li, J., Mayne, R. og Wu, C. (1999). "A novel muscle-specific beta 1 integrin binding protein (MIBP) that modulates myogenic differentiation." J Cell Biol **147**(7): 1391-8.
- Livak, K. J. og Schmittgen, T. D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method." Methods **25**(4): 402-408.
- Madigan, M. T. og Martinko, J. M. (2006). Brock Biology of Microorganisms. San Fransisco, Pearson Education Inc.
- Magnadottir, B., Lange, S., Steinarsson, A. og Gudmundsdottir, S. (2004). "The ontogenic development of innate immune parameters of cod (*Gadus morhua* L.)." Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology **139**(2): 217-224.
- Magnadottir, B., Gudmundsdottir, B. K., Lange, S., Steinarsson, A., Oddgeirsson, M., Bowden, T., Bricknell, I., Dalmo, R. A. og Gudmundsdottir, S. (2006). "Immunostimulation of larvae and juveniles of cod, *Gadus morhua* L." Journal of fish diseases **29**(3): 147-155.

- Makridis, P., Fjellheim, A. J., Skjermo, J. og Vadstein, O. (2000a). "Control of the bacterial flora of *Brachionus plicatilis* and *Artemia franciscana* by incubation in bacterial suspensions." *Aquaculture* **185**(3-4): 207-218.
- Makridis, P., Fjellheim, A. J., Skjermo, J. og Vadstein, O. (2000b). "Colonization of the gut in first feeding turbot by bacterial strains added to the water or bioencapsulated in rotifers." *Aquaculture International* **8**(5): 367-380.
- Marie, D., Brussaard, C., Thyraug, R., Bratbak, G. og Vaultot, D. (1999). "Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry." *Applied and environmental microbiology* **65**(1): 45-52.
- Marie, D., Partensky, F., Jacquet, S. og Vaultot, D. (1997). "Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I." *Applied and environmental microbiology* **63**(1): 186-193.
- Marques, A., Ollevier, F., Verstraete, W., Sorgeloos, P. og Bossier, P. (2006). "Gnotobiotically grown aquatic animals: opportunities to investigate host-microbe interactions." *Journal of applied microbiology* **100**(5): 903-918.
- Marques, A., Dinh, T., Ioakeimidis, C., Huys, G., Swings, J., Verstraete, W., Dhont, J., Sorgeloos, P. og Bossier, P. (2005). "Effects of bacteria on *Artemia franciscana* cultured in different gnotobiotic environments." *Appl Environ Microbiol* **71**(8): 4307-17.
- Masser, M. P., Rakocy, J. og Losordo, T. M. (1999). "Recirculating Aquaculture Tank Production Systems - Management of Recirculating Systems." **SRAC Publication No. 452**: 1-12.
- Miljølære.no (2009). "Metodikk." Nedlastet 04.08.2009, fra <http://www.miljolare.no/tema/planterogdyr/artikler/planteplankton/metode.php>

- Miller, M. B. og Bassler, B. L. (2001). "Quorum sensing in bacteria." Annual Review of Microbiology **55**: 165-199.
- Milton, D., Hardman, A., Camara, M., Chhabra, S., Bycroft, B. og Stewart, G. (1997). "Quorum sensing in *Vibrio anguillarum*: Characterization of the vanI/vanR locus and identification of the autoinducer N-(3-oxodecanoyl)-L-homoserine lactone." Journal of bacteriology **179**(9): 3004-3012.
- Milton, D., Norqvist, A. og Wolfwatz, H. (1992). "Cloning of a Metalloprotease Gene Involved in the Virulence Mechanism of *Vibrio anguillarum*." Journal of bacteriology **174**(22): 7235-7244.
- Munro, P. D., Barbour, A. og Birkbeck, T. H. (1995). "Comparison of the Growth and Survival of Larval Turbot in the Absence of Culturable Bacteria with Those in the Presence of *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, or a Marine *Aeromonas* sp." Appl Environ Microbiol **61**(12): 4425-4428.
- Muyzer, G., de Waal, E. C. og Uitterlinden, A. G. (1993). "Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA." Applied and environmental microbiology **59**(3): 695-700.
- Muyzer, G. og Smalla, K. (1998). "Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology." Antonie Van Leeuwenhoek **73**(1): 127-141.
- Naas, K. E., Næss, T. og Harboe, T. (1992). "Enhanced 1st feeding of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus*) in green water." Aquaculture **105**(2): 143-156.
- NCBI. (2009a). "BLAST Program Selection Guide." Nedlastet 27.07.2009, fra <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/producttable.shtml#tblastn>.
- NCBI. (2009b). "Integrin beta 1 binding protein 3." Nedlastet 04.08.2009, fra <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/clust.cgi?ORG=Gga&CID=1537>

- Nealson, K. og Hastings, J. (1979). "Bacterial Bioluminescence - its Control and Ecological Significance." Microbiological reviews **43**(4): 496-518.
- Nordli, T. H. (2009, 20.02.09). "Framtidsrettet om torskavl." Nedlastet 10.06.2009, fra <http://www.fhl.no/marinfisk-og-skjell/framtidsrettet-om-torskavl-article3275-35.html>.
- Ottinger, C., Johnson, S., Ewart, K., Brown, L. og Ross, N. (1999). "Enhancement of anti-Aeromonas salmonicida activity in Atlantic salmon (Salmo sellar) macrophages by a mannose-binding lectin." Comparative biochemistry and physiology. C, Comparative pharmacology and toxicology **123**(1): 53-59.
- Oxford Biochemical Research (2009). "Xenobiotic Metabolism." Nedlastet 24.07.2009, fra <http://www.oxfordbiomed.com/commerce/ccc2433-xenobiotic-metabolism.htm>.
- Planas, M., Perez-Lorenzo, M., Hjelm, M., Gram, L., Fiksdal, I. og Bergh, O. (2006). "Probiotic effect in vivo of Roseobacter strain 27-4 against Vibrio (Listonella) anguillarum infections in turbot (Scophthalmus maximus L.) larvae." Aquaculture **255**(1-4): 323-333.
- Prescott, L., Harley, J. og Klein, D. (1999). Microbiology, Fourth Edition, Mc Graw Hill.
- QIAGEN. (2003-2009). "QIAGEN - data analysis." Nedlastet 10.07.2009, fra http://www1.qiagen.com/resources/info/Guidelines_RTPCR/DataAnalysis_Probe.aspx
- Rawls, J. F., Samuel, B. S. og Gordon, J. I. (2004). "Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(13): 4596-601.
- Reece, R. J. (2004). Analysis of Genes and Genomes. Chichester, John Wiley & Sons Ltd.
- Reitan, K.I., Rainuzzo, J.R. og Olsen, Y. (1994). "Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae." Journal of Phycology **30**: 972-979.

- Reitan, K.I., Rainuzzo, J.R., Øie, G. og Olsen, Y. (1993). "Nutritional effects of algal addition in 1st feeding of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae." Aquaculture **118**(3-4): 257-275.
- Reitan, K.I., Rainuzzo, J.R., Øie, G. og Olsen, Y. (1997). "A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae." Aquaculture **155**(1-4): 207-221.
- Ringø, E. og Birkbeck, T. H. (1999). "Intestinal microflora of fish larvae and fry." Aquaculture research **30**(2): 73-93.
- Salvesen, I. og Vadstein, O. (1995). "Surface disinfection of eggs from marine fish: evaluation of four chemicals." Aquaculture International **3**(3): 155-171.
- Salvesen, I., Øie, G. og Vadstein, O. (1997). "Surface disinfection of Atlantic halibut and turbot eggs with glutaraldehyde: Evaluation of concentrations and contact times." Aquaculture International **5**(3): 249-258.
- Schauder, S. og Bassler, B. L. (2001). "The languages of bacteria." Genes Dev **15**(12): 1468-80.
- Shapiro, H. M. (2003). Practical Flow Cytometry Fourth Edition. Hoboken, New Jersey John Wiley & Sons, Inc.
- Sugita, H., Mizuki, H. og Itoi, S. (2008). "Prevalence of a fish pathogen, *Listonella anguillarum*, in the intestinal tract of fish collected off the coast of Japan." Aquaculture research **39**(1): 103-105.
- Sæle, Ø., Nordgreen, A., Hamre, K. og Olsvik, P. A. (2009). "Evaluation of candidate reference genes in Q-PCR studies of Atlantic cod (*Gadus morhua*) ontogeny, with emphasis on the gastrointestinal tract." Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology **152**(1): 94-101.

- Taoka, Y., Maeda, H., Jo, J.-Y., Kim, S.-M., Park, S.-I., Yoshikawa, T. og Sakata, T. (2006). "Use of live and dead probiotic cells in tilapia *Oreochromis niloticus*." Fisheries science **72**(4): 755-766.
- Tinh, N.T.N., Yen, V. H. N., Dierckens, K. og Sorgeloos, P. (2008). "An N-acyl homoserine lactone-degrading microbial community improves the survival of first-feeding turbot larvae (*Scophthalmus maximus L.*)." Aquaculture **285**(1-4): 56-62.
- Tinh, N.T.N., Linh, N. D., Wood, T. K., Dierckens, K., Sorgeloos, P. og Bossier, P. (2007a). "Interference with the quorum sensing systems in a *Vibrio harveyi* strain alters the growth rate of gnotobiotically cultured rotifer *Brachionus plicatilis*." J Appl Microbiol **103**(1): 194-203.
- Tinh, N.T.N., Yen, V. H. N., Dierckens, K., Sorgeloos, P. og Bossier, P. (2007c). "N-acyl homoserine lactone-degrading microbial enrichment cultures isolated from *Penaeus vannamei* shrimp gut and their probiotic properties in *Brachionus plicatilis* cultures." FEMS microbiology ecology **62**(1): 45-53.
- Vadstein, O. (1997). "The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges." Aquaculture **155**(1-4): 401-417.
- Vadstein, O., Mo, T. A. og Bergh, Ø. (2004). Microbial interactions, prophylaxis and diseases. Culture of Cold-Water Marine Fish. E. Moksness, E. Kjørsvik og Y. Olsen, Blackwell Publishing Ltd.: 28-72
- Vadstein, O., Øie, G., Olsen, Y., Salvesen, I. og Skjermo, J. (1993). A strategy to obtain microbial control during larval development of marine fish. Fish Farming Technology. H. Reinertsen, L. A. Dahle, L. Jørgensen, K. Tvinnereim og G. Skjåk-Bræk. Rotterdam, A.A. Balkema: 69-75.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. og Verstraete, W. (2000). "Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture." Microbiology and molecular biology reviews **64**(4): 655.

- Vine, N. G., Leukes, W. D. og Kaiser, H. (2006). "Probiotics in marine larviculture." FEMS microbiology reviews **30**(3): 404-427.
- Vine, N. G., Leukes, W. D., Kaiser, H., Daya, S., Baxter, J. og Hecht, T. (2004b). "Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus." Journal of fish diseases **27**(6): 319-326.
- Waters, C. M. og Bassler, B. L. (2006). "The *Vibrio harveyi* quorum-sensing system uses shared regulatory components to discriminate between multiple autoinducers." Genes Dev **20**(19): 2754-67.
- Whitehead, N. A., Barnard, A. M. L., Slater, H., Simpson, N. J. L. og Salmond, G. P. C. (2001). "Quorum-sensing in gram-negative bacteria." FEMS microbiology reviews **25**(4): 365-404.
- Wilhelm, J. og Pingoud, A. (2003). "Real-time polymerase chain reaction." ChemBiochem **4**(11): 1120-1128.

VEDLEGGSLISTE

- Vedlegg 1: Forkortelser
- Vedlegg 2: Medier og løsninger brukt i oppgaven
- Vedlegg 3: DNA-standard brukt ved gelelektroforese
- Vedlegg 4: Plasmidkart
- Vedlegg 5: Resultater etter qPCR på prøver fra startfôringsforsøk

Vedlegg 1: Forkortelser

AHL	Acetylerert homoserinlacton
AI-2	Autoinduser 2
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CAI-1	Cholerae autoinduser 1
CFU	Colony forming unit
C _T	Threshold cycle
DEPC	Dietylpyrokarbonat
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoreses
E	Amplifiseringseffektivitet
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
EST	Expressed Sequence Tag
FASV	Filtrert autoklavert sjøvann
FHL	Fiskeri- og havbruksnæringens landsforening
FSC	Forward Scatter
HAI-1	Harveyi autoinduser 1
MA	Marine Agar
MB	Marine Broth
min	Minutter
MOPS	3-(<i>N</i> -morfolino)propansvovelsyre
NSS	Nine Salt Solution
OD	Optisk tetthet
PCR	Polymerase Chain Reaction
RLU	Relative Light Unit
rpm	Rounds per minute
SD	Standardavvik
SE	Standard error
sek	Sekunder
SSC	Side Scatter
TAE	Tris EDTA acetat
qPCR	Kvantitativ real-time PCR

Vedlegg 2: Medier og løsninger brukt i oppgaven

Bakteriemedium

Marine Broth (Difco™, 2216), 37,4 g l⁻¹, ble brukt som generelt dyrkningsmedium for alle bakteriekulturer. 1,5 % Marine Agar (Difco™) (37,4 g l⁻¹ marine broth og 15 g l⁻¹ agar noble), ble brukt som fast dyrkningsmedium.

Tabell V2.1 Oppskrift på M65 medium (1 L)

Innhold	Mengde
Peptone	0,5 g
Tryptone	0,5 g
Yeast extract	0,5 g
Filtrert sjøvann	800 mL
Destillert vann	200 mL

Ved tillaging av 1,5 % M65 agarplater, ble det tilsatt 15 g l⁻¹ agar noble.

Tabell V2.2 Oppskrift på minimalmediet Nine Salt Solution

Innhold	Mengde per liter destillert vann
NaCl	20,000 g
Na ₂ SO ₄	1,470 g
NaHCO ₃	0,080 g
KCl	0,250 g
KBr	0,040 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1,870 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,410 g
SrCl ₂ ·6H ₂ O	0,008 g
H ₃ BO ₃	0,008 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,00565 g
Sporelementer (tabell ##)	0,200 mL

Algemedium

Tabell V2.3 F/2 medium for dyrking av alger (Gulliard et al. 1962)

Innhold	Mengde
Filtrert, autoklavert sjøvann (FASV)	1,000 L
NaNO ₃	0,075 g l ⁻¹
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,00565 g l ⁻¹
Sporelementer stockløsning	1,000 mL l ⁻¹
Vitaminmiks stockløsning	1,000 mL l ⁻¹

Tabell V2.4 Stockløsning av sporelementer

Innhold	Mengde l⁻¹ MilliQ-vann
Na ₂ EDTA	4,16 g
FeCl ₃ ·6H ₂ O	3,15 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,01 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,022 g
COCl ₂ ·6H ₂ O	0,01 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,18 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,006 g

Tabell V2.5 Stockløsning av vitaminmiks.

Innhold	Mengde l⁻¹ MilliQ-vann
Cyanocobalamin (Vitamin B ₁₂)	0,0005 g
Thiamine HCl (Vitamin B ₁)	0,1 g
Biotin	0,0005 g

Ferdig blandet F/2 medium ble så autoklavert (120°C, 20 min) for å fjerne alle bakterier.

Tabell V2.6 Oppskrift på lugol (Miljølære.no 2009)

Innhold	Mengde
I ₂ (jodkrystaller)	10 g
KI (kaliumjodid)	20 g
MilliQ vann	200 mL
99% iseddik	20 mL

Først ble jodkrystaller og kaliumjodid løst i MilliQ vann, før iseddik så ble tilsatt. Løsningen ble oppbevart i brun glassflaske.

Løsninger brukt under RNA isolering

Tabell V2.7 10 × MOPS-buffer. Løsningen lages og lagres i mørket ved 4°C.

Innhold	Mengde (for tillaging av totalt 1000 ml)
3-{N-morpholino} propanesulfonic acid (MOPS)	41,8 g
Natrium acetat (NaCH ₃ COO)	6,8 g
EDTA (0,5 M)	20 ml
H ₂ O	Opp til 1000 ml

Tabell V2.8 Loading buffer for bruk i gelelektroforese av RNA-isoleringsprodukt.

Innhold	Mengde (for tillaging av totalt 500 µL)
Deionisert formamid (100%)	250 µL
Formaldehyd (37%)	83 µL
10 × MOPS	50 µL
RNase fri glycerol (100%)	50 µL
Bromfenolblått (2,5%)	10 µL
DEPC-vann	57 µL

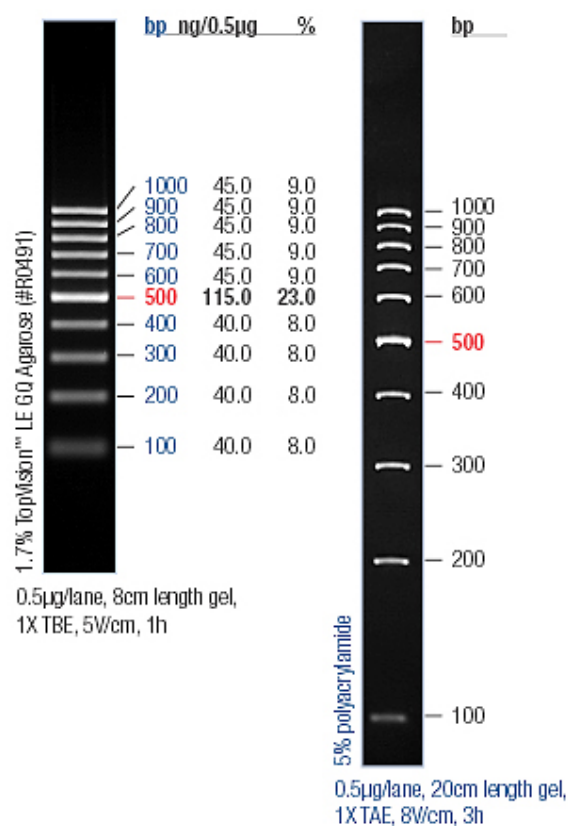
Dietylpyrokarbonat (DEPC) brukes for å inaktivere RNase enzymer i for eksempel vann som skal brukes i RNA isolering. Bruk av DEPC behandlet vann reduserer sjansen for at RNA degraderes av RNaser i løpet av isoleringen. Vannet behandles ved å tilsette 1 ml DEPC løsning l⁻¹ MilliQ-vann. Vannet settes så på røring over natt, for så å autoklaveres (120°C, 20 minutter) for å fjerne DEPC rester.

Tabell V2.9 50 × TAE buffer. Bufferen ble sterilisert ved autoklivering (120°C, 20 min)

Innhold	Mengde (for tillegg av totalt 1000 ml)
Tris base (2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol)	242 g
Glacial acetic acid	57,1 ml
Na ₂ EDTA (0,5 M, pH 8.0)	100 ml
H ₂ O	Opp til 1000 ml

Vedlegg 3: DNA-standard for gelelektroforese

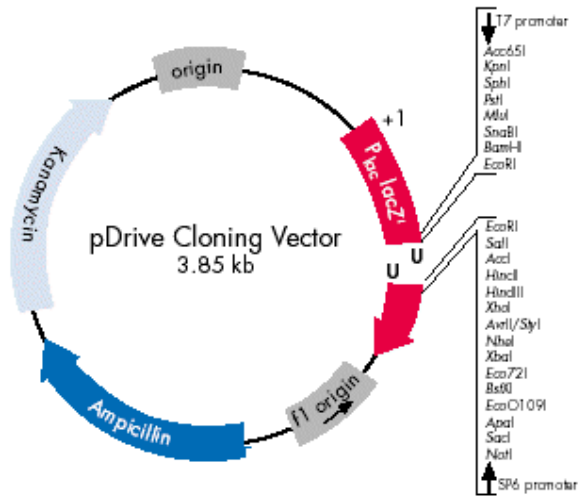
Ved separasjon av DNA-fragmenter på agarosegel ble GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder fra Fermentas (Figur V3.1) benyttet som standard. Ut fra denne standarden ble størrelsen på fragmentene i prøvene bestemt.



Figur V3.1 Fragmentstørrelser og konsentrasjoner i GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder fra Fermentas.

Vedlegg 4: Plasmidkart

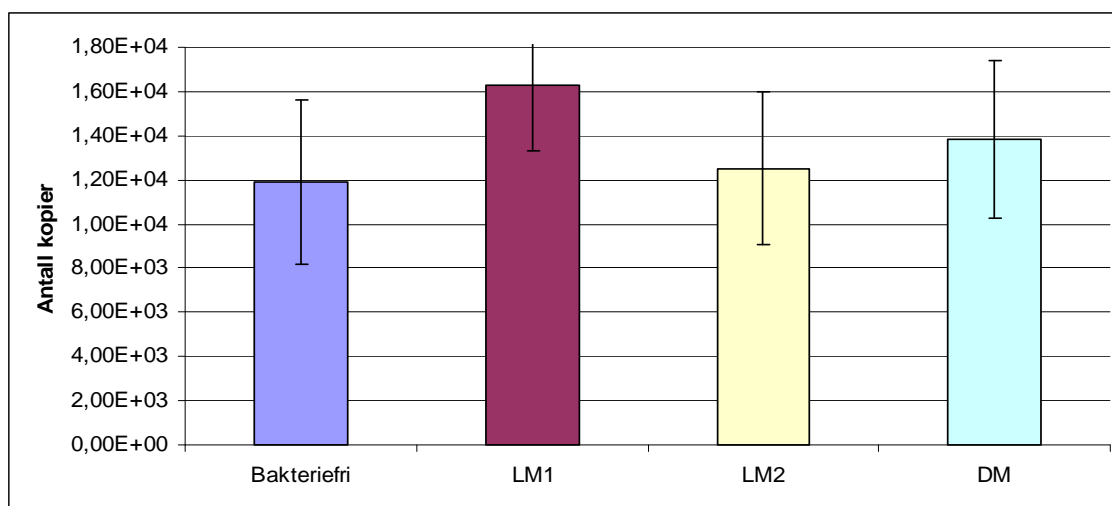
Plasmidkart for pDrive Cloning Vector er gitt i Figur V4.1.



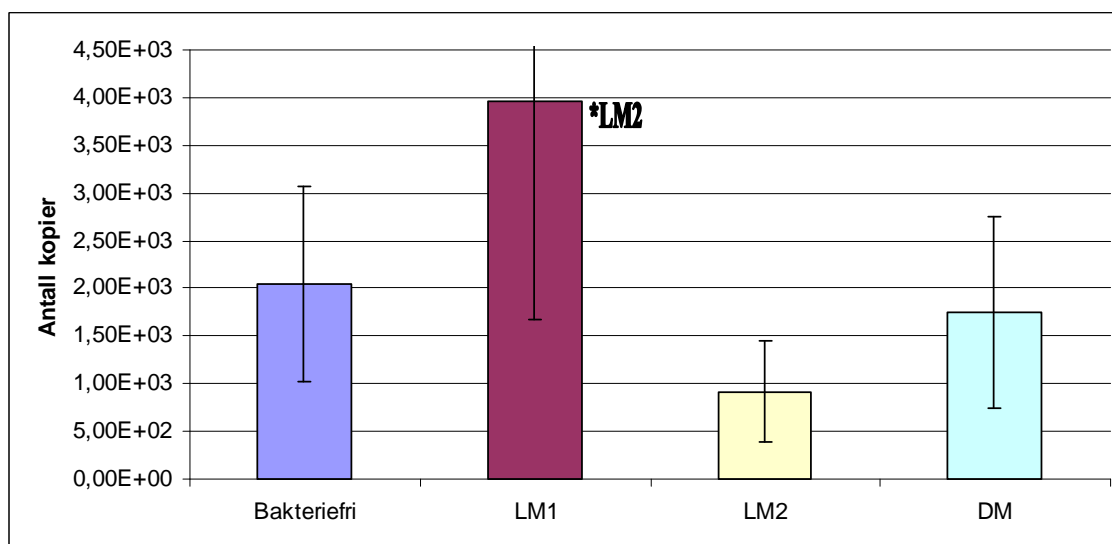
Figur V4.1 Plasmidkart for pDrive Cloning Vector

Vedlegg 5: Resultater etter qPCR på prøver fra startfôringsforsøk

Resultatet etter kjøring av qPCR på prøver fra startfôringsforsøket før normalisering er presentert i figurene under. Resultatene fra de ulike behandlingene er parvis sammenlignet ved hjelp av Tukey's Honestly-Significant-Difference Test. Signifikante forskjeller er merket med stjerne (*) på figurene.

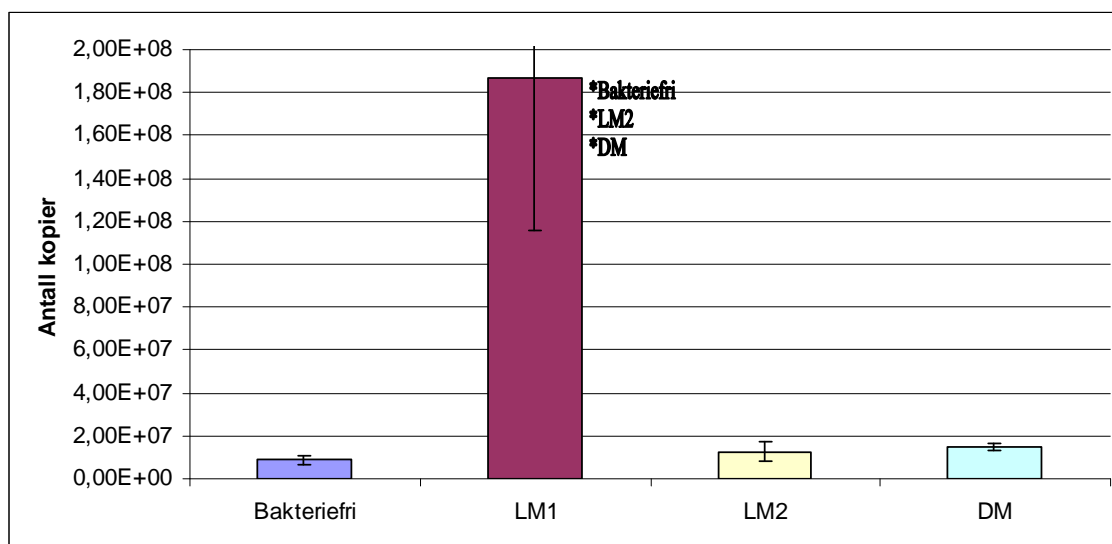


Figur V5.1 Genuttrykk for *CLECT* for de ulike behandlingene. Søylene viser mengde RNA i prøvene, og hver søyle representerer en behandling. Det var ingen signifikante forskjeller i genuttrykket mellom de ulike behandlingene. Error bars er standard error.

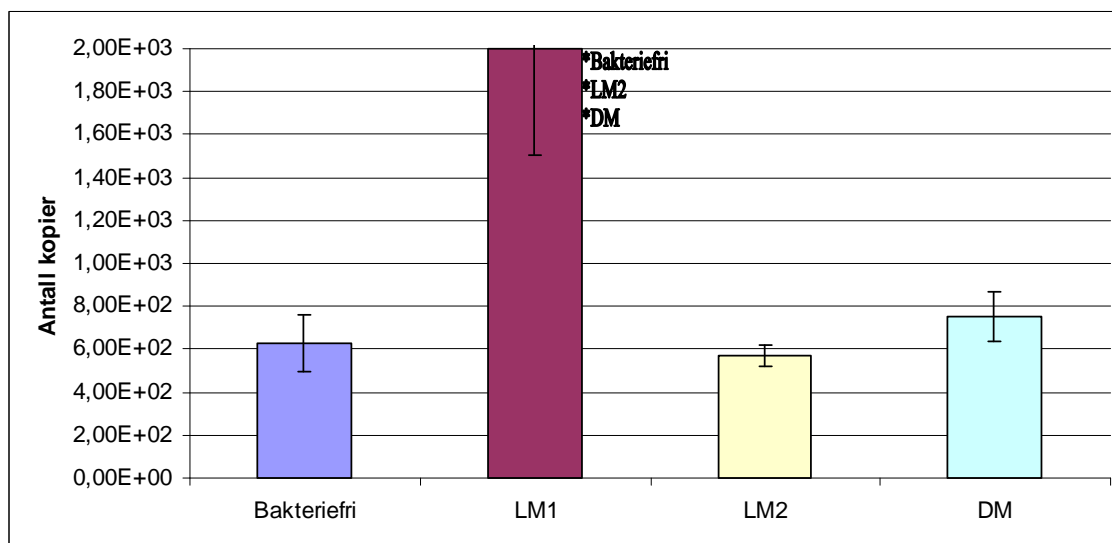


Figur V5.2 Genuttrykk for *WARS* for de ulike behandlingene. Søylene viser mengde RNA i prøvene, og hver søyle representerer en behandling. Det var signifikant forskjell i

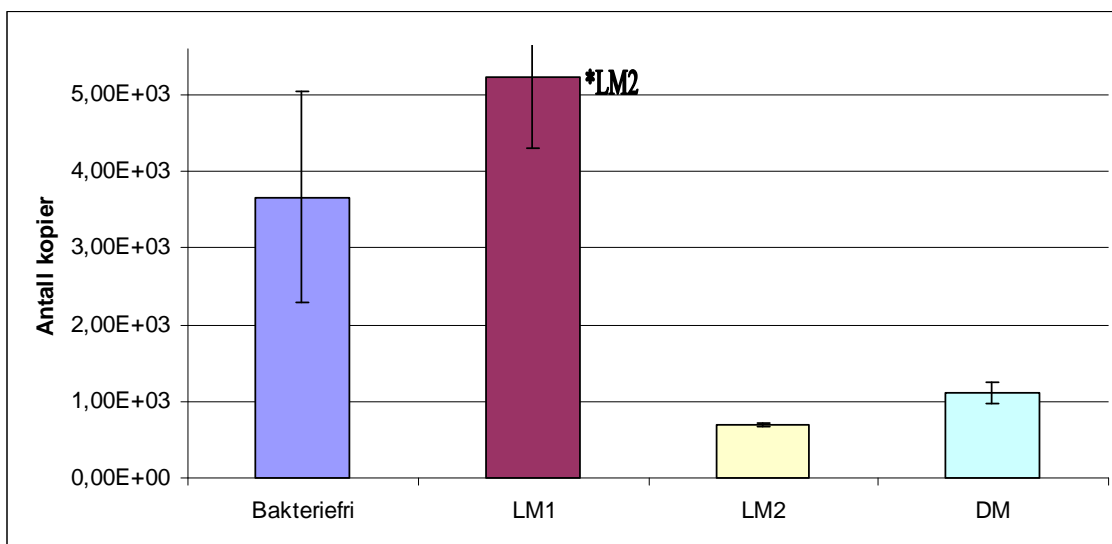
genuttrykket mellom de to behandlingene med levende bakterier ($P=0,03$). Error bars er standard error.



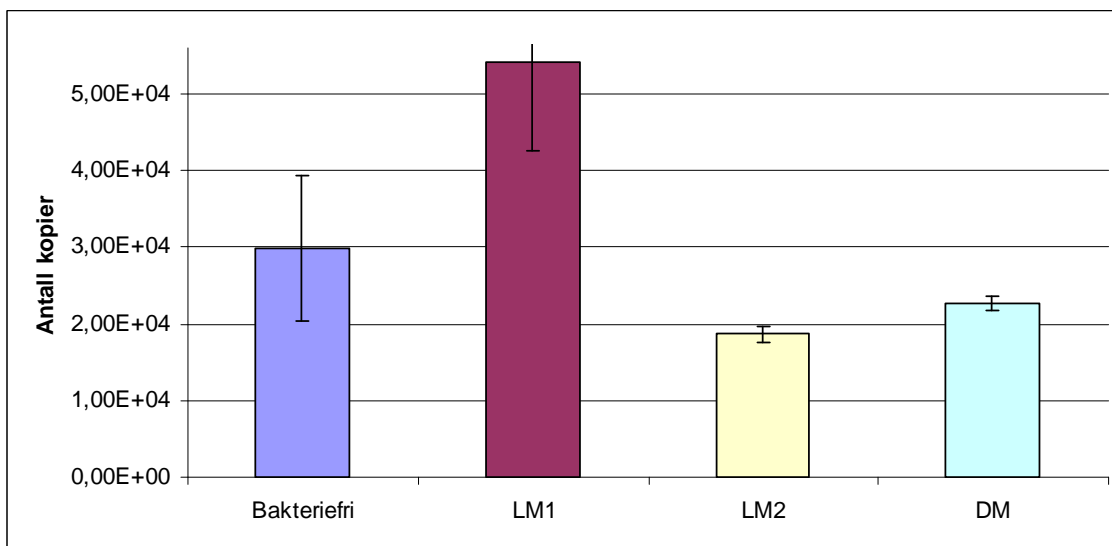
Figur V5.3 Genuttrykk for *Fdps* for de ulike behandlingene. Søylen viser mengde RNA i prøvene, og hver søyle representerer en behandling. Det var signifikant forskjell i genuttrykket mellom LM1-behandlingen og alle de andre behandlingene (henholdsvis $P=0,004$; $P=0,007$; og $P=0,01$). Error bars er standard error.



Figur V5.4 Genuttrykk for *Fiaf* for de ulike behandlingene. Søylen viser mengde RNA i prøvene, og hver søyle representerer en behandling. Det var signifikant forskjell i genuttrykket mellom LM1-behandlingen og alle de andre behandlingene (henholdsvis $P=0,009$; $P=0,01$; og $P=0,02$). Error bars er standard error.



Figur V5.5 Genuttrykk for *Gpx2* for de ulike behandlingene. Søylene viser mengde RNA i prøvene, og hver søyle representerer en behandling. Det var signifikant forskjell i genuttrykket mellom de to behandlingene med levende bakterier ($P=0,047$). Error bars er standard error.



Figur V5.6 Genuttrykk for *Itgb1bp3* for de ulike behandlingene. Søylene viser mengde RNA i prøvene, og hver søyle representerer en behandling. Det var ingen signifikant forskjell i genuttrykket mellom behandlingene. Error bars er standard error.