

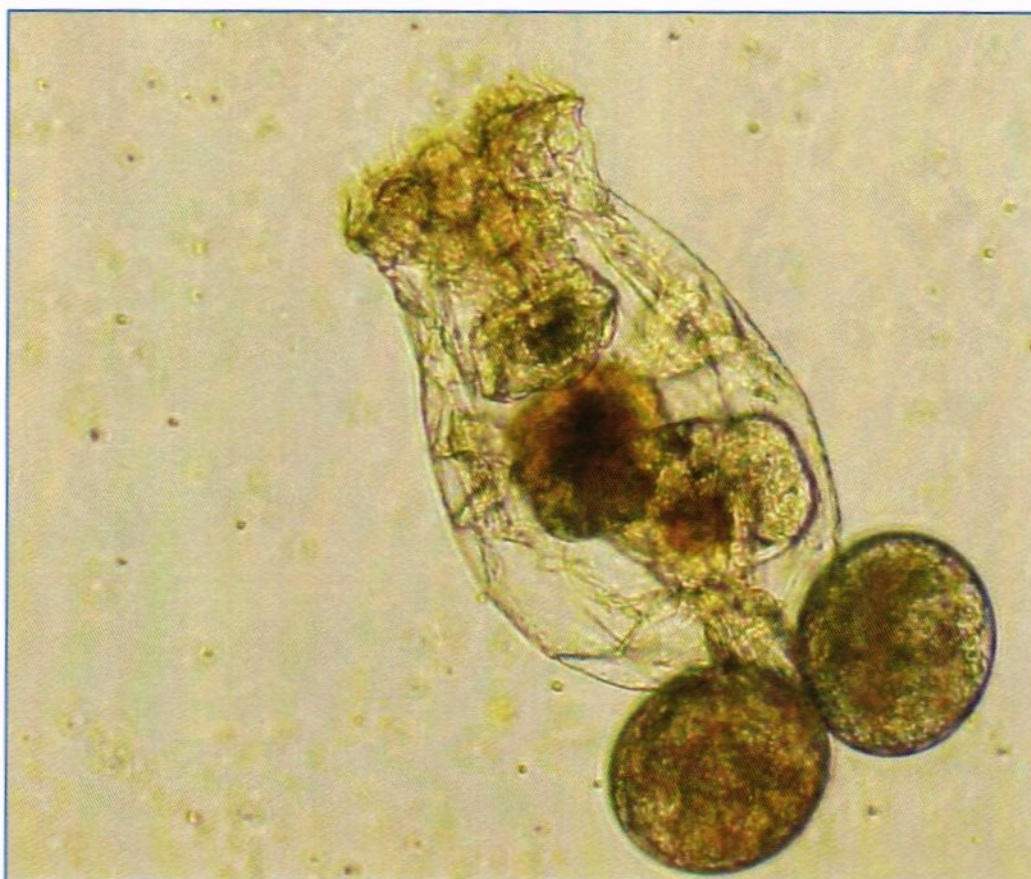
A112023 - Åpen

Rapport

Rotatorier som levendefôr til torskeyngel

Forfattere

Gunvor Øie, Ingrid Overrein, Werner Storøy, Jorunn Skjermo, Keshuai Lee, Marius Monsen og Trond Størseth





SINTEF RAPPORT

SINTEF Fiskeri og havbruk AS
Marin ressursteknologi

Postadresse: 7465 Trondheim
Besøksadresse:
SINTEF Sealab
Brattørkaia 17C

Telefon: 4000 5350
Telefaks: 932 70 701

E-post: fish@sintef.no
Internet: www.sintef.no

Foretaksregisteret: NO 980 478 270 MVA

TITTEL

Rotatorier som levendefôr til torskeyngel

FORFATTER(E)

Gunvor Øie, Ingrid Overrein, Werner Storøy, Jorunn Skjeremo, Keshuai Lee, Marius Monsen og Trond Størseth

OPPDRAKSGIVER(E)

NCE Aquaculture, Vestlandsrådet og norske yngeloppdrettere av marine fiskelarver

RAPPORTNR. A112023	GRADERING Åpen	OPPDRAKSGIVERS REF. Bjørn Gjellan Nielsen (NCE), Siri Hanson (Vestlandsrådet)	
GRADER. DENNE SIDE	ISBN 978-82-14-05119-3	PROSJEKTNR. 820156/820139	ANTALL SIDER OG BILAG 77
ELEKTRONISK ARKIVKODE 820156/Sluttrapport (april 2011)		PROSJEKTLEDER (NAVN, SIGN.) Gunvor Øie <i>Gunvor Øie</i>	VERIFISERT AV (NAVN, SIGN.) for Werner Storøy <i>Kjell Peter</i>
ARKIVKODE	DATO 2011-04-05	GODKJENT AV (NAVN, STILLING, SIGN.) Gunvor Øie (Fung.Forsknings sjef) <i>Gunvor Øie</i>	

SAMMENDRAG

Stabil og forutsigbar produksjon av rotatorier er avgjørende for å lykkes med marin yngelproduksjon. I denne rapporten gis det en innføring i dagens kunnskap knyttet til rotatorier (DP1). Dette omfatter tema som generell biologi, ernæring, mikrobiologi, produksjonsformer og ny teknologi. Delprosjekt 2 (DP2) omfatter dyrking og kjemiske analyser av de vanligste dyrknings- og anrikingsfôrene som benyttes til rotatorier i Norske klekkerier i dag. Resultatene viste at næringsinnholdet i rotatorier kan variere vesentlig gjennom en dyrkningsperiode hvor det er blitt brukt samme fôringsdose av DHA *Chlorella*. Det ser også ut til næringsinnholdet rotatoriene får gjennom dyrkningsfasen bestemmer mye for rotatoriernes ernæringsstatus etter en anrikning. Dette vil si deres innhold av protein, lipid, karbohydrat, og dermed også deres innhold av energi. I delprosjekt 3 (DP3) ble de to rotatorieartene *B.plicatilis* (Nevada) og *B.ibericus* (Cayma) sammenlignet. De ble vurdert ut fra vekst, vannkvalitet i kulturene, mikrobielle og ernæringsmessige forhold. Økende grad av vannutskifting gav en positiv effekt og reduserte nivået av ammoniakk og antallet koloniformende bakterier i rotatoriekulturene. De to rotatoriene *B. Nevada* og *B. Cayman* oppnådde like fettsyreprofiler når de ble anriket med same lipidkilde, og fettsyresammensetningen i begge rotatoriene var godt korrelert med nivåene i diettene. I delprosjekt 4 (DP4) ble rotatorier sammenlignet med pollplankton og dyrkede copepoder (*Acartia tonsa*) ved hjelp av NMR. Her ble det konkludert med at pollplankton og dyrkede copepoder er svært like i sammensetning. Det siste delprosjektet (DP5) omfatter analyser fra yngelklekkeriene i Norge. Yngelanleggene ble besøkt to ganger iløpet av en startfôringsperiode, og prøver av rotatorier og fiskelarver ble tatt ut. Rotatorieprøvene ble analysert ved hjelp av NMR. I tillegg ble det utført analyser av karbon og nitrogen innhold i rotatoriene og fiskelarvene. Det ble konkludert med at det er forskjeller mellom anleggene og at det er forskjeller i reproducerbarhet mellom prøveuttakene for de ulike anleggene.

STIKKORD	NORSK	ENGELSK
GRUPPE 1	Rotatorier	Rotifers
GRUPPE 2		
EGENVALGTE		

INNHOLDSFORTEGNELSE

1	ROTATORIER (DP1)	4
1.1	Rotatoriebiologi	4
1.1.1	Introduksjon og rotatoriebiologi	4
1.1.2	Generell biologi	4
1.1.3	Morfologi	5
1.1.4	Fôring og fordøyelse	6
1.1.5	Nervesystemet	6
1.1.6	Bevegelse	6
1.1.7	Reproduksjon	6
1.2	Produksjon av rotatorier	7
1.2.1	Dyrkingsmetoder	8
1.2.2	Telling av rotatorier	8
1.2.3	Vannkvalitet	8
1.3	Ernæring	9
1.3.1	Protein	9
1.3.2	Lipider	11
1.3.3	Marine fiskelarver har behov for essensielle fettsyrer i dietten	12
1.3.4	Problemer med oksiderte emulsjoner	13
1.3.5	Karbohydrat	13
1.3.6	Mineraler	13
1.3.7	Vitaminer	14
1.4	Vasking og lagring av rotatorier før utfôring til fiskelarver	14
1.5	Stamkultur	15
1.6	Mikrobiell kontroll	16
1.7	Ny teknologi	18
1.7.1	Dyrking av rotatorier i resirkuleringssystem	18
1.7.2	Automatisk telling av rotatorier	19
1.8	Fordøyelse i marine fiskelarver	19
2	DYRKING OG ANRIKING AV ROTATORIER (DP2)	21
2.1	Bakgrunn	21
2.2	Mål	21
2.3	Materialer og metoder	22
2.3.1	Dyrkning av rotatorier	22
2.3.2	Anrikning	22
2.3.3	Prøveuttak	23
2.3.4	Vanninnhold og askefri tørrvekt	24
2.3.5	Innhold av karbon og nitrogen	24
2.3.6	Protein innhold per individ	24
2.3.7	Lipid og fettsyreinhold	24
2.4	Analysen og beregninger	25
2.4.1	Tørrvekt per individ	25
2.4.2	Karbohydrat innhold	25
2.4.3	Kalori innhold	25
2.4.4	Innhold av iod og selen	25
2.5	Resultater	26
2.5.1	Målinger basert på innhold per tørrvekt	26
2.5.2	Målinger basert på innhold per individ	30
2.5.3	Innhold av energi i rotatorier	33

2.5.4	Innhold av Jod og Selen.....	37
2.5.5	Konklusjon.....	37
3	NÆRINGSVERDI OG DYRKNINGS KARAKTERISTIKA FOR TO STAMMER FRA ARTSKOMPLEKSET <i>BRACHIONUS PLICATILIS</i> (B. 'Nevada' og B. 'Cayman') (DP3)	38
3.1	Bakgrunn	38
3.2	Materialer og metoder	39
3.2.1	Fortynning av rotatoriekulturer.....	39
3.3	Resultater effekt av ulike vannutskiftingsrater på rotatorier.....	42
3.3.1	Morfometri.....	42
3.4	Tetthet av rotatorier ved ulike fortynninger	43
3.5	Ammoniakk	45
3.6	Mikrobiologi.....	47
3.6.1	Kultur vann	47
3.6.2	Rotatorier	49
3.7	Konklusjon	50
4	Resultater manipulering av PC og PE i to arter rotatorier	51
4.1	Anrikning av rotatorier med ulike lipidkilder	51
4.1.1	Lipid innhold og fettsyrer i dietter.....	51
4.2	Rotatorier.....	55
4.2.1	Innhold av total lipid i rotatorier og copepoder	55
4.2.2	Fettsyre sammensetning i rotatorier.....	56
4.2.3	Kvantitativt innhold av fettsyrer i totale lipider	57
4.2.4	PC og PE innhold i rotatorier.....	59
4.2.5	Sammenheng n-3 HUFA nivåer i PC og PE mellom dietter og rotatorier	59
4.3	Konklusjon	62
5	SAMMENLIGNING AV DYRKEDE ROTATORIER, DYRKEDE COPEPODER OG PLANKTON FRA POLL (DP4)	62
5.1	Bakgrunn	62
5.2	Mål.....	63
5.3	Materiale og metode	63
5.4	Resultat og diskusjon.....	64
5.5	Konklusjon	65
6	NÆRINGSSAMMENSETNING I ROTATORIER VED ULIKE YNGELANLEGG (DP5)	66
6.1	Bakgrunn	66
6.2	Mål.....	66
6.3	Materiale og metode	66
6.3.1	Generell beskrivelse av rotatorieproduksjon ved anleggene	66
6.3.2	NMR metabolomics.....	67
6.3.3	CN analyser	67
6.4	Resultat og diskusjon.....	68
6.4.1	NMR analyser.....	68
6.4.2	CN analyser	70
6.5	Konklusjon	74
7	Litteratur	74

1 ROTATORIER (DP1)

1.1 Rotatoriebiologi

1.1.1 Introduksjon og rotatoriebiologi

Rotatorier fra slekten *Brachionus* har blitt benyttet i akvakultur siden tidlig på 60-tallet. (Ito, 1960, omtalt av Nagata and Hirata, 1986). Rotatorier ble først sett på som ett problem pga. oppblomstring i ålekulturer, men etter hvert ble de testet som levendefôr til fiskelarver (Ito, 1960). Den første tiden ble rotatoriene dyrket opp på levende alger, noe som krevde store volum og førte til kulturer med lav tetthet. Etter hvert er nye førkilder blitt utviklet, og tettheten i rotatoriekulturer har økt betraktelig. I dag er rotatorier viktig som levendefôr for en lang rekke fiske- og skalldyrarter rundt om i verden.

På norsk kalles rotatorier for hjuldyr på grunn av at ciliekransen på toppen av dyret ser ut som to hjul. Rotatorier blir benyttet som levendefôr fordi de er enkle å dyrke opp i høye tettheter hele året rundt. Rotatoriestørrelsen passer til munnstørrelsen på mange fiskelarver, og svømmeaktiviteten til rotatoriene er rolig, slik at de er enkle å fange for fiskelarvene. Rotatoriene er tolerante når det å tilpasse seg variasjoner i omgivelsene som temperatur, salinitet, pH og temperatur. Næringsinnholdet i rotatoriene er enkelt å manipulere, og kan bli tilpasset fiskelarvenes behov. De første ukene etter at fiskelarvene har begynt å spise levendefôr er helt avgjørende for fiskelarvens utvikling og levedyktighet. Det er derfor svært viktig å produsere rotatorier med godt næringsinnhold, god mikrobiell flora og høy viabilitet.

1.1.2 Generell biologi

Rotatorier er små invertebrater som stort sett lever hovedsakelig i ferskvann, men det finnes arter som lever i sjøvann, brakkvann og i fuktige terrestriske miljø, som foreksempel på mose. Det finnes i overkant av 2000 ulike rotatoriearter, og det oppdages stadig nye arter.

Slekten Rotifera er delt i to superklasser kalt Seisona og Eurotatoria. *Brachionus*-komplekset er en av de mest studerte gruppene av rotatorier og taksonomien blir stadig revidert. I akvakultur blir flere ulike *Brachionus*-arter benyttet. Genetiske analyser har vist at det man tidligere trodde var *Brachionus plicatilis*, ikke er en enkelt art men flere ulike arter. Det er antatt at *Brachionus*-komplekset består av 15 arter (Ciros-Perez et al., 2001, Gomez et al. 2002, Suatoni et al., 2006). Genetiske analyser har revolusjonert den taksonomiske klassifiseringen av *Brachionus* arter det siste 10 året.

Identifisering av arter brukt i eksperimenter og ved klekkerier er viktig fordi de ulike artene har forskjellig veksthastighet (Venetia and Vadstein, 2007), lorica lengde, optimum for salinitet og temperatur, svømmeaktivitet, størrelsespreferanse til førpartikler (Baer et al. 2008, Vadstein et al.

1993) og biokjemisk sammensetning (Monsen 2007). Dette fører til at både størrelse og næringssammensetning varierer mellom de ulike *Brachionus* artene, som i neste omgang vil være viktig for fiskelarvene. I perioden fra 1950 til år 2000 ble det publisert ca 750 artikler som omhandlet *B.plicatilis*. Dessverre er det kun noen få artikler som har riktig artsbestemmelse, slik at en del av denne akkumulerte kunnskapen har begrenset verdi i dag (Suatoni et al. 2006).

1.1.3 Morfologi

Brachionus artene har noen særegne trekk som inkluderer corona ("hodet") med en ciliekrans og mastax. På framsiden av "hodet" sitter corona som består av to konsentriske cilierte "kroner". Dette roterende organet er viktig for matinntaket og for bevegelse. Kroppen er dekket med et skall kalt lorica, som består av keratinliknende proteiner. Lorica har pigger i toppen, og spissheten på disse piggene kan benyttes i artsbestemmelsen. Rotatoriene har også en fot med to tær. Et limliknende sekret kan skilles ut i tærne, slik at rotatorien blir i stand til å feste seg til underlaget. Rotatoriene er i stand til å trekke foten inn i lorica ved hjelp av langsgående muskler. Rotatoriene beveger seg ved hjelp av ciliekransen, foten og bevegelsen blir enklere ved kontraksjon av muskler inne i rotatorien. Rotatorier har et veldig enkelt nervesystem. Under corona ligger en enkel stor nerveknute. Fra denne enkle hjernen går to para nerveceller ned i foten, med forgreninger til ulike organer. Rotatoriene har også sensoriske celler som er delt opp i mekaniske reseptorer, kjemoreseptorer og fotoreseptorer.

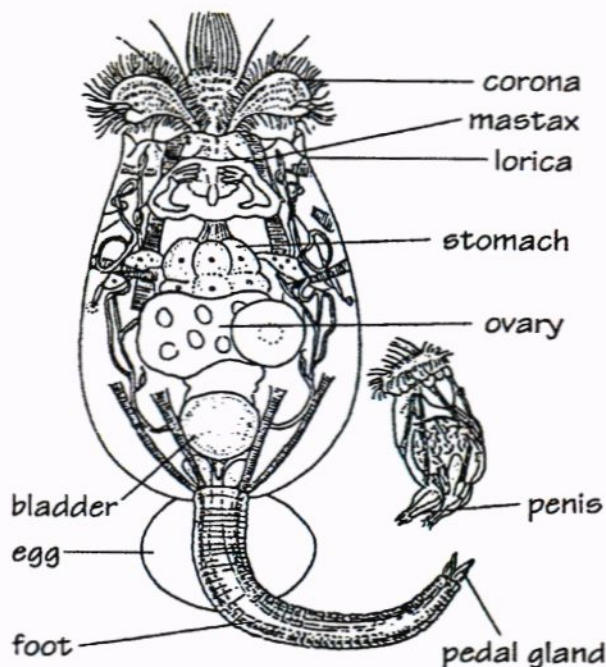


Figure 3.1. *Brachionus plicatilis*, female and male (modified from Koste, 1980).

1.1.4 Fôring og fordøyelse

Partikler fra vannet når munnåpningen og passerer svelget. Den cilierte kronen er viktig i fôropptaket. Svelget inneholder mastax hvor fôrpartiklene blir knust i et "oppmalingsorgan" kalt trophi, trolig ved hjelp av enzymer. De harde delene av trophi er viktig i taksonomisk bestemmelse av arter. De knuste fôrpartiklene blir deretter ført ned i fordøyelseskanalen sammen med magesaft fra store magesaftkjertler, og ekstracellulær fordøyelse skjer i magesekken. Mange ulike enzymer er rapportert fra *B.plicatilis*. Dette omfatter proteaser (Hara et al. 1984a,b, Kuhle og Kleinow 1985, Wetthmar og Kleinow 1993), α -amylase, laminarinase, cellulase, cellobiohydrolase, lysozyme og β -1,3-lucanase (Hara et al. 1997, Kuhle og Kleinow 1985, 1989, 1990). Deretter føres maten ned i tarmen og i kloakken, hvor også væske fra blæren skilles ut sammen med egg fra egglederne. Rotatoriene har ikke respirasjonssystem eller sirkulasjonssystem, og kroppsvesker er lokalisert i "pseudocoelom" (uekte bukhule) (Lubzens 2003). Muskelsammentrekninger i kroppen hjelper til med sirkulasjon av kroppsvæske. Rotatoriene bytter gasser og kvitter seg med nitrogen avfall ved diffusjon gjennom kroppsoverflaten, i tillegg har de primitive nyrer som fører avfallstoffer ned i blæren. *B.plicatilis* er osmokonform og det vil si at de justerer kroppsvæskens osmolaritet til den konsentrasjonen i omgivelsene (Epp and Winston, 1977). Kun ved lave saltkonsentrasjoner i omgivelsene, så har rotatoriene høyere konsentrasjon i kroppen (Epp og Winston, 1977). Rotatoriene tåler store variasjoner i salinitet.

1.1.5 Nervesystemet

Nervesystemet består av en hjerne-nerveknute, og er lokalisert under corona. Nerveceller går ned langs kroppen på hver side til foten, med greiner til andre organ. Rotatoriens sensoriske organer kan deles i mekaniske reseptorer, kjemiske reseptorer og foto reseptorer. De mekaniske reseptorene finnes på corona, antenner, svelg og fot. Kjemiske reseptorer finnes på corona, og er viktig ved valg av forpartikler. Mange arter har en eller flere lysregistrerende øyeflekker.

1.1.6 Bevegelse

Rotatoriene beveger seg ved hjelp av ciliokransen og foten. I tillegg vil muskelsammentrekninger i kroppen hjelpe til med bevegelsen. Svømmeaktiviteten blir påvirket av temperatur, salinitet, amoniakk konsentrasjon, pH, oksygen nivå og fôrkonsentrasjon. Svømmehastigheten kan være en indikator på om forholdene i kulturen er bra eller dårlig.

1.1.7 Reproduksjon

I rotatoriekulturer er normalt alle individene hunndyr. Så lenge kulturbetingelsene er gode vil populasjonen øke ved hjelp av partenogenese (ukjønna formering). Diploide hunndyr produserer

diploide egg (amiktiske egg), som vil klekke og utvikle seg til et diploid hunndyr. Seksuell reproduksjon kan skje ved spesielle omstendigheter, og haploide hanndyr vil bli produsert. Mekanismene bak skifte i seksuell og aseksuell formering er ikke helt klarlagt, men laboratoriestudier inkluderer næringstilførsel, tetthet, salinitet og genetiske faktorer (Pourriot and Snell, 1983, Serra and King, 1999, Ricci, 2001). Diploide hunndyr kan enten bli amiktiske eller miktiske og morfologisk er de umulig å skille. Amiktiske hunndyr produserer ved parthenogenese (jomfrufødsel) diploide egg som utvikler seg ved mitose* til hunndyr, mens miktiske hunndyr produserer partenogenetisk haploide egg ved meiose. Dersom en miktisk hunn ikke parer seg og egget ikke befruktes, så utvikles det til et hanndyr. Hanndyrene er mye mindre enn hunndyrene og de beveger seg veldig raskt. Etter kjønna formering vil det bli utviklet diploide hvileegg. Hvileeggene vil klekkes etter en hvileperiode (Hagiwara 1996, Lubzens et al. 2001), men de kan overleve mange år i sedimentene før de klekker.

**Mitose er celledeling som fører til to identiske celler, lik den cellen som delte seg, og med like mange kromosomer. Meiose er celledeling hvor antallet kromosomer halveres.*

1.2 Produksjon av rotatorier

Rotatorier kan dyrkes i mange typer systemer, alt fra små bøtter til store betongdammer på mange hundre kubikk. I klekkerier rundt omkring i verden finnes produksjonstanker av ulikt materiale, størrelse og form. Det mest vanlige i norske klekkerier er runde plast eller glassfiber tanker med konisk bunn på ca. 1-5 m³, men også større tanker med flat bunn på 5-10 m³ blir benyttet. Tankene tilsettes luft via luftesteiner, som sørger for omrøring og oksygen tilførsel ved lave tettheter. Ved høyere tetthet (>500 ind/ml) er det i tillegg nødvendig å ha et system for tilsetning av ren oksygen. Det benyttes ulik temperatur og saltholdighet på vannet avhengig av hvilken rotatorie art som produseres. Vannet som benyttes bør være godt filtrert (ned til 1µm) for å redusere risikoen for forurensning. De vanligste artene benyttet i norske klekkerier dyrkes på 20-28 °C og ved en saltholdighet på 20-35. I Japan blir rotatoriene føret med konsentrerte alger (ferskvanns *Clorella*). Denne algen er nå kommersielt tilgjengelig i Norge, og flere klekkerier benytter seg av denne i sin produksjon. Da *Chlorella* inneholder lite av visse typer fettsyrer som EPA og DHA blir de produserte rotatoriene lite egnet som fôr til marine fiskelarver. Rotatoriene må derfor anrikes med et eget anrikingsfôr etter produksjonen. Rotatorier kan også dyrkes på vanlig bakegjær sammen med en emulgert olje, eller andre kommersielle dietter typisk bestående av en blanding av gjær og mikroalger tilsatt vitaminer og mineraler.

1.2.1 Dyrkingsmetoder

Ulike metoder kan benyttes for dyrking av rotatorier. Disse kan beskrives som batch-, semikontinuerlig- og kontinuerlig dyrking. Batch kulturer er produksjon i lukket system med tilgang på luft, oksygen og fôr. Kulturene startes vanligvis på relativ lav tetthet, og høstes i sin helhet etter noen få dager når kulturen har oppnådd en tetthet på 3-4 ganger av start tetthet. Kontinuerlige kulturer er åpne kultursystemer som tilføres de nødvendige ressursene og høstes regulært ved å erstatte et bestemt volum av kulturen per dag (semikontinuerlig) eller kontinuerlig. Begge metodene, samt tilpassede kombinasjoner av metodene blir benyttet i klekkeriene i dag. Når det gjelder valg av dyrkingsmetode vil rotatoriekvalitet, skala for produksjonen, kostnader, risiko og klekkerirutiner påvirke valg av metode. Kunnskap om rotatoriebiologi, ernæring, omgivelsesbehov og egenskaper ved produksjonssystemet er viktig for å oppnå stabil og sikker produksjon av rotatorier.

1.2.2 Telling av rotatorier

Det er viktig å beregne riktig tetthet av rotatoriene i en kulturtank pga. at dette tallet er grunnlaget for beregning av fôrdoser. Det er mange muligheter for feilkilder, som f.eks. ved uttak fra kultur tank, uttak fra prøveglass, kalibrering av pipette og menneskelige faktorer. Det er derfor en fordel at samme person har ansvar for disse analysene. Prøvetaking kan gjøres ved bruk av en lang glasstav som senkes ned i kulturen. Denne fylles flere ganger over i et begerglass. Fra begerglasset blir 12 prøver tatt ut (25, 50 eller 100 ul). Det er viktig at prøven er homogen ved uttaket. Dette kan gjøres ved å slå innholdet i begerglasset over i et nytt glass rett før uttaket. Både antall rotatorier og antall egg telles i alle dråpene, deretter fjernes det høyeste og det laveste tallet, og gjennomsnittet beregnes. Regn om til antall dyr per ml, og beregn total biomasse i tanken. Biomassen kan deretter benyttes til beregning av daglig fôr dose. Eggratioen er bestemt av antall egg dividert på antall rotatorier i prøven. Eggratio eller eggfrekvens (antall egg per rotatorie) er en viktig indikator for å vurdere kulturstatus. Dette tallet vil gi en indikasjon på forventet vekst til neste dag. Eggratio vil, slik som veksthastighet, avhenge av fôr kvalitet og kvantitet, oksygennivå, ammoniakk nivå, pH, temperatur og salinitet.

1.2.3 Vannkvalitet

Rotatoriekulturer må observeres daglig siden larveproduksjonen i marine yngelanlegg er helt avhengig av en stabil og forutsigbar produksjon av høykvalitets rotatorier. Et vanlig problem i rotatorieproduksjonen er overfôring, som i neste omgang kan føre til oksygenmangel eller for høye ammoniakkonsentrasjoner. Det optimale ammoniakk nivået er $<1\text{ mg l}^{-1}$ og et akseptabelt nivå for ammoniakk og nitrat er $6-10\text{ mg l}^{-1}$ (Lubzens, 2003). I vann vil ammoniakk finnes i to former: NH_4^+ (ammonium) og NH_3 (ammoniakk). NH_3 er giftig for rotatoriene, og andelen av

NH₃ i kulturvannet blir påvirket av temperatur, salinitet og pH. Den optimale pH i rotatoriekulturer er 7,5-8,5 (Hirano 1987). For å sikre omrøring og tilstrekkelig oksygen til kulturrene blir luft og oksygen tilsatt over konen i kulturtankene. Oksygennivået bør være over 4ppm. De fleste klekkerier har automatisk overvåkning og dosering av oksygen konsentrasjonen i vannet. Dette gjør det enkelt å holde oksygeninnholdet godt innefor tålegrensen til rotatoriene og kulturrene har typisk en oksygenmetning på 90-100 %.

1.3 Ernæring

Rotatorier kan spise et stort spekter av partikler, inkludert bakterier, protozoer, mikroalger og dødt organisk materiale. Rotatorier kan spise partikler innen en viss størrelse, så det er derfor viktig å sjekke partikkelstørrelse på kultiveringsfôr og anrikingsfôr. *B.plicatilis* er i stand til å konsumere større partikler enn *B. rotundiformis*. I tillegg til partikkelstørrelse må fôret tilfredsstillende de ernæringsmessige kravene og gi tilfredsstillende hygieniske forhold i kulturtankene. Mange arter av mikroalger er perfekt fôr for rotatorier. Det finnes flere ulike konsentrat av mikroalger som er kommersielt tilgjengelig. Bruk av mikroalger som fôr gir ofte høyere eggratio og veksthastighet, i tillegg til lavere bakterietall enn ved bruk av formulerte dietter eller bakegjær. Mikroalgediettene er ofte mer kostbare enn gjær og andre kulturfôr. En relativt billig diet kan være bakegjær sammen med en liten andel mikroalger (5-10 %). En annen fordel med bruk av mikroalger er at overføring tåles bedre enn ved gjærbaserte dietter. Som regel så vil ikke kultiveringsdiettene inneholde nok av de næringsstoffene som fiskelarven trenger, så rotatoriene må korttidsanrikes noen timer før de benyttes som fôr til fiskelarvene.

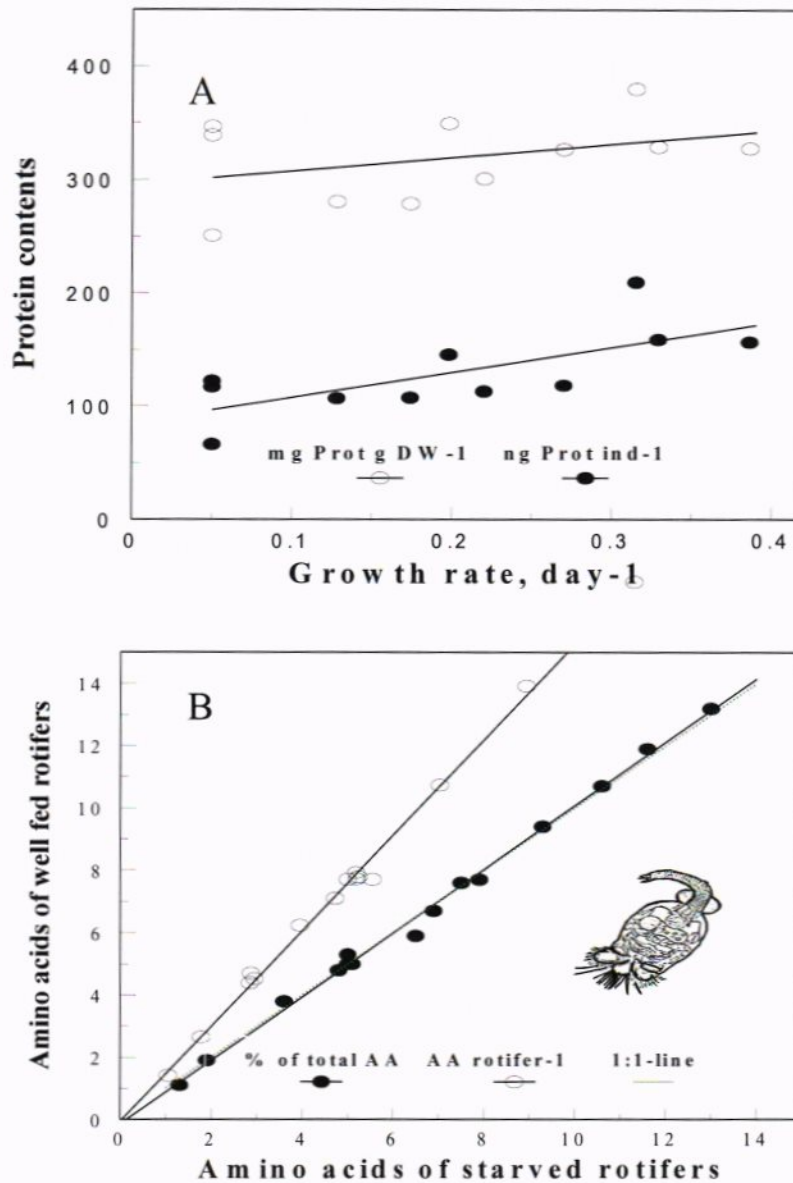
1.3.1 Protein

Protein er hovedbyggesteinene for biomasse, og mengden vil reflektere energinivået i organismen. Proteinnivået per rotatorie er en dynamisk variabel som er relatert til fôrtilgjengeligheten og veksthastigheten. I litteraturen blir proteininnholdet rapportert til å være 28-63 % av tørrvekt. Denne store variasjonen kan skyldes ulike analysemetoder, men også en reell variasjon i individuelt proteinnivå hos rotatoriene. I nitrogenbaserte estimer for protein innhold benyttes ofte omregningsfaktoren 6,25 mg protein/mg nitrogen. Denne faktoren overestimerer proteininnholdet på samme måte som sum aminosyrer kan underestimere proteininnholdet. En omregningsfaktor på 4,2 mg protein/mg nitrogen er etablert ved testing av både nitrogen og aminosyrer (Øie and Olsen, 1997, Lie et al. 1997). Proteininnholdet per rotatorie er relatert til fôrkilde og spesifikk veksthastighet. Proteininnholdet i en rotatorie er vanligvis 100-200 ng protein per individ (type Nevada), hvor det laveste tallet representerer en sultet rotatorie og det

høyeste tallet representerer en fôret rotatorie. Proteinverdier per tørrvekt gir mindre variasjon på grunn av at en stor del av tørrvekten er protein. Selv om proteininnholdet per individ varierer i rotatorier, så er aminosyreprofilen lik. Den blir ikke påvirket av fôrmengde eller fôrkvalitet som tilbys rotatorien.

Protein er hovedkomponenten i fiskevev, og utgjør 65-75 % av total kroppsvekten (Wilson 1989). Proteiner er viktig for en lang rekke livsfunksjoner (enzymer, hormoner, immunforsvar, transport av småmolekyler, bevegelse). De grunnleggende byggesteinene i alle proteiner er 20 ulike aminosyrer. Optimalt diett protein nivået for fisk, som for andre dyr, er avhengig av diett protein til energi balansen, aminosyre sammensetningen, proteinenes fordøyelighet, og andel av ikke-protein energi kilder i dietten (Wilson, 1989). Det finnes lite informasjon om protein behovet hos fiskelarver.

En vanlig misforståelse er at protein og aminosyre innholdet i rotatorier er konstant og uavhengig av vekst forholdene. Dette skyldes stabile aminosyreprofiler, så prosent aminosyre innhold av totale aminosyrer er uavhengig av fôringsforholdene, men protein per rotatorie er signifikant høyere i rotatorier med høy veksthastighet, enn i sulta rotatorier. Proteininnholdet øker med økende veksthastighet i kulturen (Figur 1). Det er derfor en forenkling å konkludere med at protein og aminosyre innholdet i rotatorier er konstant.



Figur 1. A: Innhold av protein pr. tørrvekt og pr. individ i rotatorier dyrket ved ulike veksthastigheter. B: Sammenheng mellom aminosyre mengden i sulta og velfødde rotatorier uttrykt ved % AA av totale AA og AA per rotatorie.

1.3.2 Lipider

Lipidnivået og fettsyresammensetningen i rotatorier gjenspeiler sammensetningen i dietten, rotatoriernes metabolisme og genetiske egenskaper. Rotatorier er gjennom evolusjon adaptert til varmt vann og deres behov for omega 3 fettsyrer er relativt lavt. Diett lipider vil derfor påvirke sammensetningen av både triglyserider og fosfolipider. Diettsammensetningen er derfor helt avgjørende siden metabolsk aktivitet er mindre viktig. Rotatorier egner seg derfor godt til fettsyre

manipulering. Fettsyresammensetningen i triglyseridene blir lik lipidsammensetningen i diett lipidet.

Rotatorienes innhold av essensielle n-3 fettsyrer kan bli fullstendig kontrollert ved å velge riktig lipidekilde under dyrkingen. Når prosentandelen av n-3 fettsyrer er kjent, kan rotatorienes innhold av n-3 estimeres fra følgende ligning (Olsen, 2004).

$$\text{Rotatorie } \%_{n-3} = 0,86 * F\hat{o}r\%_{n-3} \quad (1)$$

$$\text{Rotatorie } \%_{EPA} = 0,81 * F\hat{o}r\%_{EPA} \quad (2)$$

$$\text{Rotatorie } \%_{DHA} = 0,72 * F\hat{o}r\%_{DHA} \quad (3)$$

1.3.3 Marine fiskelarver har behov for essensielle fettsyrer i dietten

Det er i løpet av de siste 10-20 år, vist at marine fiskelarver har essensielt krav om bestemte næringskomponenter. Dette gjelder spesielt flerumettede n-3 fettsyrer. Dette kravet kan gjenspeiles i sammensetningen av fettsyrer i egg. Egg fra marin fisk har høyt innhold av de essensielle fettsyrene EPA og DHA, og egg fra de fleste arter hos oss har et DHA/EPA forhold på ca 2 (Tabell 1). Dette er relativt generelt, slik at forholdet mellom DHA/EPA i rotatoriene bør ligge i overkant av 2 for at de skal være fullverdige for marine fiskelarver.

Tabell 1. Innhold av fettsyrene arakidonsyre (ARA), eicosapentaensye (EPA) og docosahexaensyre (DHA) i fosfolipid i egg av torsk, sild, sei og hyse (Data fra Tocher & Sargent, 1984).

Fettsyre	Torsk	Sild	Sei	Hyse
ARA (%)	1,9	1	1,6	3,7
EPA (%)	15,3	13,7	11,5	12,6
DHA (%)	28,6	31,4	27,7	27,6
DHA/EPA	1,9	2,3	2,4	2,2
EPA/ARA	8,1	13,7	7,2	3,4

Fiskelarver, som torsk, har begrenset evne til å syntetisere de langkjedede flerumettede fettsyrene DHA og EPA. Disse fettsyrene sammen med noen få andre blir ofte benevnt som n-3 HUFA (highly unsaturated fatty acids). Som vist i Tabell 1 inneholder fiskeegg relativt mye av disse fettsyrene og dette er en indikasjon på at larvene har et essensielt behov av fettsyrene. I den første startfôringsfasen vokser larvene raskt og utvikler syn hjerne og nervevev som er helt fundamental for den videre veksten i senere livs faser. Spesielt DHA er viktig i dannelsen av slikt vev og larvene må derfor få tilført de essensielle fettsyrene gjennom dietten. Og i den første fasen er

rotatoriene den viktige dietten. Nærings sammensetningen i rotatoriene kan manipuleres slik at sammensetningen kan styres mot den vi tror er best for torskelarvene.

Rotatorier (*Brachionus plicatilis*) har ikke et ernæringsmessig krav om fettsyrer som vist i Tabell 1, og har derfor ofte et lavt innhold av flerumettede n-3 fettsyrer. Slike fettsyrer kan imidlertid lett bygges inn i rotatoriene ved valg av riktig diett. En slik prosess benevnes ofte for anriking, "anriking med essensielle fettsyrer", ved at man velger en diett som har høyt innhold av n-3 fettsyrer slik at rotatoriene får tilsvarende høyt innhold.

1.3.4 Problemer med oksiderte emulsjoner

Anrikingsemulsjonene har høyt innhold av flerumettede fettsyrer, og disse fettsyrene er utsatt for oksidering (harskning). For å unngå, eller begrense, oksidering blir emulsjonene tilsatt antioksidanter. Likevel er dette et problem for de fleste fettemulsjonene som brukes. En viktig årsak til dette problemet er at emulsjonene oppbevares i flasker og pakninger som brukes over en viss tid etter at de er åpnet. Resultater fra forsøk som er gjennomført for å undersøke stabilitet av emulsjoner og for å undersøke effekt av bruk av oksiderte emulsjoner, viser at:

1. Rotatorier kan bli anriket med oksiderte emulsjoner uten negativ effekt på vekst reproduksjon og overlevelse hos rotatoriene.
2. Næringsverdien av rotatorier anriket med oksiderte emulsjoner dårligere enn ved bruk av ikke oksiderte emulsjoner.
3. Innholdet av DHA og EPA var lavere i rotatorier anriket med oksiderte emulsjoner
4. Lavere innhold av aminosyrer, spesielt metionin, i rotatorier anriket med oksiderte emulsjoner.

1.3.5 Karbohydrat

Karbohydrat innholdet i rotatorier varierer fra 11-27% av tørrvekten, og de består hovedsaklig av glukose (61-80%), ribose (9-18%) og 0,8-7% galaktose, mannose, deoxyglukose, fruktose og xylose (Whyte and Nagata, 1990, Frolov et al. 1991, Frolov and Pankov 1992, Nagata and Whyte 1992, Fernandez-Reiriz et al 1992).

1.3.6 Mineraler

Mineralinnholdet i rotatorier er generelt lavere enn i copepoder, unntatt kalsium, magnesium og jern. Innholdet av magnesium og selen er også lavere i rotatorier enn det som er anbefalt behov

for større fisk av NRC (1993). I eksperiment hvor rotatoriene ble anriket med selen og jod, økte overlevelsen hos torskelarver med 32% (Hamre et al 2008).

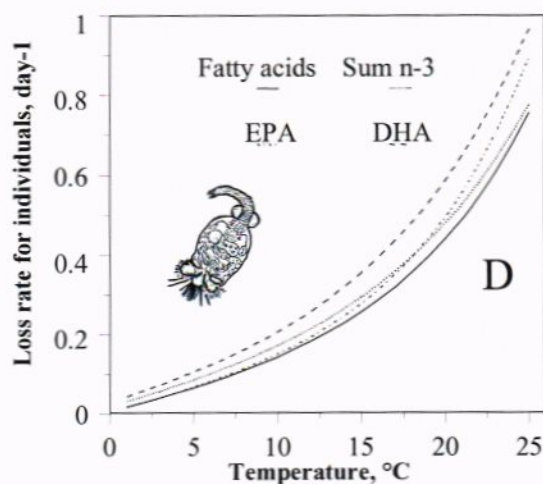
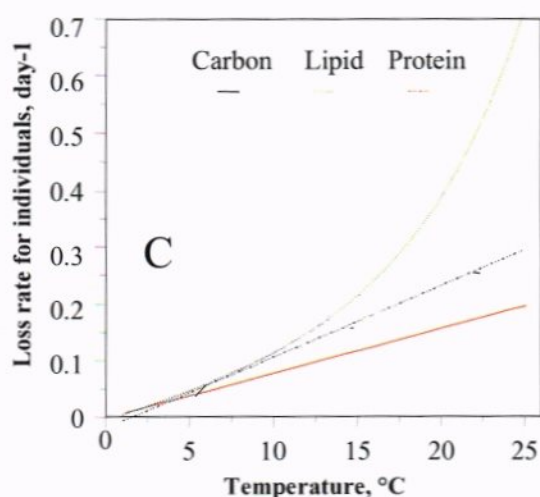
1.3.7 Vitaminer

Vitaminbehovet for de fleste fiskelarver er ikke kjent. Mange studier har funnet en direkte effekt mellom mange vitaminer og brusk og beindannelse i tidlige stadier av fiskelarvens liv. Det er anbefalt at rotatoriene anrikes ned vitamin C,E,A og B1 (Thiamin), men det absolutte behovet er ikke kjent. Rotatorier har et krav til vitamin B12.

1.4 Vasking og lagring av rotatorier før utføring til fiskelarver

Ved anriking av rotatorier vil valg av anrikingsfôr ha en sterk innvirkning på bakterieantallet i produksjonstanken. Anriking med alger gir en langt lavere bakteriebelastning enn anriking med ett mel/pulver produkt. For at bakteriebelastningen i fisketankene skal bli minst mulig er det viktig å vaske rotatoriene godt før utføring. Rotatoriene bør vaskes i vann med samme temperatur og salinitet som ved anrikingen.

Etter vasking bør rotatoriene sakte kjøles ned før utføring. Rotatoriene tåler store variasjoner i både temperatur og salinitet, dersom variasjonene skjer gradvis. Raske skiftninger i temperatur eller salinitet (eks. for kaldt vaskevann) bør unngås. Dette kan føre til at rotatoriene immobiliseres og blir liggende urørlige i lang tid. Ved nedkjøling konserveres næringsverdien i rotatoriene slik at de kan brukes som fôr over en lengre periode enn dersom de lagres ved produksjonstemperatur. Figur 2 viser tapsraten for lipid er ca. 40 % per dag ved 20 °C, men ved en sakte nedkjøling til 10-15 °C vil tapsraten reduseres til 10-20 % per dag for lipid. Figuren viser også at DHA nivået avtar raskere enn de andre fettsyrene.



1.5 Stamkultur

Rotatorier fra de ulike arts linjene kan oppføre seg ulikt med hensyn på vekst kinetikk, saltholdighets og temperatur optimum (Gómez et al., 1997), som kan influere på produksjonseffektiviteten. Hvilken innvirkning ulike arter rotatorier har og hvordan blanding av ulike arter har på effektiviteten i rotatorie produksjonen ved klekkeriene er ukjent. Studier som tok for seg genetisk karakterisering av ulike stammer rotatorier fra ulike europeiske klekkerier (Papakostas et al., 2006; Dooms et al., 2007) avslørte at de fleste klekkerier i virkeligheten kultiverte rotatorie arter som var forskjellig fra hva de selv trodde de hadde. Resultatene viste at mange klekkerier hadde kulturer med et dominerende innslag av arten Cayman, og i mindre grad arten Nevada.

Uten et system for hold av stamkulturer kan det være en risiko for at rotatorie arter forvinner og blir utilgjengelig for klekkeriene. Det har også etter hvert kommet hvile egg fra en del arter rotatorier som kan kjøpes, dette kan være en grei strategi hvis hvileegg er tilgjengelig fra de rotatorie artene en ønsker å benytte på klekkeriet. Hvileegg kan desinfiseres og faren for kontaminering av ciliater og patogene bakterier vil være redusert. Det er fullt mulig å holde stamkulturer på anleggene hvis ønskelig, evt kan klekkeriene leie inn et miljø som de mener er i stand til å holde slike kulturer som en "backup" for seg. Det stilles store krav til nøyaktighet, stabile forhold og til god hygiene når en skal holde stamkulturer. Det er en fordel om levende alger kan dyrkes i samband med stamkultur hold men dette er ikke en absolutt nødvendighet. Det er mulig å holde stamkulturer også på pasta alge blandinger, men vil da kreve en tettere oppfølging i forhold til om en har tilgang på levende alger.

Sentrifuge rør (50 ml konisk bunn) eller cellekultur flasker (50-250ml) er gode beholdere for hold av stamkulturer. Ideell fortynningshyppighet er noe avhengig av hvilken art en holder og er også avhengig av arten sin vekst under de forholdene den blir holdt ved. Dette kan variere noe men det er viktig å fortynne før det blir for tett og før bunnvannet blir "dårlig". En grei kjøreregulering kan være å inokulere med rundt 2 rotatorier per ml og fortynne ved 200 rotatorier per ml. Ved tynning blir rotaotriene skylt og en liten andel brukt for vedlikehold av stamkulturen og resten kan brukes til oppskalering til ny produksjonskultur.

Hygiene er svært viktig, og spesielt dersom en holder flere arter rotatorier. Det kan være stor risiko for blanding av arter, og da vil den arten som vokser best under de gjeldende forhold være

den dominerende ved oppskalering til produksjonskulturer. Utstyr tilhørende en art bør holdes adskilt fra utstyr tilhørende andre arter, og hender bør desinfiseres eller vaskes i såpevann mellom håndtering av rotatorier typene. Det kan være greit å benytte sterilt vann hvis en har muligheten for dette (som f.eks autoklavert eller klore/avklore som benyttes på enkelte laboratorier), evt kan vann til stamkulturer kokes (og avkjøles) før bruk (justere med ferskvann hvis salinitet er utenfor ønsket område). Men, et kontinuerlig vedlikehold av stamkulturer vil ikke eliminere risiko for bakteriell kontaminering.

Hvis en ønsker å vite hvilken art en har er det mulig å sende inn for verifisering, flere laboratorier internasjonalt kan disse metodene. SINTEF Fiskeri og havbruk har også etablert metoder for å kunne gjøre slike analyser av de mest brukte typene rotatorier.

1.6 Mikrobiell kontroll

Når man dyrker rotatorier i kultur dyrker man samtidig mikroorganismer. Fôring, feces, rester fra døde dyr, høy temperatur og lufting gir gode vilkår for vekst av bakterier og sopp i rotatoriekulturer. Men rotatoriene er "filter-feeders" og filtrerer vannet for mikroorganismer som de fordøyer, og på denne måten kan bakterienivået holde seg relativt jevnt. Bakteriekoncentrasjonen i en rotatorie avhenger av flere faktorer, som størrelse, kondisjon og helsetilstand på rotatoriene, og fôrkonsentrasjon (partikkeltetthet) og bakterietetthet i kulturvannet. Derfor kan bakterietallet pr individ variere fra noen hundre til mange tusen, uten at det behøver å være fare for sammenbrudd av kulturen. Som en tommelfingerregel sier vi at nivået bør ligge rundt 1000 CFU/individ.

Friske og sultne rotatorier filtrerer mange bakterier og vil på den måten bidra til å regulere bakterietettheten i en kultur. De fordøyer bakteriene fortløpende men vil likevel inneholde mange levende bakterier, enten som de nettopp har tatt opp fra kulturvannet og ikke har fordøyd enda, eller som vokser i fordøyelseskanalen eller utenpå dyrene. Rotatorier i dårlig kondisjon vil også kunne inneholde mange bakterier, trolig på grunn av at rotatoriene ikke klarer å fordøye dem lenger slik at bakteriene kan fortsette å vokse i og på rotatoriene. I dårlige kulturer som nærmer seg sammenbrudd ser man gjerne høye bakterietall. Sultede rotatorier inneholder få bakterier, på grunn av at filtreringsaktiviteten er lav ved lav fôrkonsentrasjon (Skjermo&Vadstein, 1993).

En kultur av god kvalitet bør ikke ha rotatorier med høye bakterietall, da dette medfører tilførsel av store mengder bakterier til fiskelarvene. Fiskelarvene tåler selvsagt bakterier, men levendefôrkulturer inneholder gjerne en stor andel opportunistiske bakterier, deriblant typer som

kan utkonkurrere de normale bakteriene i larvenes tarm og dermed forstyrre fordøyelsen og den normale tarmfunksjonen, eller typer som kan være patogene for fiskelarver og forårsake infeksjoner. Sammensetningen av mikrofloraen er altså like viktig som antallet bakterier. Rotatorienes flora gjenspeiler den som er i kulturvannet (Skjermo&Vadstein, 1993). Den er dermed lett å skifte ut med andre bakterier, men stabiliteten er svært lav (Skjermo&Vadstein, 1999).

Rotatoriekulturer er komplekse systemer og det er ikke nødvendigvis enkelt å ha en god mikrobiell kontroll i dem. For å bestemme bakterietall i rotatorier kreves egnet utstyr, medier og helst sterile betingelser og det tar noen dager før man vet resultatet. Det vil derfor normalt være for krevende å registrere bakterietall i den daglige driften av en levendefôrproduksjon. For å tilstrebe mikrobiell kontroll i rotatoriekulturene bør man heller etablere gode rutiner for hygiene og nøyaktig fôring av kulturene, samt bruke dietter av høy kvalitet. I vår strategi for mikrobiell kontroll i marin yngelproduksjon (Vadstein et al., 1993) opererer vi med tre elementer, og innenfor disse er det flere tiltak som er aktuelle i rotatorieproduksjon:

1) Ikke-selektiv reduksjon av bakterier

- fjerne bakterier ved desinfeksjon, spesielt aktuelt som smittebarriere
- redusere tilførsel av organisk materiale (fôr) gjennom balansert fôring
- fjerning av organisk materiale (fôrrester, døde dyr) ved god vasking, spesielt før utfôring til fiskelarvene
- beiting av bakteriene ved å sørge for god kondisjon på rotatoriene

2) Selektiv styring av bakterier

- stabilisering av bakteriefloraen ved bruk av resirkulering av vannet
- tilførsel av probiotika (gunstige, levende bakterier), prebiotika (stimulerer de gunstige bakteriene) og mikroalger

3) Styrking av individets resistens mot mikroorganismer

- ernæring (evt. immunstimulanter til fiskelarvene)

De ikke-selektive metodene bør være selvsagte i enhver levendefôrproduksjon. Det finnes også gode teknikker og produkter for de to siste elementene, men vi anbefaler at man stiller krav til god dokumentasjon på effekt og setter seg godt inn i bruken før man velger om man skal bruke dem.

1.7 Ny teknologi

1.7.1 Dyrking av rotatorier i resirkuleringssystem

I løpet av de siste årene er det blitt forsket på mer intensiv og kontrollert produksjon av rotatorier. Det er nødvendig å øke intensiteten av kulturene da klekkeriene er blitt større, og trenger større mengder med rotatorier. Samtidig som intensiteten av kulturene økes må nærings- og bakterieinnhold overvåkes, slik at kvaliteten på rotatoriene opprettholdes.

Ulike metoder for høytetthetsproduksjon av rotatorier er utviklet både i Belgia og Japan. Disse metodene er utviklet for *B. rotundiformis*, og vil ikke fungere direkte for *B. plicatilis*. I Japan blir membran filtrert vann (0,1 µm filter) brukt i rotatorieproduksjonen. Produksjonen er i tillegg basert på innblåsing av ren oksygen, samt streng pH-kontroll og fjerning av avfall i kulturene ved hjelp av spesielle filter. I Japan blir rotatorien *Brachionus rotundiformis* dyrket i tettheter på 10000-30000 rotatorier per ml (Yoshimura et al. 1996). I enkelte småskala forsøk er tettheten kommer opp i over 100 000 dyr/ml (Yoshimura et al. 2001). Denne dyrkingsmetoden er også prøvd på *Brachionus plicatilis* og tettheten har kommet opp i ca. 2000 dyr/ml (Fu et al, 1997).

Ved universitetet i Gent, Belgia, er det utviklet et resirkuleringssystem for produksjon av rotatorier. Dette er et fullstendig lukket resirkuleringssystem hvor avløpsvann fra produksjonstankene blir rensed ved hjelp av proteinskimmere med ozon og filtrering gjennom et biofilter. Etter den biologiske filtreringen blir det behandlede vannet tilført til produksjonskarene igjen med en daglig fornyelse på 500 % (Suantika et al. 2000, Suantika et. al. 2001). Denne produksjonsmetoden gir rotorietettheter på 7000-22000 rotatorier per ml. Problemet med denne metoden er at ozon dreper en del av de nitrogenfikserende bakteriene i biofilteret, slik at nytt medium jevnlig må tilsettes i biofilteret. I tillegg er det problemer med rensing av filteret.

Enkelte norske klekkerier har også kjøpt inn ferdige systemer fra Aquatic Eco-systems for produksjon av rotatorier. Disse systemene inneholder noen av komponentene som kjennetegner et resirkuleringssystem (biofilter og protein skimmer). Tester utført ved SINTEF fiskeri og havbruk viser imidlertid at disse systemene ikke kan betegnes som ekte resirkuleringssystem da rensesprosessene ikke er fullgode samt at det må tilføres for mye spedevann til at det oppfyller kravet til et resirkuleringssystem. Dette reduserer stabiliteten som kjennetegner ekte resirkuleringssystem. Enkelte anlegg rapporterer likevel å ha stabil produksjon ved 7000-8000

individ/ml og lavere fôrfaktor sammenlignet med gjennomstrømssystem. Dette viser at systemet fra Aquatic kan være en løsning som bør vurderes ved innkjøp av nye produksjonsenheter.

Ved SINTEF Fiskeri og havbruk er det de siste årene blitt arbeidet mye med å videreutvikle produksjonssystem for rotatorie produksjon. Tester viser at det ved hjelp av resirkuleringssystem er mulig å produsere rotatorier kontinuerlig og kontrollert ved høye tettheter. Bruken av slike systemer krever mer kompetanse og mer og bedre overvåkning av kulturene og medfører en økt risiko for kultur krasj sammenlignet med tradisjonelle gjennomstrøm kulturene. Det gjenstår ennå en del arbeid før man kan konkludere med at gevinsten med resirkuleringssystem gjør det hensiktsmessig å investere i dette på yngelanleggene, men slike systemer kan gi økt mikrobiell stabilitet i rotatorie produksjonen som igjen vil kunne gi en gevinst i form av økt vekst og overlevelse i larve og yngel fasen.

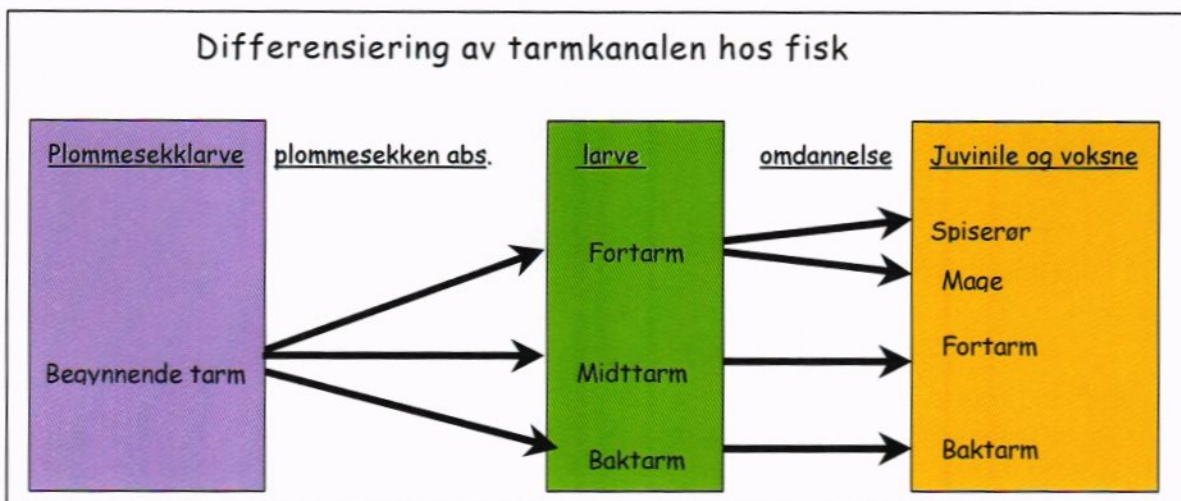
1.7.2 Automatisk telling av rotatorier

I et samarbeid mellom SINTEF, NTNU og Thelma har det blitt utviklet en planktonteller (Alver et al. 2007) som automatisk kan overvåke tettheten av rotatorier både i rotatoriekulturer og i startfôringskar. Telleren bruker en pumpe og et sett av ventiler for å pumpe inn vannprøver fra slanger plassert i karene som skal overvåkes, og prøvene sendes gjennom et glass rør hvor de fotograferes av et digitalt kamera. Belysningen av glasset er tilpasset for å gi bilder med god kontrast. Hvert bilde analyseres for å beregne antall synlige rotatorier, og dette brukes for å beregne tettheten i hvert kar. Telleren beregner tettheten ut fra et utvalg på 10-50 bilder for å sikre at det statistiske utvalget er stort nok til å gi nøyaktige målinger. Telleren har et grafisk grensesnitt på en PC som gir enkel bruk og tilgang på alle tidligere målinger som er gjort for hvert enkelt kar. Målingene kan også benyttes til å gjøre fôringen av kulturene mer nøyaktig ved at de benyttes til kontinuerlig oppdatering av fôrtabeller som benyttes. Planktontelleren er ennå ikke kommersielt tilgjengelig med det jobbes med å få til dette.

1.8 Fordøyelse i marine fiskelarver

Fôrutvelgelse, fordøyelse og assimilasjon av fôret er kritisk for vekst og overlevelse hos fiskelarver. Fiskelarver har ett fordøyelsessystem som er veldig forskjellig fra voksen fisk. Ved startfôringen er larvens tarmkanal funksjonell, men morfologisk, histologisk og fysiologisk mindre kompleks enn hos voksne fisk. Fiskelarvenes tarmkanal forblir uforandret fram til metamorfose. Ved metamorfose forandres tarmkanalen, slik at den blir lik voksen fisk (Figur 3).

Assimilasjonseffektiviteten kan være lavere hos larver enn hos voksne fisker på grunn av mangel på funksjonell mage hos larvene.



Figur 3. Differensiering av tarmkanalen hos fisk.

Hos marine fiskelarver utvikles bukspytt kjertel og lever forholdsvis tidlig, noe som demonstrerer deres rolle for fiskelarvens videre vekst og utvikling. Bukspytt kjertelen (eksokrin) er en kilde til viktige enzymer som deltar i hydrolyse av lipider i tarmen før lipider blir absorbert i tarmens epitel. Leveren er sentral for omsetning, omdanning og forberedelse for transport av næringsstoffer til vevet. Fiskelarvene har høy vekst hastighet i den første fasen av deres liv. Siden veksten i all hovedsak er økning i kroppens muskel masse, vil de ha et stort behov for aminosyrer fra kosten. Fiskelarver som utvikler mage sent, har en lav proteolytisk kapasitet i fordøyelsessystemet ved startfôring, og in vivo studier har vist høyere absorpsjon av frie aminosyrer enn peptider og protein bundne amino syrer fra larvens tarm i den tidligste fasen etter klekking (Rønnestad et al. 1999). Delvis hydrolyse av proteiner er også funnet å være fordelaktig i dietten for de tidligste stadier hos noen arter av marin fisk (Zambonini Infante et al. 1997; Cahu et al. 1999; Kvåle et al 2009).

Fiskelarver synes å inneha de viktigste lipolytiske enzymer fra omkring det tidspunkt hvor de begynner å spise (Hoehne-Reitan and Kjørsvik, 2004). Fosfolipase A2 og gallesalt avhengig lipase er blant de enzymene som er blitt funnet allerede plommesekk fasen (Ozkizilcik et al., 1996; Evans et al., 1998; Ribeido et al., 1996; Lazo et al., 2000; Hoehne-Reitan and Kjørsvik 2001).

2 DYRKING OG ANRIKING AV ROTATORIER (DP2)

2.1 Bakgrunn

Norske klekkerier for torsk har over de senere årene arbeidet målbevisst for å forbedre produksjon og øke næringsverdien av rotatorier, og har gjennom dette arbeidet gjort store fremskritt. Dette målrettede arbeidet resulterte i økt produksjon av yngel i årene frem til 2009. De finansielle utfordringene de siste årene resulterte i at mange klekkerier fikk problemer med å opprettholde sin produksjon og per i dag er bare et par klekkerier i operativ drift for å produsere torskeyngel, mens de aller fleste andre nå har gått over til produksjon av leppefisk for å avhjelpe de prekære problemene med lakselus i Norske lakseanlegg. Erfaringene man skaffet seg i perioden før de finansielle problemene er viktige både for de anleggene som fortsatt er involvert i produksjon av torskeyngel og for de av disse anleggene som nå er involvert i produksjon av leppefisk.

Mikroalgen DHA *Chlorella* sp. var og er i bruk i de aller fleste av disse klekkeriene, og ved bruk av dette produktet har man erfart svært høy vekst av rotatorier gjennom dyrkningsfasen. Imidlertid var der også perioder hvor man opplevde lav vekst og problemer i rotatorie-kulturene. Man har mistenkt utarming av mikronæringsstoffer som en av årsakene til periodevis lav vekst.

Samstundes hadde man ikke helt oversikt over kvaliteten av rotatorier produsert under disse forholdene med svært høye vekstrater, og klekkeriene ytret ønske om mer kunnskap omkring hvordan næringsverdien av rotatorier ble påvirket ved langvarig kultivering på DHA *Chlorella* og etter påfølgende anriking.

Man opplevde vekslende suksess i produksjonen av rotatorier og man erfarte perioder med svært høy produksjon etterfulgt av perioder hvor man hadde problemer med denne produksjonen. Det var et ønske om å klarlegge mer omkring disse forholdene med spesielt fokus på innhold av mikronæringsstoffene jod og selen. I tillegg var det et ønske om å finne næringsverdi av rotatorier fra denne produksjonen som senere var blitt anriket med de to anrikingsproduktene Multigain (Biomar) og Ori-green (Skretting).

Det var også et ønske om å kartlegge tilsvarende rotatorier produsert på Ori-culture med etterfølgende anriking med Multigain og Ori-green.

2.2 Mål

Hensikten med de dyrknings- og anrikningsstudiene som ble gjort var å undersøke næringsinnholdet av rotatorier (type Cayman) som var langtidsdyrket på:

1. DHA *Chlorella*
2. Ori-culture

Innhold av protein, lipid, fettsyrer, iod og selen skulle måles, og effekten av en anrikning med Multigain og Ori-green skulle undersøkes på samme vis.

Biokjemiske analyser ble designet slik at det var mulig å kalkulere innholdet av kalorier i rotatoriene, og disse ble beregnet basert på standard metoder brukt i næringsmiddelkjemien. I tillegg ble det tatt høyde for at næringsinnhold skulle beregnes i form av mg per g tørrvekt og innholdet per individ.

2.3 Materialer og metoder

2.3.1 Dyrkning av rotatorier

Rotatorier (*Brachionus plicatilis*, B. 'Cayman') ble langtidsdyrket i 34 ‰ sjøvann ved 24 °C for fire måneder i 250 L tanker med konisk bunn, utstyrt med sentralt plassert sil (64µm), lufting og 100 % vannutskifting per døgn. Daglig ble sil rengjort ved bruk av høytrykks-spyler. Daglig fôrdose med DHA *Chlorella* (2.4 ml per million rotatorier; Pacific Trading Ltd., Japan) ble blandet i sjøvann og distribuert gjennom døgnet ved hjelp av peristaltisk pumpe. Tankene ble rengjort regelmessig og tynnet slik at tetthet ble holdt rundt 600 dyr per ml. Flere batcher med DHA *Chlorella* ble brukt, og det ble utført anrikning av rotatorier som var blitt dyrket på "nyåpnet" *Chlorella* og *Chlorella* som hadde stått tre uker i kjøleskap ved 4 °C og dermed var nærmere utløpsdato for holdbarhet.

Alle som har brukt dette produktet kjenner godt til at det avgis en nokså streng odør for å si det forsiktig. En var derfor ikke helt trygg på om produktet holder konsistent kvalitet gjennom en lagringsperiode.

Samme type rotatorier ble satt opp for dyrkning med Ori-culture ().

2.3.2 Anrikning

Rotatorier ble høstet fra dyrkningskulturene, vasket i temperert (24 °C) og filtrert (1 µm) sjøvann og overført til 50 L anrikningstanker (34 ‰, 24 °C, tilsatt lufting) til en tetthet på mellom 350-400 dyr per ml. Rotatorier dyrket med DHA *Chlorella* (heretter kalt *Chlorella*) ble i separate forsøk

anrikt for 2 timer med Multigain (Biomar, Norge) og Ori-green (Skretting, Norge). Anrikninger ble utført i 3x3 replikat. Rotatorier ble skånsomt vasket i temperert vann ved 24 °C før de ble overført til egne anrikningstanker en time før de ble tilsatt anriknings medium. Det ble anrikt med 0,2 gram Multigain per million rotatorier, og anrikningsdosen ble mixet med stavmikser for 3 minutter i ferskvann (24-25 °C) før dette ble gitt til rotatorier. Det andre anrikningsproduktet; Ori-green ble mixet med stavmikser i sjøvann (24 °C) for 2 minutter, satt til hydrering for 20 minutter og mixet på nytt for 1 minutt. Anrikningsdose som ble benyttet var 0,25 g Ori-green per million rotatorier.

2.3.3 Prøveuttak

2.3.3.1 Karbon og nitrogen

Før anrikning og etter 2 timer anrikning ble prøver for tetthet, karbon og nitrogen analyser tatt ut. Prøver fra kultur ble vasket godt med filtrert sjøvann (1 µm) ved bruk av en sil (64 µm), og fortettet ned til 150 ml (med filtrert sjøvann) slik at det endte opp på rundt 2000 rotatorier per ml. Fra denne ble det så tatt ut 8 sub samples a 100 µl som ble overført til tinnbåter, og 24x 20 µl som ble overført til brønnbrett for senere tetthets- og egg registrering, disse prøvene ble tilsatt Lugol fytofix og antall rotatorier og egg ble registrert i hver av de 24 brønnene. Det ble lagt vekt på å oppnå lik distribusjon av rotatorier i begerglasset ved uttak av subsamples til CN som ble gjentatt ved uttak til tetthetsbestemmelse, samme person utførte samtlige prøveuttak. Tilslutt ble kulturvann silt fra (64 µm) og prøver av vannet ble overført til tinnbåter med samme prosedyre som prøveuttak inneholdende rotatorier (4x 100 µl).

Prøver (tinnbåter) som skulle analyseres for innhold av karbon og nitrogen ble tørket i 60 °C for minimum to døgn før de ble analysert på en element-analysator (Costech instruments).

2.3.3.2 Prøveuttak til andre biokjemiske analyser

Prøver til tørrvekt og askefri tørrvekt, samt innhold av iod, selen, lipid og fettsyrer ble tatt før anrikning og etter 2 timers anrikning. Rotatorier ble konsentrert (64 µm sil) og vasket godt i filteret sjøvann (1 µm). Biomassen ble deretter raskt skylt i ferskvann (8 °C) før silen ble tørket på baksiden av silen med papir, hurtig fordelt i prøveglass og øyeblikkelig frosset inn ved -80 °C, tilsatt nitrogen atmosfære og lagret ved -80 °C i påvente av videre arbeid og analyser.

2.3.4 Vanninnhold og askefri tørrvekt

Frosset biomasse ble tint og veid (omtrent 2g) i på forhånd veide keramiske digler, som ble tørket ved 105 °C til konstant vekt. Vekt av digler ble registrert på nytt (tørrvekt) og diglene brent ved 700 °C for 12 timer og vekt ble registrert (askefri tørrvekt vekt). Basert på disse vektene ble vanninnhold, tørrvekt og askefri tørrvekt i hvert prøveuttak bestemt.

2.3.5 Innhold av karbon og nitrogen

Gjennomsnittlig antall rotatorier i hver tinnbåt ble estimert basert på 24 brønner a 20 µl subsamples som beskrevet. Totalt innhold av karbon og nitrogen per individ (justert for bakgrunnsverdier av kulturvannet) ble så estimert på bakgrunn av tetthet. Disse verdiene inkluderer egg (eggrate i samtlige anrikninger var mellom 0,3-0,4 egg per rotatorie).

2.3.6 Protein innhold per individ

Innhold av protein ved analyse av totalt nitrogen (N) multiplisert med en spesifikk faktor er en vanlig prosedyre ved bestemmelse av protein. Innhold av N er vanlig bestemt ved bruk av Kjeldahl (1883) eller Dumas metode (1831). Ved Kjeldahl blir materialet nedbrutt og metoden kvantifiserer kun N som kan omdannes til NH_4^+ som detekteres ved titrering, colorimetri eller en ione spesifikk elektrode (Simonne et al 1997). I Dumas metode (brukt her) er alt N konvertert til N_2 ved forbrenning i en element analysator og gir dermed høyere N verdier enn Kjeldahl sin metode (Thompson et al., 2002, Jung et al., 2003, Miller et al., 2007). En omregning fra Kjeldahl-N til Dumas-N med en faktor på 0,8 har tidligere blitt kalkulert for sjømat (Simonne et al 1997) og ble brukt ved disse analysene av rotatorier.

En faktor på 6,25 for omdanning fra N til protein er basert på gjennomsnittlig innhold av nitrogen i ulike proteiner på 16 %, som ikke trenger å være passende for alle protein kilder fordi de varierer i aminosyre sammensetning. Generelt har studier av sjømat vist lavere verdier og en omregningsfaktor på 5.8 er beregnet for studier av sjømat (Sosulski og Imafidon, 1990; Gnaiger and Bitterlich, 1984). I de videre beregninger fra karbon og nitrogen analysene er denne faktoren er brukt i videre beregning til innhold av protein.

2.3.7 Lipid og fettsyreinhold

Innhold av lipid ble bestemt gravimetrisk etter ekstraksjon av lipid fra frysetørket materiale ved hjelp av Bligh og Dyer (1959). Fettsyre metyl estere ble produsert som beskrevet av Metcalfe et

al. (1966) og intern standard 19:0 ble tilsatt prøvene før ekstraksjon. Fettsyre metylestere ble bestemt kvantitativt ved hjelp av gass kromatograf (Auto system XL Perkin Elmer).

2.4 Analyser og beregninger

2.4.1 Tørrvekt per individ

Tørrvekt ble estimert på bakgrunn av carbon analyser og følgende ligning:

Ng tørrvekt per rotatorie = ng carbon/ rotatorie*2,25 (Øie og Olsen, 1997).

2.4.2 Karbohydrat innhold

En mye brukt metode for beregning av totale karbohydrater er ved å bestemme rest etter substraksjon av vann, rå protein (crude protein), totalt innhold av lipid og aske innholdet. I beregninger av karbohydratene ble et rest innhold av bundet vann etter tørking til konstant vekt ved 105 °C estimert til 5 % av tørrvekt og inkludert i kalkuleringen. Det beregnede innhold av karbohydrat i rotatorier vil inkludere fiber hvis dette er tilstede i rotatorier.

2.4.3 Kalori innhold

Energien som blir frigitt ved oksidering av protein, fett og karbohydrat har gitt grunnlaget for et sett med omregningsfaktorer. Atwater og Woods sitt system er det mest brukte for kovertering til energi (Atwater og Woods, 1896), metoden er basert på forbrenning og inkluderer justering for tap gjennom fordøyelse, absorpsjon og urea. Fra dette er de generelle omregningsfaktorene for energi 4,0 kcal/g for protein, 9,0 kcal/g for lipid og 4,0 kcal/g for karbohydrater (når karbohydrater blir kalkulert som her). Men, ulike kilder for protein og fett kan gi ulike bidrag til energi. Merrill og Watt (1955; 1973) kalkulerte bidrag for protein og fett i fiskeprodukter til henholdsvis 4,27 kcal/g og 9,02 kcal/g, og disse spesifikke omregningsfaktorene for energi er benyttet i den videre omregning av disse komponentene til energi i rotatorier. Energi innholdet er gitt som m*Calorier* per individ.

2.4.4 Innhold av iod og selen

Prøver til analyse av iod og selen ble frysetørket og analysert ved NIFES ved bruk av multi-elementbestemmelse ved ICP-MS, utført av Jorunn Haugsnes.

2.5 Resultater

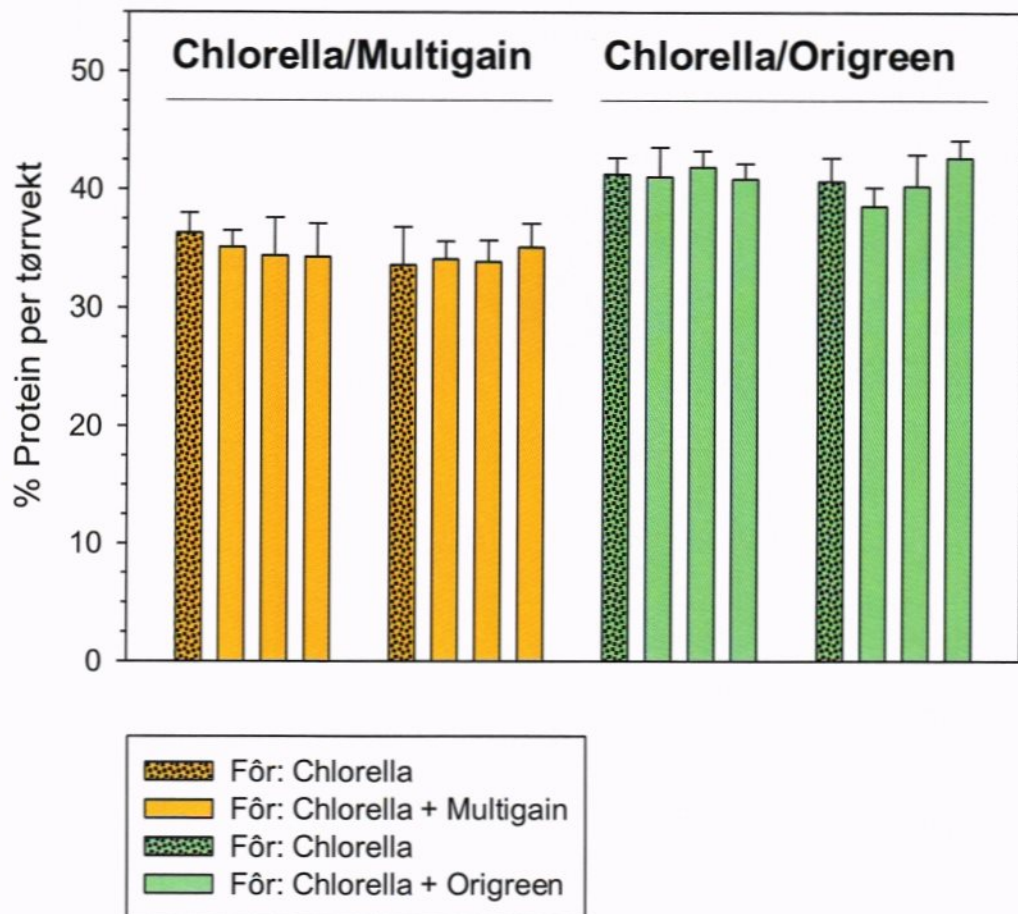
Innhold av protein og fett i rotatorier blir som oftest gitt som innhold per tørrvekt. Dette gir ofte ikke en tilstrekkelig detaljeringsgrad i forhold til at tørrvekt kan variere i de individuelle fôrdyrene. Derfor ble det tatt høyde for to ulike metoder for beregning av innhold av protein og lipid, dette er beregnet per tørrvekt og per individ.

2.5.1 Målinger basert på innhold per tørrvekt

2.5.1.1 Protein innhold per tørrvekt

Figur 1 viser innhold av protein i % per tørrvekt i rotatorier som er blitt dyrket med *Chlorella* gjennom en periode på > 3 måneder for så å bli anrikt med Multigain og Ori-green for to timer.

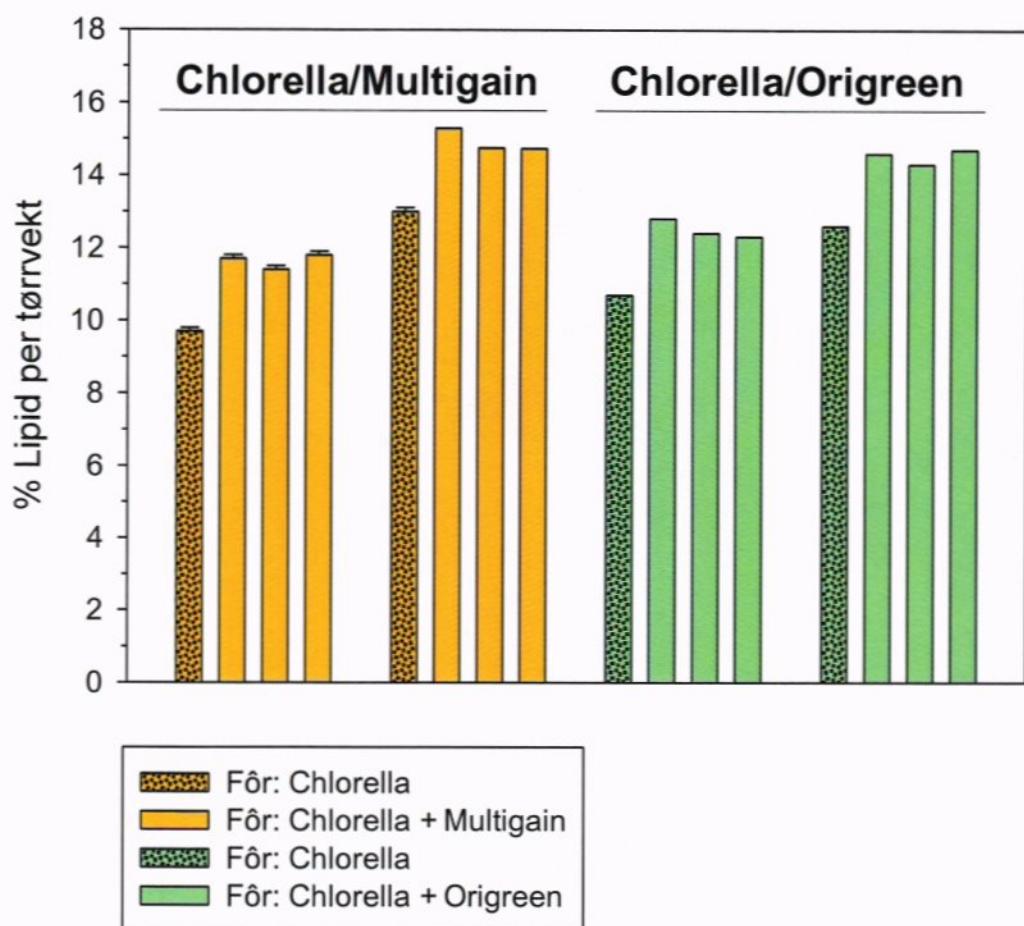
Innholdet av protein i rotatorier som var dyrket med *Chlorella* før anrikning hadde mellom 34 og 41 % protein. Når nivået blir fremstilt som % av tørrvekt av rotatorier som illustrert i Figur 4, ble det funnet kun små forskjeller i nivåene av protein før og etter anrikning av rotatorier ved bruk av både Multigain og Ori-green. Dette kan gi inntrykk av at anrikning med begge anrikningsproduktene ikke har noen effekt på protein innholdet i forhold til nivået i rotatoriene før en anrikning.



Figur 4. Innhold av protein (% per tørrvekt) i rotatorier dyrket med *Chlorella* og deretter anriket for kort tid (to timer) med de to kommersielle anrikningsproduktene Multigain og Ori-green.

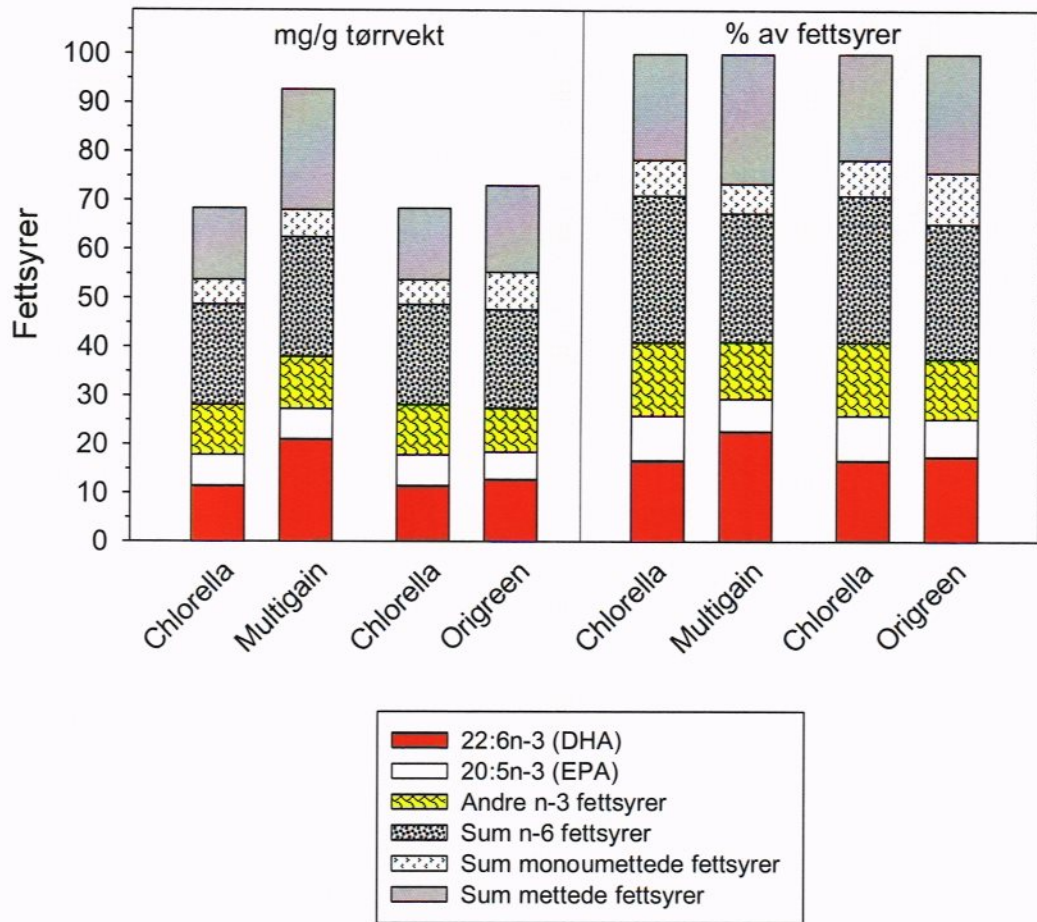
2.5.1.2 Lipid innhold per tørrvekt

Innholdet av lipid var mellom 10,0 og 12,6 % per tørrvekt i rotatorier som var dyrket med *Chlorella* (Figur 5), laveste innhold av lipid ble funnet i rotatorier som var dyrket med *Chlorella* tett inn mot utløpsdato for holdbarhet. De anrikningsdoser som ble gitt gav en økning i lipid innhold som var lik for anrikningene med Multigain og Ori-green. Lipidet økte med 1,9 % per tørrvekt i rotatoriene etter en to timer lang anriknings periode.



Figur 5. Innhold av lipid (% per tørrvekt) i rotatorier dyrket med *Chlorella* og deretter anriket for kort tid (to timer) med de to kommersielle anrikingsproduktene Multigain og Ori-green.

Innhold av fettsyrer i rotatorier dyrket på *Chlorella* og anriket med Multigain og Ori-green er gitt i Figur 6 og for utvalgte fettsyrer i Tabell 2. Rotatorier dyrket med *Chlorella* hadde 11,5 mg/g tørrvekt av DHA før det ble anriket med Multigain og Ori-green. Rotatorier som ble anriket med multigain økte innholdet av DHA til 21 mg/g tørrvekt mens tilsvarende anrikning med Ori-green gav 12,7 mg DHA per g tørrvekt. Innholdet av EPA var rundt 6 mg per g tørrvekt i samtlige rotatorie typer og ingen effekt ble observert som følge av en anrikning, med hensyn på kvantitativt innhold av EPA.



Figur 6. Innhold av fettsyrer (mg per g tørrvekt og % av kvantifiserte fettsyrer) i rotatorier dyrket med *Chlorella* og deretter anrikt for kort tid (to timer) med de to kommersielle anrikningsproduktene Multigain og Ori-green. Identifiserte og kvantifiserte fettsyrer utgjorde mellom 84-89 % av det totale kromatografiske areal. Data presentert er snitt av tre anrikninger utført i triplikat.

Tabell 2. Innhold av viktige fettsyrer og DHA/EPA ratio i rotatorier dyrket med *Chlorella* og anrikt for 2 timer med Multigain (0,2 g per million rotatorier) eller Ori-green (0,25 g per million rotatorier). Verdier er gitt som gjennomsnitt mg per g tørrvekt og som % av kvantifiserte fettsyrer (\pm stdev) av to anrikninger utført i triplikat.

	Chlorella		Multigain		Ori-green	
	mg/g tørrvekt	% av fettsyrer	mg/g tørrvekt	% av fettsyrer	mg/g tørrvekt	% av fettsyrer
20:4n-6 (ARA)	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	0,7 \pm 0,0	0,7 \pm 0,0	0,4 \pm 0,0	0,5 \pm 0,0
20:5n-3 (EPA)	5,9 \pm 1,4	9,1 \pm 0,5	6,1 \pm 0,3	6,6 \pm 0,1	5,6 \pm 0,2	7,8 \pm 0,1
22:6n-3 (DHA)	11,5 \pm 0,5	16,5 \pm 2,7	21,1 \pm 0,1	22,7 \pm 1,1	12,7 \pm 0,1	17,4 \pm 0,4
DHA/EPA	1,8 \pm 0,1	1,8 \pm 0,1	3,4 \pm 0,0	3,4 \pm 0,0	2,3 \pm 0,1	2,2 \pm 0,0

Tørrvekten av rotatorie biomassen som ble tatt ut fra dyrknings og anrikningskulturene var mellom 13,4 og 15,5 % av våtvekt.

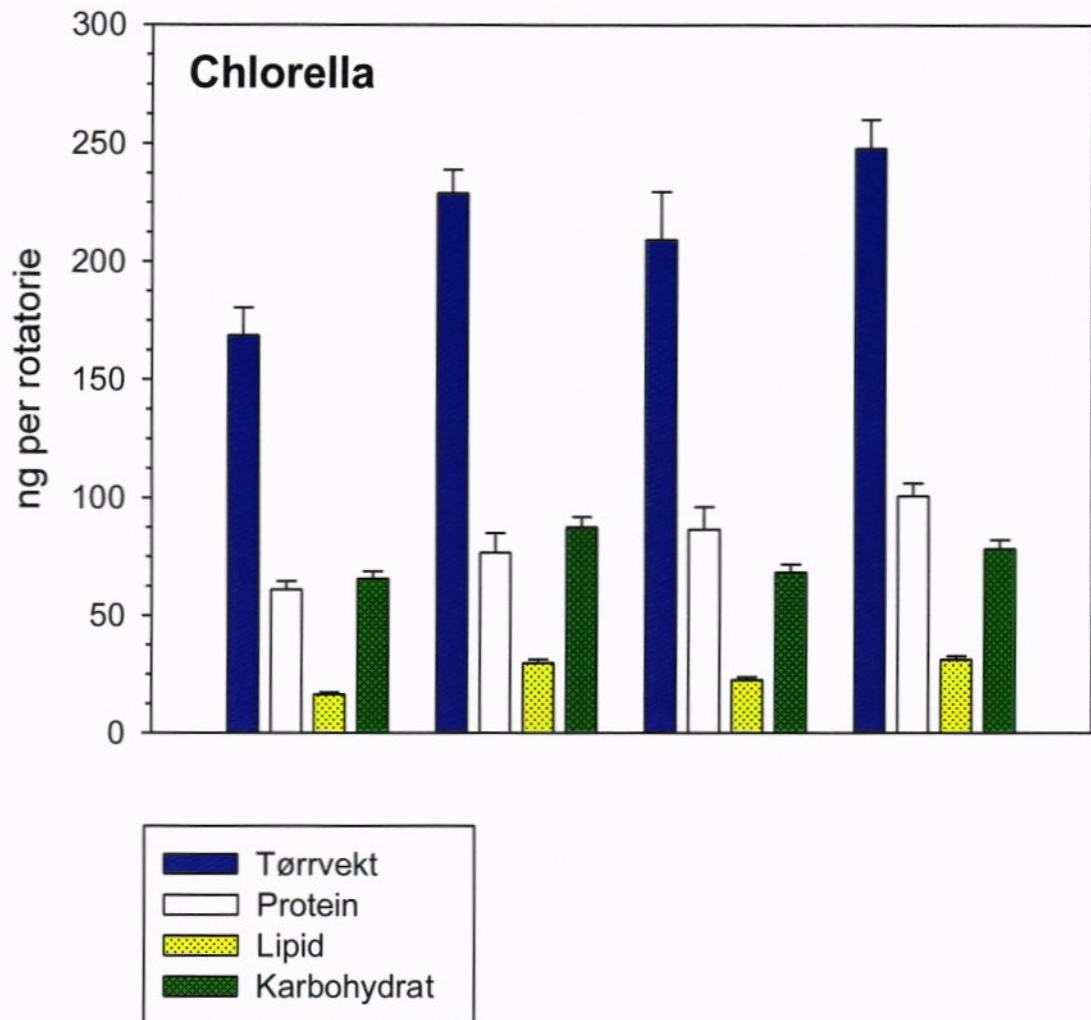
Ingen endring ble funnet i innhold av aske i rotatorier som var dyrket og anrikt, askeinnholdet var gjennomsnittlig 10,2 % av tørrvekten før anrikning og etter to timer anrikning med Multigain og Ori-green var innholdet av aske i gjennomsnitt henholdsvis 9,7 \pm 0,6 og 10,0 \pm 0,8 % av tørrvekt.

2.5.2 Målinger basert på innhold per individ

2.5.2.1 Tørrvekt og innhold av protein, lipid og karbohydrater i dyrkningskulturer

Figur 7 gir tørrvekt per rotatorie dyrket med *Chlorella*, samt deres innhold av protein, lipid og karbohydrat per individ. Basert på de analyser som ble foretatt i dette arbeidet varierte tørrvekten per rotatorie fra 168 til 247 ng per rotatorie i kulturene som var dyrket på *Chlorella* før anrikning. Dette er en relativt stor variasjon som vil influere på deres verdi som fôrdyr til fiskelarver. Protein innholdet var mellom 61 til 101 ng per individ, lipid innholdet var mellom 16 til 31 ng per individ, og innholdet av karbohydrat var mellom 66 til 88 ng per individ.

Disse forskjellene kan gjenspeile rotatoriernes størrelse eller kan også komme som en effekt av bruk av ulike batcher *Chlorella*, eller ulik tilstand på dyrkningsdietten som følge av lagringstid i kjøleskap.

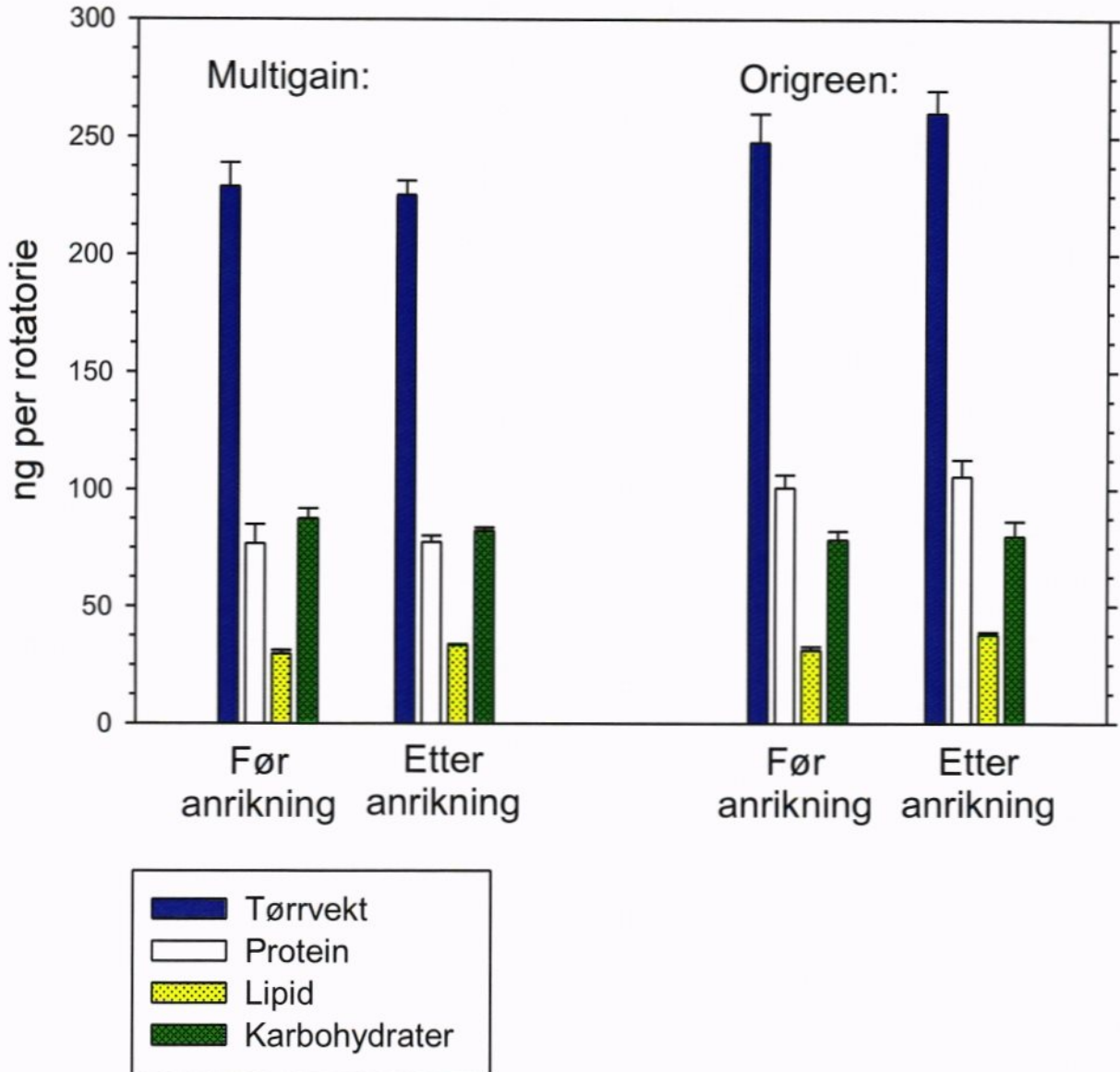


Figur 7. Tørrvekt av rotatorier (ng per individ) dyrket med *Chlorella*, samt deres innhold av protein, lipid og karbohydrat i ng per individ.

Tilsvarende rotatorie ble også forsøkt dyrket i samme oppsett med Ori-culture (0,45 g per million rotatorier). Ori-culture er et mer krevende dyrkningsfôr som krever tilsats av oksygen. Den beregnede fôrdosen ble mikset for 2 minutter, hydrert i 20 minutter og mikset igjen for 1 minutt før daglig fôrdose ble delt i fire utføringer. En hadde imidlertid problemer med å få dyrket opp rotatorier med denne dietten, delvis pga av en ikke klarte å styre nivåene av oksygen i kulturene med det utstyret en hadde tilgjengelig. En valgte derfor å satse mer på analyser av rotatorier som ble dyrket med *Chlorella* og anrikt med Multigain og Ori-green.

2.5.2.2 Tørrvekt og innhold av protein, lipid og karbohydrater etter anriking

Figur 8 gir gjennomsnittlig tørrvekt per rotatorie før og etter en to timer lang anrikning med Multigain og Ori-green, samt rotatoriernes innhold av protein, lipid og karbohydrat. Verdier er gitt som gjennomsnitt av rotatorier fra tre anrikninger (\pm standard avvik).



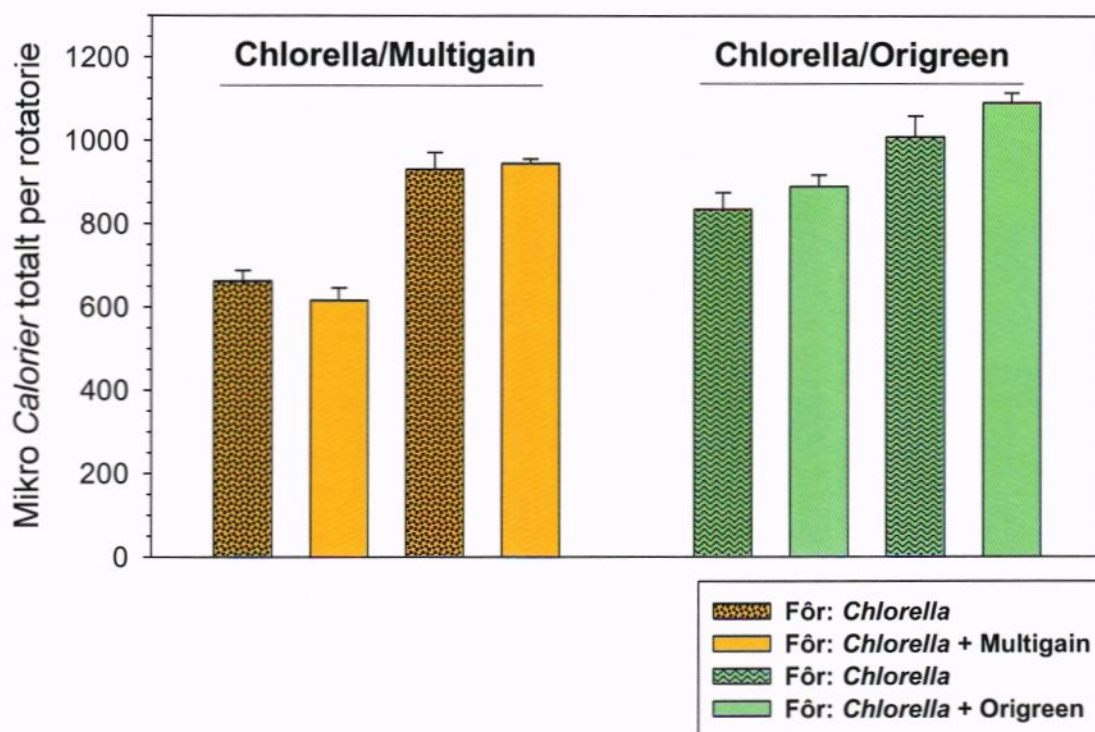
Figur 8. Gjennomsnittlig tørrvekt av rotatorie og innhold av protein, lipid og karbohydrater (ng per individ) etter at de er blitt dyrket med *Chlorella* (før anrikning) og etter en anrikning for to timer enten med Multigain eller Ori-green.

Rotatorier som ble anriket med Multigain viste ingen endring av innhold av protein eller tørrvekt som følge av en anrikning, og denne anrikningen viste kun en moderat økning av lipid per individ fra 30 til 34 ng per individ mens innholdet av karbohydrat var litt lavere etter disse anrikningene.

2.5.3 Innhold av energi i rotatorier

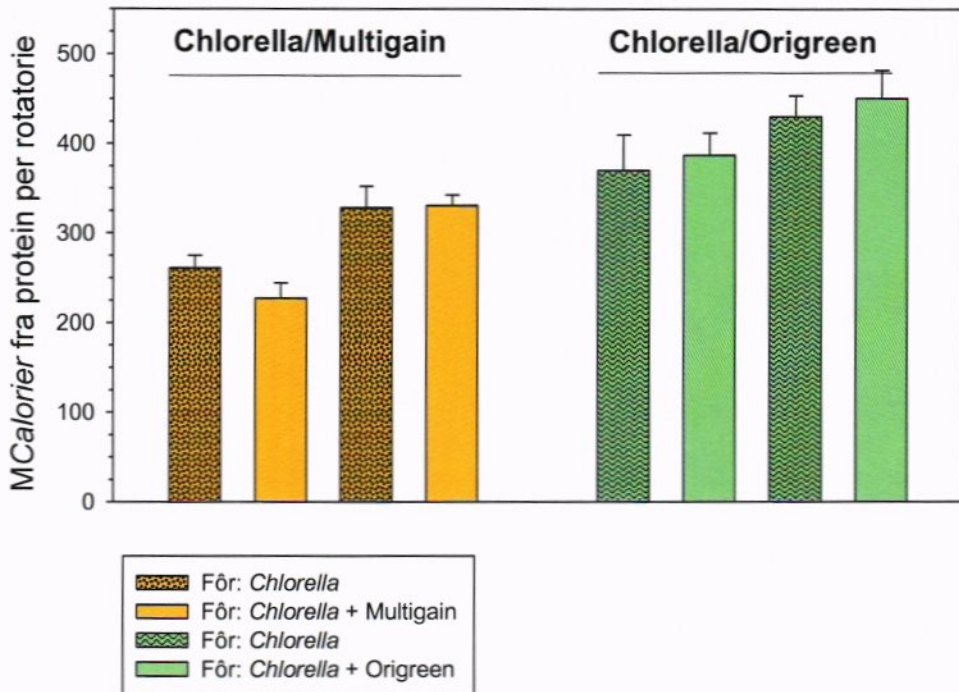
Det individuelle innholdet av kalorier basert på innhold av protein, lipid og karbohydrater ble beregnet. Figur 9 viser innholdet av mikrokalorier per rotatorie før anrikning (dyrket med *Chlorella*) og anriket med enten Multigain eller Ori-green.

Innholdet av kalorier per rotatorie varierte stort mellom de ulike tidspunkt for uttak etter dyrkning med *Chlorella* (660-1008 mikrokalorier per rotatorie). Det totale innholdet av kalorier per individ var så godt som uendret etter en anrikning med Multigain. Større forskjeller mellom kalori innholdet før og etter anrikning ble funnet i rotatorier som var anriket med Ori-green. I disse anrikningene økte innholdet av kalorier med gjennomsnittlig 55 og 83 mikrokalorier per individ (gjennomsnitt av tre anrikninger for hver).

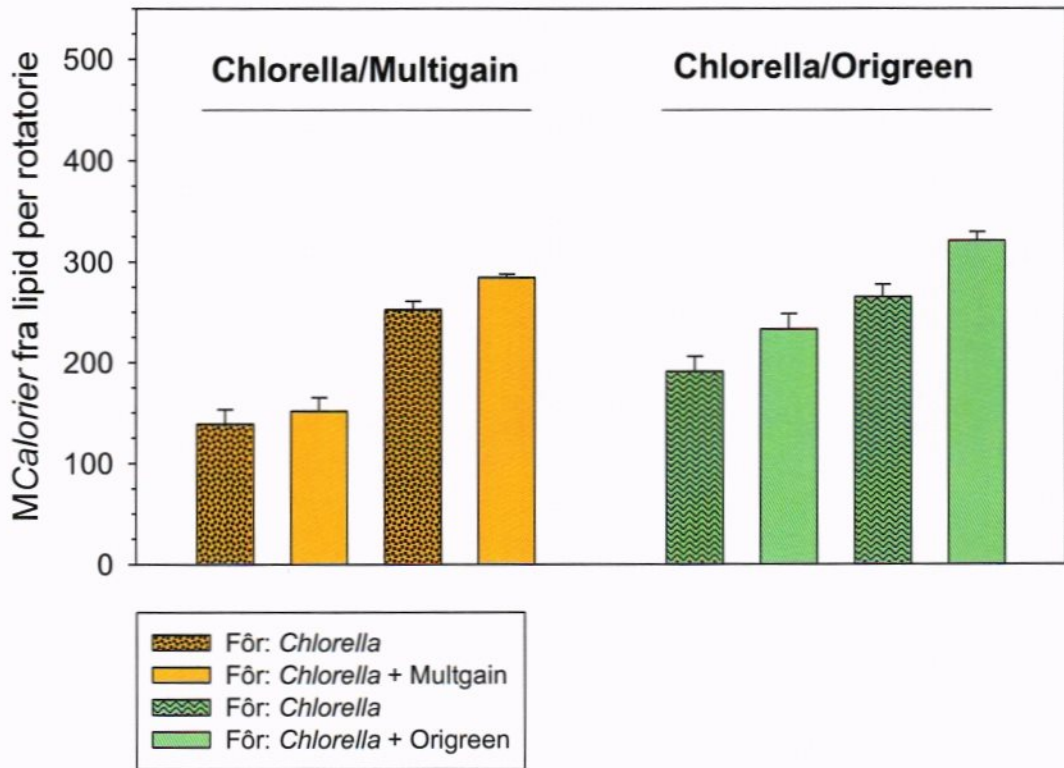


Figur 9. Gjennomsnittlig innhold av kalorier i rotatorier dyrket på *Chlorella* (før anrikning) med etterfølgende anrikning med Multigain og Ori-green. Verdier er gitt i mikrokalorier per individ.

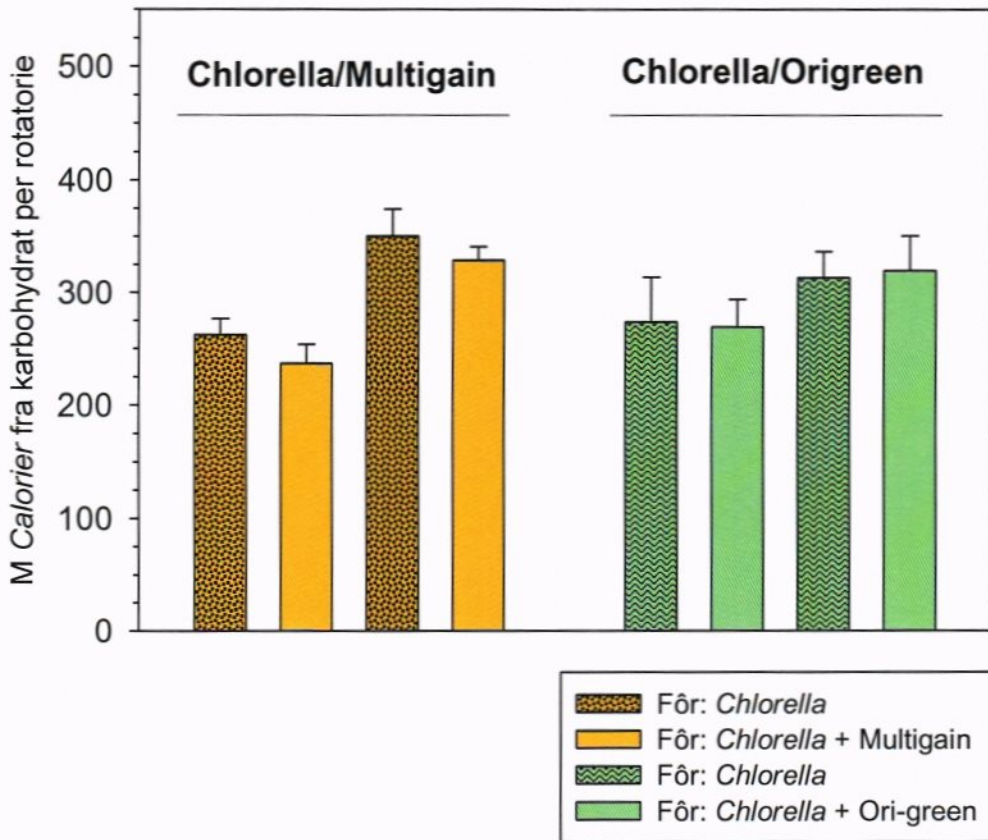
Det var også interessant å se hvor store bidragene til totalt kalori innholdet var fra de tre hovedkomponentene, protein, lipid og karbohydrater. Dette er vist i Figur 10, Figur 11 og Figur 12.



Figur 10. Innhold av kalorier (mikrokalorier per rotatorie) fra proteinet i rotatorier før anrikning (dyrket med *Chlorella*) og etter anrikning med Multigain og Ori-green. Verdier er vist som gjennomsnitt av tre anrikninger.



Figur 11. Innhold av kalorier (mikrokalorier per rotatorie) fra lipidene i rotatorier før anrikning (dyrket med *Chlorella*) og etter anrikning med Multigain og Ori-green. Verdier er vist som gjennomsnitt av tre anrikninger.



Figur 12. Innhold av kalorier (mikrokalorier per rotatorie) fra karbohydrater i rotatorier før anrikning (dyrket med *Chlorella*) og etter anrikning med Multigain og Ori-green. Verdier er vist som gjennomsnitt av tre anrikninger.

Resultatene viste at bidraget fra proteinene utgjorde en vesentlig større andel av det totale kaloriinnholdet i rotatorier i forhold til bidraget fra fett. Bidraget fra karbohydrater utgjorde også en vesentlig andel og var mellom 212 og 350 mikro kalorier per rotatorie. Totalt kaloriinnhold i rotatorier beregnet som per g tørrstoff og sammenlignet med innhold rapportert for tilsvarende størrelses gruppe av rotatorier (stamme ikke gitt) er vist i Tabell 3.

Tabell 3. Innhold av energi (totale kalorier beregnet per gram tørrstoff) i rotatorier før anrikning (dyrket med *Chlorella*) og etter anrikning med Multigain og Ori-green.

Rotatorier fôret med:	<i>Chlorella</i> nær utløpsdato	<i>Chlorella</i>	Multigain	Ori-green	Rotatorier*
Calorier/g	3930	4040	4102	4120	5335

*Rotatorier angitt i Theilacker og McMaster (1971)

2.5.4 Innhold av Jod og Selen

Den siste tiden har det vært stort fokus på innholdet av mikronæringsstoffer i fôrdyr til marine fiskelarver. Man mistenkte lave verdier når rotatorier blir dyrket lenge på et fôr som *Chlorella* som gir svært høye eggfrekvens. Man ønsket å analysere for jod og selen i rotatorier som var dyrket med *Chlorella* over lang tid og etter en anrikning med Multigain og Ori-green. Rotatorier analysert fra dyrkningskulturene har gått på *Chlorella* for 4 måneder (tabell 4).

Tabell 4. Innhold av Jod og Selen i i rotatorier før anrikning (dyrket med *Chlorella*) og etter anrikning med Multigain og Ori-green. Verdier er gitt som mg per kg tørrvekt.

Rotatorier fôret med:	<i>Chlorella</i> nær utløpsdato	<i>Chlorella</i>	Multigain	Ori-green	Copepoder*	NRC**
Jod	1,0	0,38	0,69	0,34	50-350	0,6-1,1
Selen	0,1	0,18	0,21	0,20	3-5	0,25-0,3

* Innhold i copepoder rapportert av Hamre et al. (2008)

** Innhold anbefalt for kaldtvannsfisk av National Research Council (1993)

Innholdet av både jod og selen ser ut til å være vesentlig lavere i rotatorier enn det som er funnet i Copepoder som rapportert av Hamre et al. (2008). Hvis en derimot sammenligner med anbefalte verdier for kaldtvannsfisk (NRC, 1993), ligger rotatorier anriket med Multigain innenfor det anbefalte området for innhold av jod. Innholdet av selen i dyrkede og anrikede rotatorier ligger så vidt lavere for selen i forhold til de anbefalingene som kom fra NRC i 1993. Det høye nivået av jod i copepoder er verdt å merke seg, men en vet imidlertid mindre omkring hvilken effekt dette kan ha på de marine fiskelarvene. De copepodene som ble analysert i arbeidet til Hamre et al. (2008) var hovedsakelig copepodit stadier av *Temora longicornis*, som ble samlet fra Håpollen (Stolt Sea Farm, Aga) fra mai til juni i 1994 og 1995.

2.5.5 Konklusjon

Dette arbeidet har vist at innholdet i rotatorier kan variere vesentlig gjennom en dyrkningsperiode hvor det er blitt brukt samme fôrings dose DHA *Chlorella*. Når innhold blir presentert på tørrvektsbasis kommer imidlertid ikke disse forskjellene til syne. Tørrvekten per individ ser ut til å kunne bli påvirket av denne dyrkningsdietten.

Analysene viste at innholdet av særlig protein og karbohydrat kunne variere. En har ikke brakt på det rene årsakene til dette. En vet mindre om hvordan kvaliteten av den kommersielle DHA *Chlorella* kan variere mellom ulike forsendelser. I og med at DHA *Chlorella* i realiteten er levende alger kan en heller ikke se bort fra at den endrer karakter gjennom en lagring inn mot holdbarhetsdato. Begge disse forhold kan i teorien innvirke, og en lavere individuell tørrvekt i rotatoriene kan bety at størrelsen er endret eller at innholdet av særlig protein er lavere. Det kreves ytterligere undersøkelse for å bringe frem mer kunnskap omkring disse forhold.

Det ser ut som det utgangsnivået som rotatoriene får gjennom dyrknings fasen bestemmer mye for rotatoriene sitt innhold av hovedkomponenter etter en anrikning. Dette vil si deres innhold av protein, lipid, karbohydrat, og dermed også deres innhold av energi.

3 NÆRINGSVERDI OG DYRKNINGS KARAKTERISTIKA FOR TO STAMMER FRA ARTSKOMPLEKSET *BRACHIONUS PLICATILIS* (*B. 'Nevada'* og *B. 'Cayman'*) (DP3)

3.1 Bakgrunn

Ulike arter av rotatorier er brukt som fôrdyr i marine klekkerier (Lubzens et al., 2001) og det er i blant utfordrende å vite nøyaktig hvilken arts sammensetning et klekkeri dyrker fordi de nylig beskrevne artslinjene ikke kan skilles ved hjelp av morfologiske studier alene (Campillo et al., 2005; Kotani et al., 2005; Suatoni et al., 2006; Fontaneto et al., 2007). Klekkerier fornyer ofte kulturene sine basert på morfologiske karakteristikk som etter det gamle L- og S- typen karakterisering (Papakostas et al., 2006), som i korte trekk betyr at man skiller grovt på størrelse, kroppsform og utforming av spines rundt forenden av rotatoriene.

Rotatorier fra de ulike arts linjene kan oppføre seg ulikt med hensyn på vekst kinetikk, saltholdighets og temperatur optimum (Gómez et al., 1997), som kan influere på produksjonseffektiviteten. Det er ikke uvanlig at laboratorier og klekkerier opplever plutselige forstyrrelser i produksjonssyklus ved at kulturer kolliderer. Hvilken innvirkning ulike arter rotatorier har og hvordan blanding av ulike arter har på produksjons effektivitet ved klekkeriene er ukjent. Studier som tok for seg genetisk karakterisering av ulike stammer rotatorier fra ulike europeiske klekkerier (Papakostas et al., 2006; Dooms et al., 2007) avslørte at de fleste klekkerier i virkeligheten kultiverte rotatorie arter som var forskjellig fra hva de selv mente de hadde. I

hovedtrekk pekte resultatene i retning av svært lite innslag av den fra gammelt av *B. plicatilis* (L-type) og *B. rotundiformis* (S-type), dvs de hadde et dominerende innslag av *B. 'Cayman'* og i mindre grad *B. 'Nevada'*.

Resultater presentert i dette delprosjektet er basert på arbeider som er utført av to Master studenter i samarbeid med NTNU og SINTEF Fiskeri og havbruk, Marius Husabø Monsen (Universitetet i Bergen; 2008 "Comparing the culture performance of the rotifers *Brachionus plicatilis* (Nevada) and *Brachionus ibericus* (Cayman) batch cultured at five different water exchange rates") og Keshuai Li (Norges teknisk- naturvitenskapelige Universitet i Trondheim, 2010 "Manipulation of the composition of phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE) of rotifers *Brachionus* sp. Nevada and *Brachionus* sp. Caymen").

I disse studiene ble biokjemisk innhold under dyrkning og anrikning, samt dyrknings karakteristiske trekk i to stammer av rotatorier studert. De to stammene som ble studert i disse to master oppgavene er inkludert i det kryptiske arts komplekset *B. plicatilis*: *B. 'Nevada'* og *B. ibericus*'Cayman' (Gomez et al., 2002).

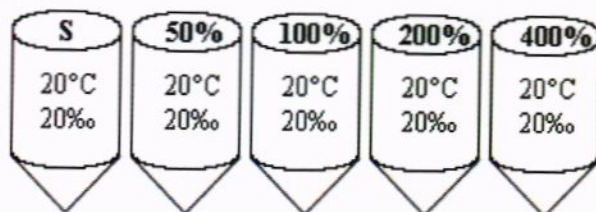
Målet for oppgaven til Marius H. Monsen (prosjekt PROCOD) var å sammenligne de to artene under dyrkning med ulike fortynningsrater (50 %, 100 %, 200 % og 400 % fortykning og stagnant vann), samt sammenligne næringsverdi og respons på næringsverdi hos disse to artene rotatorier under en anrikning. Keshuai Li sin oppgave besto i å studere effekten av en anrikning med DHA (22:6n-3) på fosfolipidene (PC og PE) hos rotatorier når dette ble gitt i form av en triglyseridbasert- eller fosfolipidbasert oljeemulsjon.

3.2 Materialer og metoder

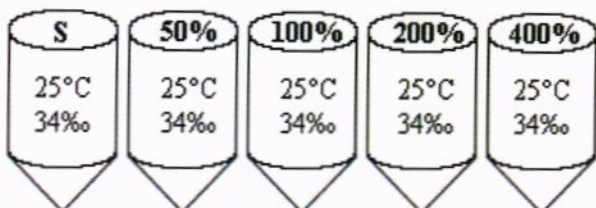
3.2.1 Fortynning av rotatoriekulturer

For å finne optimal vann utskiftings rate for kulturer av *B. 'Nevada'* og *B. 'Cayman'*, ble de to stammene dyrket i modifiserte batch kulturer med fem ulike vann utskiftingsrater (% av tank volum per dag). Rotatorie kulturene ble holdt ved stagnant (S), 50 %, 100 %, 200 % and 400 % vann utskifting i 8 dager (Figur 13). Gjennomsnittlig tetthet ved oppstart av kulturene var 550 ind/ml for *B. 'Nevada'* kulturene og 530 ind/ml for *B. 'Cayman'* kulturene.

B. plicatilis



B. ibericus



Figur 13: Eksperimentelt oppsett av vann utskiftings forsøk med de ulike temperaturer (°C), salinitet (‰) og utskiftingsrater av vann (% av volum per dag). S= stagnant, *B. plicatilis* =*B. ‘Nevada’* og *B. ibericus* =*B. ‘Cayman’*.

Begge typene rotatorier ble føret med bakgjær og *Nannochloropsis* konsentrat (Reed mariculture, USA) og Algamac 2000. Ulike daglige fôrdoser ble brukt til de to typene *B. plicatilis*. *B. ‘Nevada’* fikk 1.4 g gjær per million individer, mens *B. ‘Cayman’* ble føret med 1.0 g gjær per million individer. *Nannochloropsis* og Algamac ble gitt som andel av gjærmengden (5 % av våtvekt). Daglig fôrdose av gjær og *Nannochloropsis* ble fordelt til kulturene gjennom døgnet vha peristaltiske pumper, mens Algamac 2000 ble gitt som en føring daglig direkte i tankene.

3.2.1.1 Ammoniakk

Totalt ammoniakk nitrogen (TAN) ble målt daglig ved bruk av et test kit (Hach Company, USA), som baserer seg på en salicylat metode (adaptert fra Reardon et al. 1966) og inkluderer et håndholdt colorimeter. Prøver (50 ml) fra kulturene ble tatt ut fra bestemte steder i kultur tankene og filtrert (50 µm nylon filter). Alle prøver ble analysert i duplikat og prøver som inneholdt TAN verdier som overskred 2.5 mg/l ble fortynnet. Mengden ikke-ionisert ammoniakk ble estimert på bakgrunn av TAN verdi og temperatur og ble kalkulert ved følgende ligning:

$$\text{NH}_3 \text{ (mg/l)} = \text{TAN (mg/l)} * (\text{c}/100)$$

hvor NH₃ = ikke-ionisert ammonia, TAN = total ammoniakk nitrogen, c = er en konverterings faktor (Emerson et al., 1975).

3.2.1.2 Mikrobiologi

Prøver for mikrobiologi ble tatt fra rotatorier og kulturvann. Rotatorier ble analysert fra prøver tatt ut ved dag 0, 5 og 8 for å evaluere bakterier assosiert ved rotatoriene. Rundt 1000 rotatorier fra hvert prøveuttak ble behandlet for utsåing på tre ulike agar medier. Rotatorier ble vasket med 2 x 25 ml autoclavert/filtrert 80 % sjøvann før de ble overført til en vevs-homogenisator. Rotatoriene ble homogenisert (5 ml autoklavert/filtrert sjøvann) aseptisk og sådd ut på: marine agar (Difco), pseudomonas agar (Difco) og TCBS agar (inneholdende C-F-C supplement) (Oxoid). En fortynnings rekke ble laget for hver prøve og 3 fortyninger ble gjenstand for utsåing i replikat. De koloniformende bakteriene (CFU) ble telt etter 2 og 14 dager. CFU er enkeltbakterier som er i stand til å vokse på den spesifikke agartypen. Skåler som hadde CFU mindre enn 30 eller flere enn 300 ble ikke benyttet når totalt CFU ble beregnet. Prøver fra kulturvannet (50ml) ble filtrert (50µm nylon filter). Fortynning, utsåing og registrering ble utført som beskrevet for rotatorier.

3.2.1.3 Anrikning av rotatorier med ulike lipidkilder

Rotatoriene (*B. 'Nevada'* og *B. 'Cayman'*) ble holdt ved 35 ‰ sjøvann og 20 °C, og dyrket kun på mikroalgen *Rhodomonas baltica* (1400- 2490 celler per rotatorie per dag) for 8 dager før de ble anrikt med to typer emulsjoner for 4 dager. Rotatorie kulturene ble fortynnet 20 % av kulturvolum per dag.

3.2.1.4 Emulsjoner

Marol E er en emulsjon (Rainuzzo, SINTEF Fiskeri og havbruk) som er basert på DHASCO (Martek biosciences, USA) og inneholder hovedsakelig nøytrale lipider (triacylglycerider) rik på DHA (41 % av fettsyrer). Det er ingen fosfolipider i Marol E (TAG emulsjon).

Emulsjon av torskerogn (PL emulsjon) ble laget av lipider ekstrahert fra torskerogn ved Bligh og Dyer (1959) etter samme metode som tillaging av Marol E, og inneholder hovedsakelig fosfolipid rik på DHA og EPA.

Begge emulsjonene ble tilsatt ferskvann og mikset med stavmikser før de ble gitt til rotatoriene. PL emulsjonen ble i denne prosedyren tilsatt NaHCO₃ (10 % av vekt) for lettere løse den i vann og lage partikler. Rotatorier ble anrikt for fire dager med prøveuttak ved forsøksstart og forsøksslutt. Daglige anrikningsdoser med Marol E var 39 og 24 ng per rotatorie til henholdsvis *B. 'Nevada'* og *B. 'Cayman'*. Torskerogn emulsjonen ble gitt til rotatorier i daglige doser på 41 ng og 25 ng per rotatorie til henholdsvis *B. 'Nevada'* og *B. 'Cayman'*.

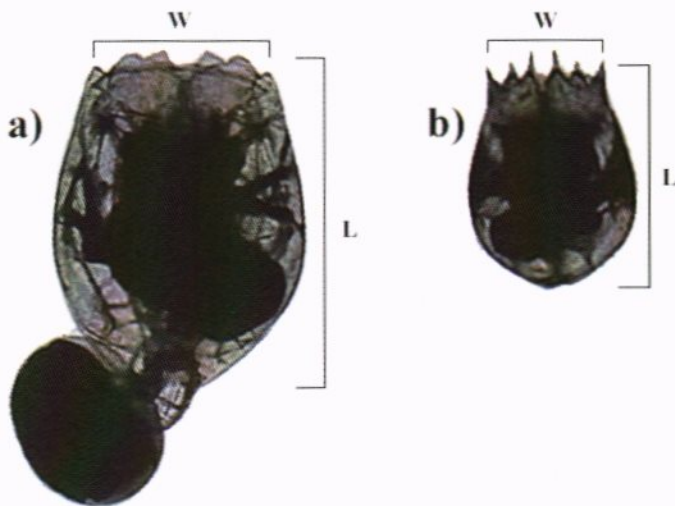
3.2.1.5 Lipid analyser

Innhold av lipid ble bestemt gravimetrisk etter ekstraksjon av lipid fra frysetørket materiale ved hjelp av Bligh og Dyer (1959). Fettsyre metyl estere ble produsert som beskrevet av Metcalfe et al. (1966) og intern standard 19:0 ble tilsatt prøvene før ekstraksjon. Fettsyre metylestere ble bestemt kvantitativt ved hjelp av gass kromatograf (Auto system XL Perkin Elmer).

3.3 Resultater effekt av ulike vannutskiftingsrater på rotatorier

3.3.1 Morfometri

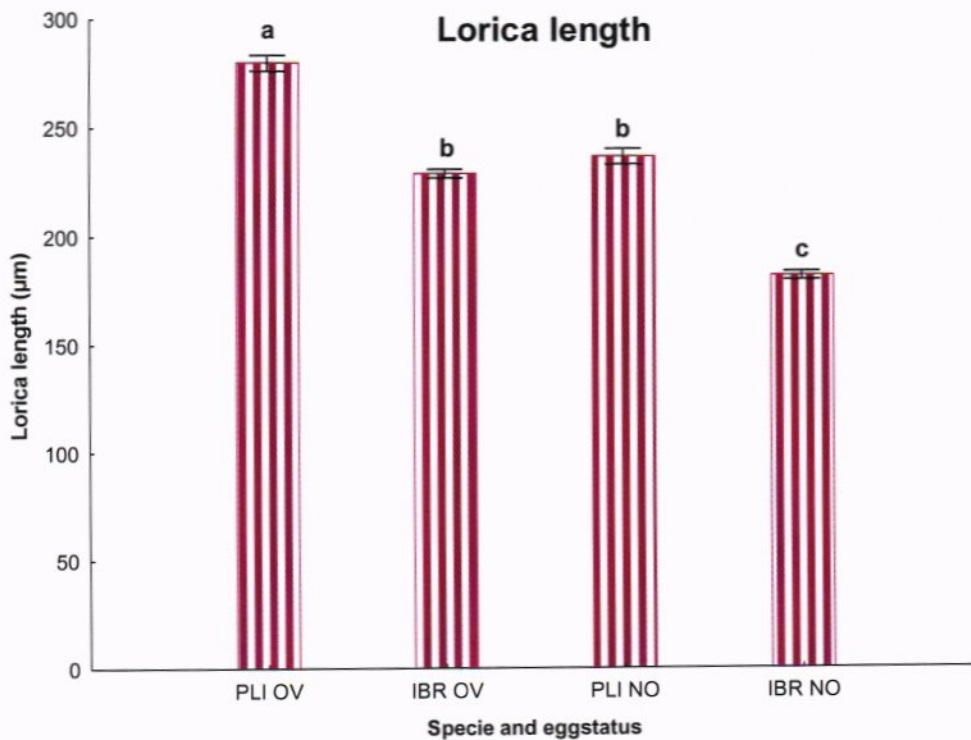
De to rotatorie artene hadde signifikante forskjeller i lorica lengde (Student-Newman-Keuls test, $p < 0.05$, Figur 15; Tabell 5). Det var også forskjellig lengde på lorica innen arten for rotatorier med og uten egg (Student-Newman-Keuls test, $p < 0.05$). De to artene er forskjellige med hensyn på morfologi som kjennetegnes ved utforming av spines i fronten. *B. 'Nevada'* har tre korte triangulære horn på begge sider av en sentral U-formet kløft (Figur 14a), mens *B. 'Cayman'* har tre spydformende spisser på begge sider av en sentral V-formet kløft (Figur 14b).



Figur 14: Målepunkter for lorica lengde og bredde registrert hos *Brachionus plicatilis*; *B. 'Nevada'* (a) og *B. 'Cayman'* (b) (Photo: Monsen, M.H.)

Tabell 5: Gjennomsnittlig \pm S.D. kropps lengde og -bredde (μm) hos *B.* 'Nevada' (n=200) og *B.* 'Cayman' (n=60) med egg (OV) og uten egg (NO).

Art	Lengde (OV (SD))	Lengde (NO (SD))	Bredde (OV (SD))	Bredde (NO (SD))
<i>B.</i> 'Nevada'	280.1 (20.8)	236.9 (22.5)	147.1 (8.5)	129.9 (11.1)
<i>B.</i> 'Cayman'	229.1 (12.5)	182.1 (24.2)	125.7 (10.4)	108.8 (13.5)



Figur 15: Gjennomsnittlig lorica lengde \pm S.E. (μm) av *B.* 'Nevada' (PLI, n=60) and *B.* 'Cayman' (IBR, n=200) med egg (OV) og uten (NO) egg. Ulike bokstaver (a,b,c) viser signifikante forskjeller (Student-Newman-Keuls test, $P < 0.05$).

3.4 Tetthet av rotatorier ved ulike fortynninger

Rotatorier som ble holdt ved ulike vann-utskifting hadde en oppstarts tetthet på 550 og 530 for henholdsvis *B.* 'Nevada' og *B.* 'Cayman' (kalt *B. plicatilis* og *B. ibericus* i Figur 16 og 17).

Tetthet gjennom en 8 dager kultivering er vist for *B.* 'Nevada' i Figur 16 og *B.* 'Cayman' i Figur 17.

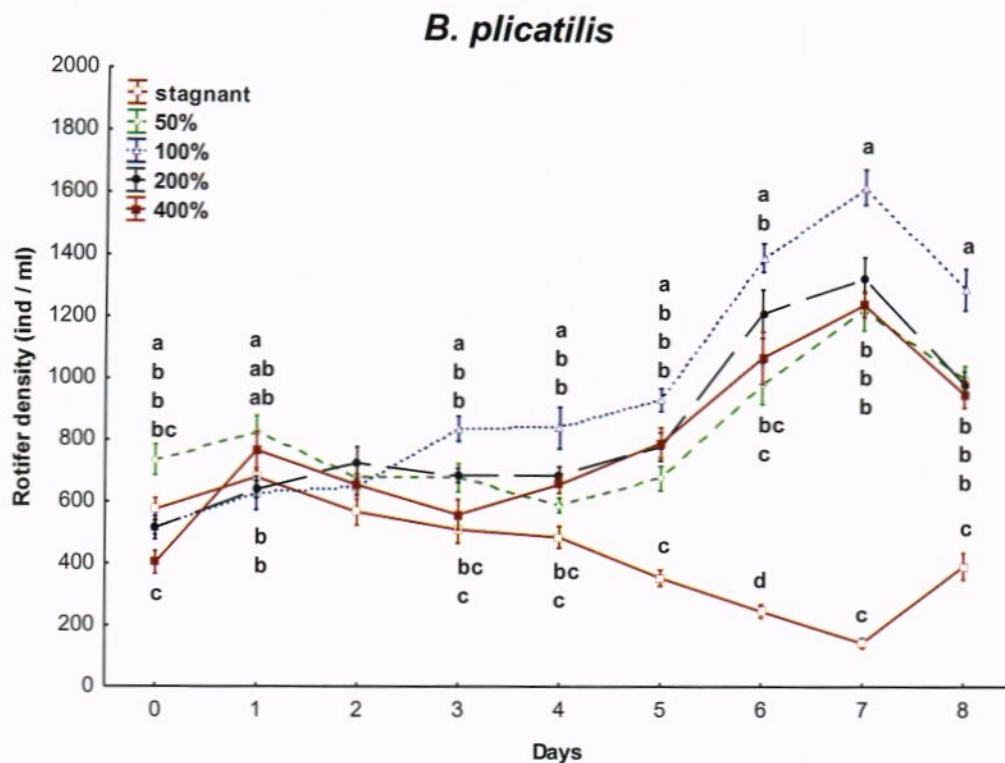


Figure 16: Gjennomsnittlig vekst (\pm SE, $n=10$) av *B. 'Nevada'* dyrket ved 5 ulike vannutskiftingsrater. Bokstaver viser signifikante forskjeller mellom behandlingene med a som høyeste verd (Student-Newman-Keuls test, $p<0.05$).

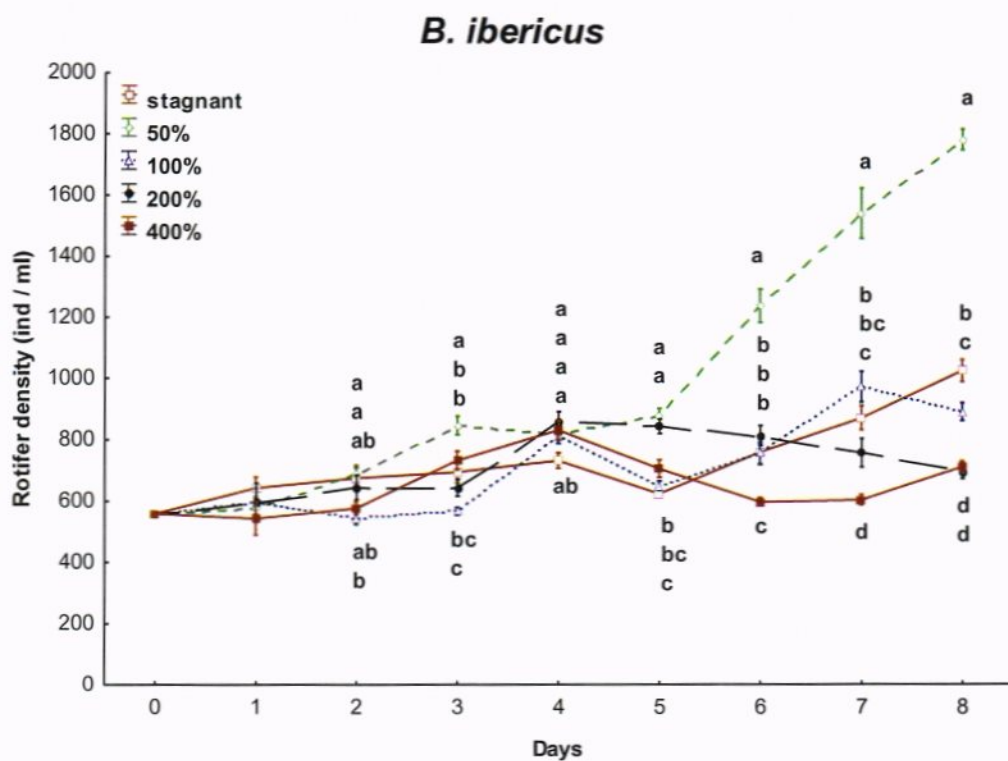


Figure 17: Gjennomsnittlig vekst (\pm SE, $n=10$) av *B. 'Cayman'* dyrket ved 5 ulike vannutskiftingsrater. Bokstaver viser signifikante forskjeller mellom behandlingene med a som høyeste verd (Student-Newman-Keuls test, $p<0.05$).

3.5 Ammoniakk

B. 'Nevada' (kalt *B. plicatilis* i figurene)

Samtlige behandlinger viste en økning av NH_3 i kulturvannet gjennom eksperimentet (Figur 18). En forholdsvis kraftig økning i konsentrasjonen av NH_3 ble observert i alle kulturene fra dag 2 til 8 unntatt de med 200 % og 400 % utskifting. En sterk negativ korrelasjon ($r = -0.59$, $p < 0.001$) ble funnet mellom vannutskifings-raten og NH_3 konsentrasjonen fra dag 1 til 8 (Figur 20). På dag 7 nådde behandlingen med stagnant vann grenseverdier for den analytiske metoden som ble brukt.

B. 'Cayman' (kalt *B. ibericus* i figurene)

Samtlige behandlinger viste en økning av NH_3 i kulturvannet gjennom eksperimentet (Figure 19). Forskjeller i konsentrasjonen av NH_3 ble funnet mellom de ulike behandlingene alle kulturene fra dag 2 til 8 unntatt de med 200% og 400% utskifting. En sterk negativ korrelasjon ($r = -0.62$, $p < 0.001$) ble funnet mellom vannutskifings-raten og NH_3 konsentrasjonen fra dag 1 til 8 (Figur 21).

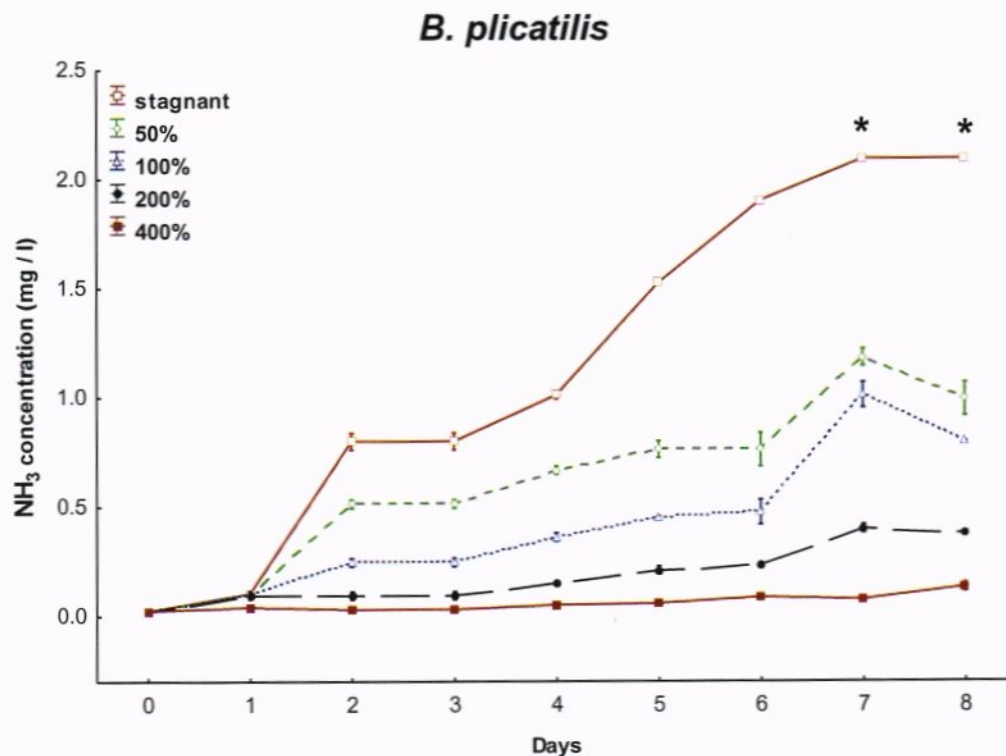


Figure 18: Gjennomsnittlig konsentrasjon av NH_3 (\pm S.E, $n=2$) gjennom en 8 dagers kultiveringsperiode av *B. 'Nevada'*, dyrket ved 5 ulike vannutskiftingsrater. * Grenseverdi for den analytiske metoden som ble brukt.

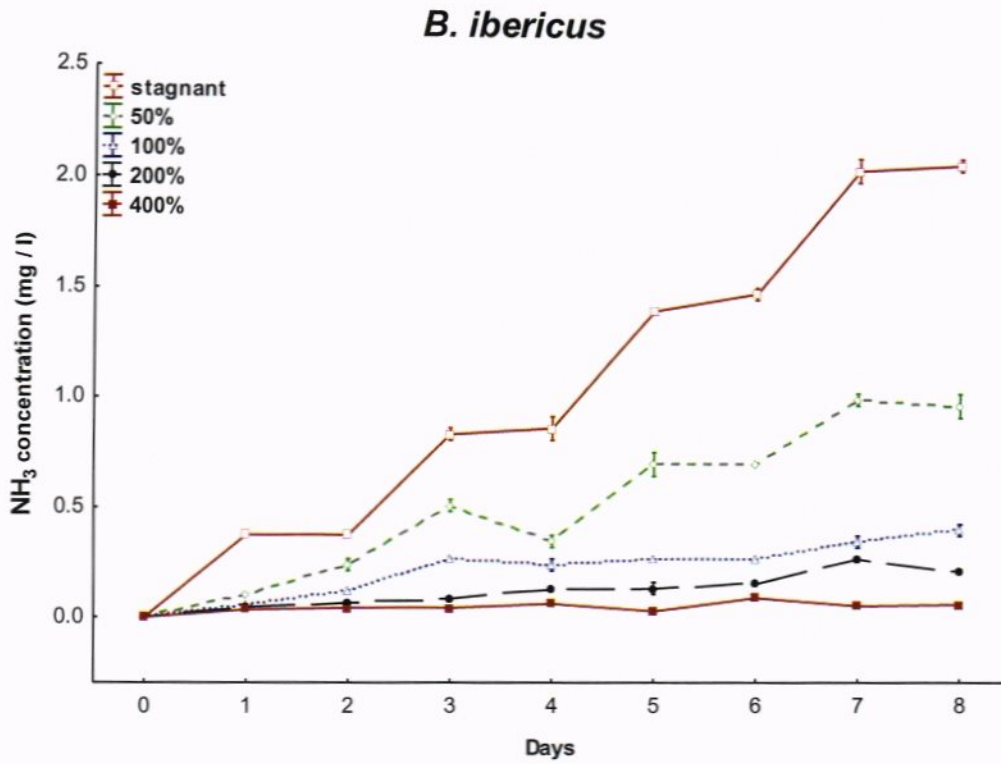


Figure 19: Gjennomsnittlig konsentrasjon av NH₃ (\pm S.E, n=2) gjennom en 8 dagers kultiveringsperiode av *B. 'Cayman'*, dyrket ved 5 ulike vannutskiftingsrater. * Grenseverdi for den analytiske metoden som ble brukt.

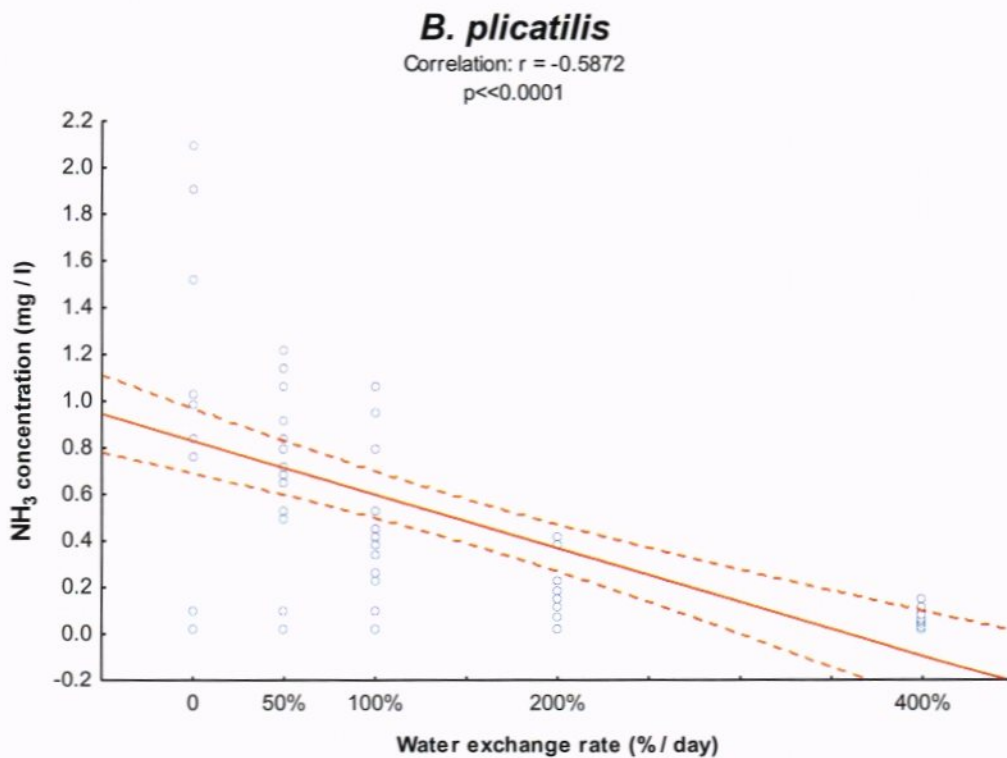


Figure 20: Punkt diagram som viser negativ korrelasjon mellom vann utskiftingsrater og konsentrasjon av NH₃ gjennom en 8 uker lang kultivaringsperiode av *B. 'Nevada'*, dyrket ved 5 ulike vannutskiftingsrater.

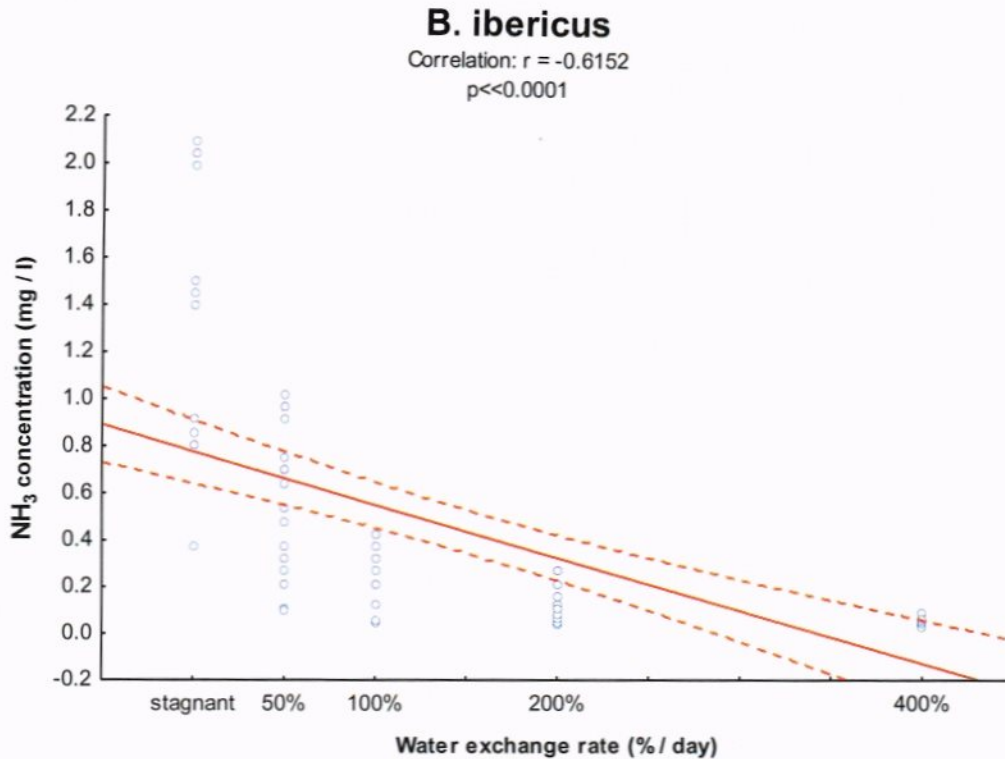


Figure 21: Punkt diagram som viser negativ korrelasjon mellom vann utskiftingsrater og konsentrasjon av NH₃ gjennom en 8 uker lang kultivaringsperiode av *B. 'Cayman'*, dyrket ved 5 ulike vannutskiftingsrater.

3.6 Mikrobiologi

3.6.1 Kulturvann

CFU i kulturene med *B. 'Nevada'* ved dag 0 var rundt $2 \cdot 10^5$ CFU/ml (Figur 22). Alle behandlingene økte sin CFU verdi fra kulturvannet gjennom forsøket. Det ble funnet like CFU verdier på dag 5 i vann fra alle behandlinger med vannutskifting, mens kultur med stagnant vann gav høyere CFU verdi. På dag 8 ble det funnet høyere CFU i kulturer med 200 %, 400 % utskifting og stagnant vann enn i kulturene med 50% og 100% utskifting av vann.

I kulturene med *B. 'Cayman'* var CFU nivåene ved forsøksstart rundt $7 \cdot 10^4$ CFU /ml i samtlige tanker (Figur 23). Alle behandlinger viste en økning i CFU i kulturvannet under forsøket. På dag 5 hadde kultur med stagnant vann og 50 % fortynning den høyeste CFU mens 400 %, 100 % og 200 % hadde relativt lave CFU verdier. På dag 8 var disse forskjellene mindre ettersom behandling med stagnant vann og 50 % vannutskifting fikk redusert CFU fra dag 5 til 8. Resultater fra *psaedomonas* og TCBS agar hadde for lav CFU til å kunne regnes med.

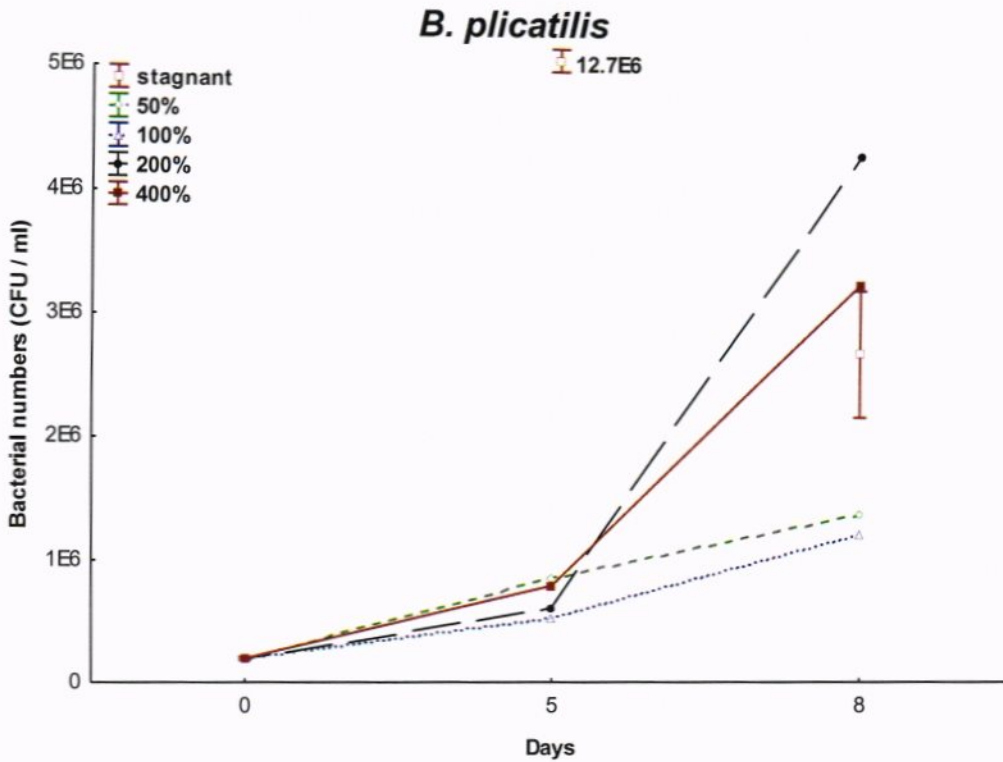


Figure 22: Totale koloniformende bakterier (mean \pm SE, n= 1- 2) dyrket på M-64 agar, som var assosiert med dyrkningsvann fra kulturer av *B. 'Nevada'* gjennom en 8 dagers produksjonsperiode ved 5 ulike vannutskiftingsrater.

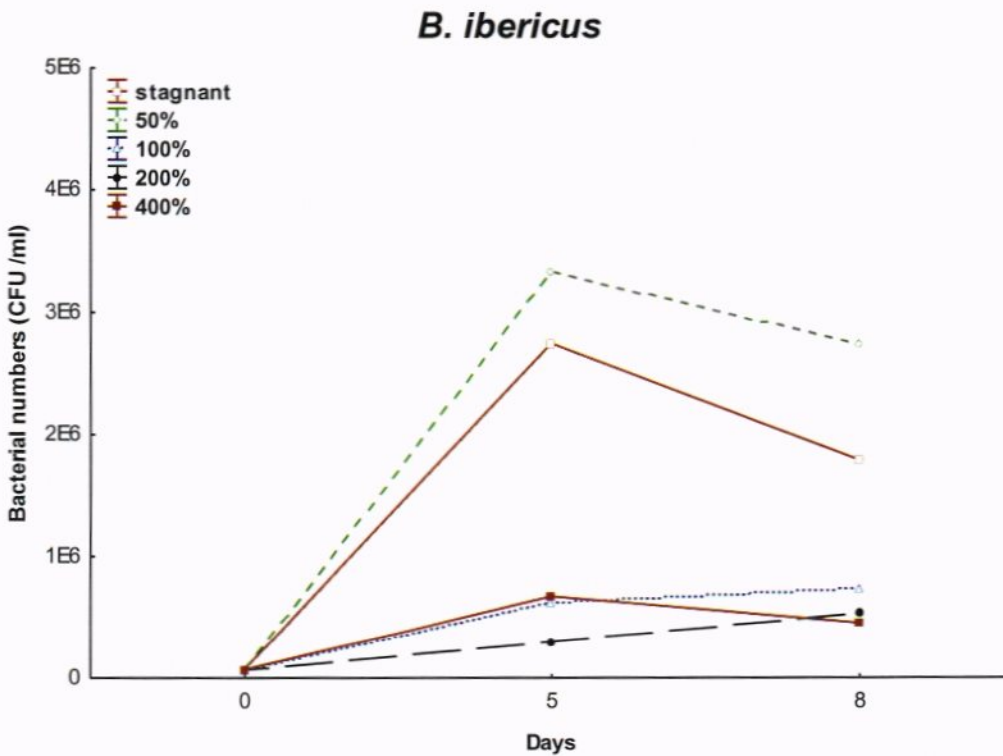


Figure 23: Totale koloniformende bakterier (mean \pm SE, n= 1- 2) dyrket på M-64 agar, som var assosiert med dyrkningsvann fra kulturer av *B. 'Cayman'* gjennom en 8 dagers produksjonsperiode ved 5 ulike vannutskiftingsrater.

3.6.2 Rotatorier

Nivå av bakterier assosiert med *B. 'Nevada'* var rundt $2.6 \cdot 10^3$ CFU/rot i alle behandlinger ved forsøksstart (Figur 24). Alle behandlinger viste en økning i CFU assosiert med rotatorier gjennom forsøket.

Nivå av bakterier assosiert med *B. 'Cayman'* var rundt $3.5 \cdot 10^2$ CFU/rot i alle behandlinger ved forsøksstart (Figur 25). Alle behandlinger viste en økning i CFU assosiert med rotatorier gjennom forsøket. Den høyeste CFU ble funnet på dag 5 i behandlinger med 50 % og 400 % vann utskifting. På dag 8 hadde alle behandlinger like CFU nivå rundt $0,2-0,3 \cdot 10^4$ CFU/rot.

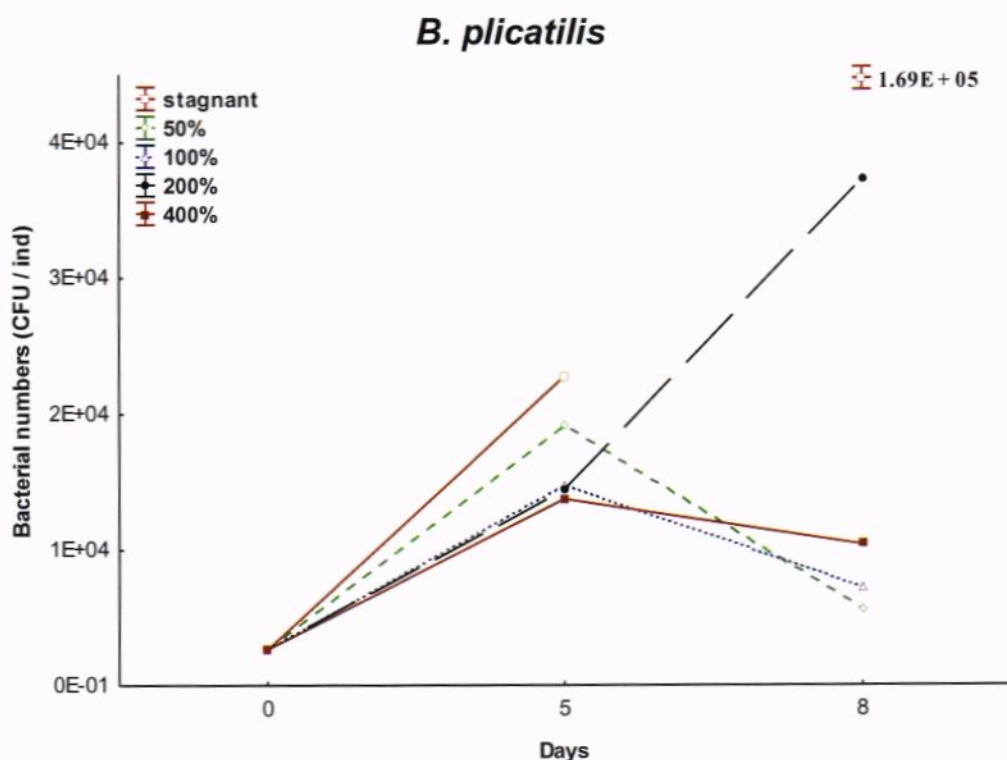


Figure 24: Totale koloniformende bakterier (mean \pm SE, n= 1- 2) dyrket på M-64 agar, som var assosiert med rotatorier *B. 'Nevada'* gjennom en 8 dagers produksjonsperiode ved 5 ulike vannutskiftingsrater.

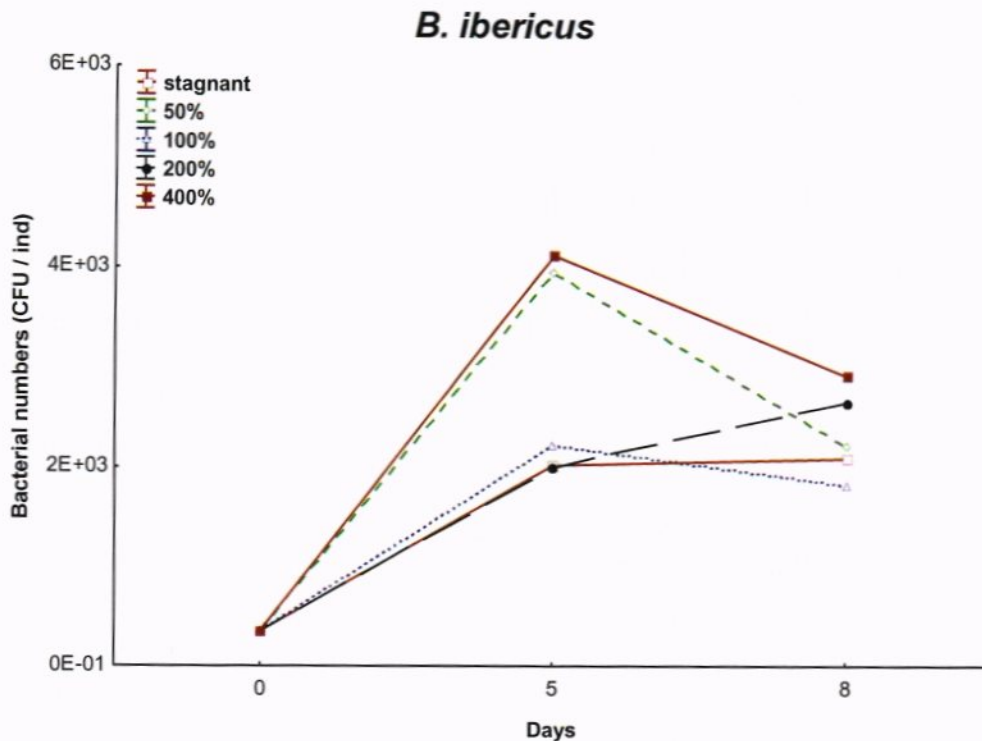


Figure 25: Totale koloniformende bakterier (mean \pm SE, n= 1- 2) dyrket på M-64 agar, som var assosiert med rotatorier *B. 'Cayman'* gjennom en 8 dagers produksjonsperiode ved 5 ulike vannutskiftingsrater.

3.7 Konklusjon

Signifikante forskjeller i størrelse ble funnet mellom de to typene rotatorier, *B. 'Nevada'* var større enn *B. 'Cayman'*. Vann utskifting synes å ha positiv effekt på vekst i rotatorie kulturer. Ved å introdusere vann utskifting ble vekst hos begge typene rotatorier forbedret sammenlignet med kulturer hvor vannet ble holdt stagnant. Økende vann utskiftings gav en positiv effekt og reduserte nivået av ammoniakk i rotoriekulturene. Utskifting av vann reduserte antallet koloniformende bakterier i rotatorie kulturene.

Følgende konklusjoner er ikke vist her men se Monsen, 2008 for detaljer:

For *B. 'Nevada'* gav utskifting av vann høyere nivå av høyt umettede fettsyrer (HUFA) men en lavere DHA/EPA ratio enn i stagnant vann.

Protein /lipid forholdet ble funnet å være avhengig av vekstrate, og en høy spesifikk vekstrate i kulturene gav høy protein / lipid forhold.

Hos *B. 'Cayman'* hadde vannutskifting hovedsakelig effekt på lipid og fettsyre sammensetningen. Nivå av HUFA og DHA/EPA var høyere i grupper med vannutskifting sammenlignet med kulturer som ble holdt i stagnant vann. Protein/lipid forholdet så også hos denne typen rotatorie ut til å være avhengig av vekstrater, og en høy vekst rate gav et høyere protein/lipid forhold i rotatoriene.

4 Resultater manipulering av PC og PE i to arter rotatorier

4.1 Anrikning av rotatorier med ulike lipidkilder

Phosphatidyl choline (PC) og phosphatidylethanolamin (PE) er de to hovedklassene av fosfolipid som finnes i membranlipider i rotatoriene (Rainuzzo et al., 1994) og fettsyresammensetningen i disse lipidklassene er sjelden studert i rotatorier. De to artene av *B. plicatilis*: *B. 'Nevada'* og *B. 'Cayman'* ble dyrket med mikro algen *R. baltica* før de ble anrikt med en triglyserid (TAG) basert emulsjon (Marol E; SINTEF, Rainuzzo unpublished) og en fosfolipid basert emulsjon (torskeroغن: PL emulsjon). Målet var å evaluere mulighetene for inkorporering av n-3 høyt umettede fettsyrer (n-3HUFA) fra dietten inn i rotatoriens eget fosfolipid gjennom bruk av ulike lipid kilder. Det ble lagt vekt på å studere inkorporering av ulike fettsyrer i PC, PE og TAG i rotatorier som funksjon av de to ulike diett kilder (PL og TAG basert emulsjon).

Gjennomsnittlig tetthet i kulturer med *B. 'Nevada'* som ble dyrket med *R. baltica* (NR) og senere anrikt med Marol E (NM) eller marine fosfolipider (NP) var henholdsvis 259 ± 13 , 240 ± 15 og 211 ± 4 individ per ml. Gjennomsnittlig eggrate for de samme kulturene var henholdsvis $0,36 \pm 0,01$, $0,40 \pm 0,01$ og $0,38 \pm 0,03$ egg per individ.

Gjennomsnittlig tetthet i kulturer med *B. 'Cayman'* som ble dyrket med *R. baltica*(CR) og senere anrikt med Marol E (CM) eller marine fosfolipider (CP) var omtrent lik mellom kulturene (330 ± 15 individ per ml). Eggraten i de samme kulturene var henholdsvis $0,47 \pm 0,02$, $0,55 \pm 0,04$ and $0,61 \pm 0,04$ egg per individ.

4.1.1 Lipid innhold og fettsyrer i dietter

Tabell 6 viser fettsyre innhold og sammensetning i *R. baltica* og de to anriknings emulsjonene. Marol E hadde høyest innhold av mettede fettsyrer (SFA). Det ble også funnet forholdsvis høyt innhold av SFA i PL-emulsjonen, som hovedsakelig skyldtes det høye innholdet av C16:0 i marine fosfolipider. Relativt innhold av SFA i *R. baltica* var omtrent halvparten av nivåene i emulsjonene, og mye lavere i kvantitativt innhold.

Høyere innhold av C18:1n9 ($p < 0.05$) ble funnet i Marol E enn i PL-emulsjonen, noe som gav høyere nivå av de monoumettede fettsyrer (MUFA) i Marol E.

Nivået av flerumettede fettsyrer (PUFA) i *R. baltica* var høyere enn i de to emulsjonene ($p < 0,05$). Den dominerende fettsyren i *R. baltica* var C18:4n3 (24,8%) og C18:3n3 (23,8%). Marol E og PL-emulsjon inneholdt ikke C18:3n3 og bare spor av C18:4n-3 ble funnet i PL-emulsjonen. Innholdet av arakidonsyre (C20:4n-6, ARA) og eicospentaenoic acid (C20:5n-3, EPA) i PL-emulsjonen var høyere enn i *R. baltica* ($p < 0,05$), og ARA ble ikke funnet i Marol E.

Selv om det prosentvise innholdet av EPA in *R. baltica* (9,4%) og Marol E (0,7%) var forskjellig, så var det kvantitative innholdet omtrent likt (Tabell 7). DHA var den dominerende PUFA i Marol E og utgjorde omtrent 95% av de flerumettede fettsyrene og 41% av de totale fettsyrene, som var 2,5 ganger høyere enn i PL-emulsjonen, noe som resulterte i et høyt DHA/EPA forhold i Marol E.

Tabell 6. Fettsyre sammensetning i diettene (mean \pm SE). Σ SFA, sum av mettede fettsyrer, inkluderer C16:0 and C18:0; Σ MUFA, sum av mono umettede fettsyrer, inkluderer C16:1n7, C18:1n7, C18:1n9, C20:1n9; Σ PUFA, sum av poly umettede fettsyrer, inkluderer C18:2n6, C18:3n3, C18:3n6, C18:4n3, C20:4n3, C20:4n6, C20:5n3, C22:5n3, C22:6n3.

	<i>R. baltica</i> mg/g DW (n=3)	Marol E mg/g emulsion (n=2)	PL-emulsion
Total lipid	154 \pm 4.70	684 \pm 2.00	659 \pm 1.50
Total fatty acids	62.3 \pm 2.90	509 \pm 4.74	282 \pm 4.63
Fatty acids	Fatty acid% of TFA (n=6)		
C14:0	6.91 \pm 0.04	13.1 \pm 0.43	2.41 \pm 0.02
C16:0	5.54 \pm 0.07	12.0 \pm 0.40	19.8 \pm 0.05
C18:0	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	1.96 \pm 0.01
ΣSFA	12.4 \pm 0.11	25.1 \pm 0.83	24.2 \pm 0.05
C16:1n7	0.67 \pm 0.01	2.89 \pm 0.09	3.63 \pm 0.00
C18:1n7	3.05 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00	4.52 \pm 0.02
C18:1n9	0.61 \pm 0.01	26.33 \pm 0.88	13.5 \pm 0.02
C20:1n9	0.00 \pm 0.00	0.88 \pm 0.03	2.93 \pm 0.02
ΣMUFA	4.32 \pm 0.02	30.1 \pm 0.99	24.5 \pm 0.05
C18:2n6	5.31 \pm 0.02	1.67 \pm 0.49	1.16 \pm 0.01
C18:3n3	23.8 \pm 0.03	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
C18:3n6	0.69 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
C18:4n3	24.8 \pm 0.06	0.00 \pm 0.00	0.59 \pm 0.05
C20:4n3	0.57 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
C20:4n6	0.59 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00	1.28 \pm 0.01
C20:5n3	9.42 \pm 0.01	0.72 \pm 0.02	14.7 \pm 0.05
C22:5n3	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	1.25 \pm 0.01
C22:6n3	8.05 \pm 0.05	41.1 \pm 2.09	28.5 \pm 0.11
ΣPUFA	73.2 \pm 0.10	43.5 \pm 2.02	47.4 \pm 0.15
Σ n-3	66.6 \pm 0.15	41.8 \pm 2.07	44.9 \pm 0.14
Σ n-6	6.59 \pm 0.03	1.67 \pm 0.05	2.45 \pm 0.01
DHA/EPA ukjent	0.85 \pm 0.01	57.39 \pm 4.44	1.94 \pm 0.00
	10.1 \pm 0.03	0.48 \pm 0.02	3.97 \pm 0.21

Tabell 8 viser innholdet av PC og PE som % av tørrvekt og av totale lipider. Marol E inneholdt verken PC eller PE. Innholdet av PC i PL-emulsjonen var høyere enn innholdet av PE, mens innholdet av PE i *R. baltica* var høyere enn algens innhold av PC.

Tabell 7. Phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE) contents in the diet components expressed as mean±SE.

	% av tørrvekt				% av Lipid			
	<i>R. baltica</i> (n=5)	Marol E	PL-emulsjon (n=7)		<i>R. baltica</i> (n=5)	Marol E	PL-emulsjon (n=7)	
PC	1.27 ± 0.05	0.00	37.38 ± 0.32		9.7 ± 0.52	0.00	43.2 ± 0.38	
PE	3.09 ± 0.10	0.00	8.39 ± 0.45		20.5 ± 0.60	0.00	8.4 ± 0.37	

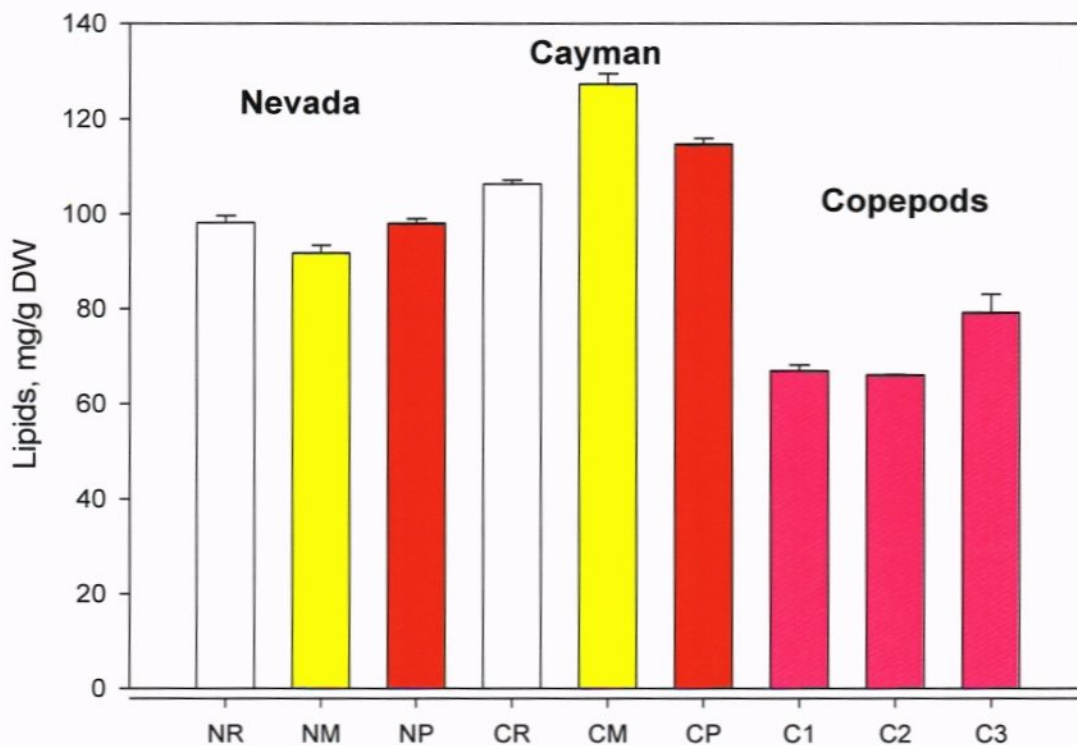
Tabell 8. Fettsyre innhold i PC og PE i diettene (mean ± SE). PL-PC: phosphatidylcholine i PL-emulsjon, PL-PE: phosphatidylethanolamine i PL-emulsjonen.

	Fettsyrer% av TFA i PC og PE (n=2)				
	<i>R. baltica</i> PC	<i>R. baltica</i> PE	PL-PC	PL-PE	
C14:0	6.23 ± 0.01	6.71 ± 0.44	1.49 ± 0.01	0.26 ± 0.00	
C16:0	9.06 ± 0.31	6.83 ± 0.45	23.3 ± 0.05	11.2 ± 0.00	
C18:0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.64 ± 0.00	3.05 ± 0.00	
ΣSFA	15.3 ± 0.30	13.5 ± 0.90	26.4 ± 0.06	14.5 ± 0.00	
C16:1n7	0.94 ± 0.01	1.03 ± 0.01	2.61 ± 0.00	0.72 ± 0.00	
C18:1n7	0.00 ± 0.00	0.77 ± 0.06	3.65 ± 0.00	7.99 ± 0.00	
C18:1n9	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	10.9 ± 0.02	13.8 ± 0.00	
C20:1n9	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.95 ± 0.00	5.57 ± 0.00	
ΣMUFA	0.94 ± 0.01	1.80 ± 0.05	19.1 ± 0.02	28.1 ± 0.00	
C18:2n6	5.87 ± 0.01	4.46 ± 0.23	0.82 ± 0.00	1.07 ± 0.00	
C18:3n3	18.5 ± 0.03	33.6 ± 1.63	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	
C18:4n3	16.6 ± 0.26	35.0 ± 0.82	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	
C20:4n3	1.96 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	
C20:4n6	1.83 ± 0.01	0.00 ± 0.00	1.43 ± 0.00	1.26 ± 0.00	
C20:5n3	25.7 ± 0.11	1.58 ± 0.61	16.4 ± 0.00	15.6 ± 0.00	
C22:5n3	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.16 ± 0.01	1.30 ± 0.00	
C22:6n3	13.3 ± 0.07	9.25 ± 1.85	31.2 ± 0.12	36.8 ± 0.00	
ΣPUFA	83.8 ± 0.29	83.9 ± 0.22	51.1 ± 0.11	56.0 ± 0.00	
Σn-3	76.1 ± 0.27	79.5 ± 0.01	48.8 ± 0.11	53.7 ± 0.00	
Σn-6	7.71 ± 0.02	4.46 ± 0.23	2.24 ± 0.00	2.33 ± 0.00	
DHA/EPA	0.52 ± 0.01	6.33 ± 1.27	1.90 ± 0.01	2.35 ± 0.00	

4.2 Rotatorier

4.2.1 Innhold av total lipid i rotatorier og copepoder

Figur 26 viser gjennomsnittlig lipid innhold i rotatorier og copepoder (prøver hentet fra sjø). Generelt var det høyere innhold av totalt lipid i rotatorier sammenlignet med copepoder ($p < 0.05$), henholdsvis 106 mg/g DW og 71 mg/g DW. Det totale lipid innholdet i *B. 'Cayman'* var høyere enn i *B. 'Nevada'* ($p < 0.05$).



Figur 26. Innhold av lipid i rotatorier og copepoder. Alle data er gjennomsnitt av tre kulturer eller 9 replikater, avvik er vist som \pm SE. C1, copepode størrelse 300-400 μ m; C2, copepode størrelse 400-500 μ m; C3, copepode størrelse 700-1000 μ m.

B. 'Cayman' fikk økt innhold av lipider per tørrvekt etter anrikning. Høyeste innhold ble funnet i CM-rotatoriene (127 mg/g DW), som var høyere enn alle andre behandlinger ($p < 0.05$), etterfulgt av CP-rotatorier (115 mg/g DW) og CR-rotatorier (106 mg/g DW). Ingen økning i lipid per tørrvekt ble funnet etter anrikning av *B. 'Nevada'*.

Innhold av totale lipider i den største størrelsesfraksjonen av copepoder (C3, 700-1000 μ m, 79.2 mg/g DW) var høyere ($p < 0.05$) enn lipid innhold funnet hos de mindre størrelsene av copepoder (66.4 mg/g DW). Ingen signifikante forskjeller i totalt lipid innhold ble funnet mellom C1 (300-400 μ m) og C2 (400-500 μ m) copepoder.

4.2.2 Fettsyre sammensetning i rotatorier

Tabell 9 viser fettsyresammensetningen (% av totale fettsyrer) i *B. 'Nevada'* og *B. B. 'Cayman'* før og etter en anrikning med de to ulike lipid emulsjonene. Ingen signifikante forskjeller i nivå SFA ble funnet mellom *B. 'Nevada'* behandlingene ($p > 0.05$) (rundt 20% av totale fettsyrer). Det var en liten økning av SFA i *B. 'Cayman'* etter anrikning ($p < 0.05$), til like nivåer av SFA for CM og CP-rotatorier, dette på grunn av en svak økning i C14:0 og C16:0. MUFA innholdet økte i begge rotatorie typene pga en økning av C18:1n9. MUFA nivåene var 1.8 og 3 ganger høyere i NM og CM-rotatoriene sammenlignet med nivået før anrikning. Denne økningen var grunnet det høyere innholdet av C18:1n9 i Marol E (26% av totale fettsyrer) enn i PL-emulsjonen (14% av totale fettsyrer).

Det var ingen signifikante forskjeller i PUFA mellom NR og CR rotatorier ($p > 0.05$). Samtidig ble nivåene av PUFA redusert etter anrikning med både Marol E og PL- emulsjonen ($p < 0.05$). Dette var hovedsakelig grunnet en reduksjon av C18:3n3 og C18:4n3. Innholdet av ARA (20:4n-6) og EPA (20:5n-3) ble for begge typene rotatorier redusert etter anrikning med Marol E ($p < 0.05$), og var uendret etter en anrikning med PL- emulsjon ($p > 0.05$), dette fordi EPA innholdet i PL-emulsjonen (14.7%) var høyere enn i Marol E (0.7%). Høyere nivå av DHA (41.1%) i Marol E ($p < 0.05$) gav NM og CM-rotatorier med høyere DHA nivåer og høyere DHA/EPA forhold. Høyeste nivå av DHA og MUFA ble funnet i CM-rotatorier, henholdsvis 16.0% og 17.5%. Nest høyeste nivå ble funnet i NM-rotatorier (10.3%, 13.8%). DHA og MUFA nivåene i begge rotatorie stammer var signifikant høyere etter an anrikning også med PL emulsjonen ($p < 0.05$).

Tabell 9. Relativ fettsyre sammensetning (% av totale fettsyrer) i totalt lipid i rotatorier, gjennomsnitt \pm SE av tre replikater.

Fatty acid%	Nevada			Cayman		
	NR	NM	NP	CR	CM	CP
C14:0	4.88 \pm 0.06	5.20 \pm 0.10	3.79 \pm 0.07	3.97 \pm 0.05	5.95 \pm 0.09	3.92 \pm 0.03
C16:0	12.6 \pm 0.10	12.9 \pm 0.10	13.9 \pm 0.12	11.6 \pm 0.15	12.6 \pm 0.21	14.4 \pm 0.07
C18:0	3.26 \pm 0.09	3.25 \pm 0.04	3.02 \pm 0.04	3.30 \pm 0.08	2.44 \pm 0.03	3.14 \pm 0.05
ΣSFA	20.7 \pm 0.10	21.4 \pm 0.15	20.7 \pm 0.21	18.8 \pm 0.28	21.0 \pm 0.17	21.5 \pm 0.05
C16:1n7	1.34 \pm 0.03	1.52 \pm 0.02	1.64 \pm 0.02	1.12 \pm 0.01	1.58 \pm 0.02	1.52 \pm 0.02
C18:1n7	2.78 \pm 0.03	2.09 \pm 0.03	2.77 \pm 0.02	2.65 \pm 0.01	1.67 \pm 0.03	2.64 \pm 0.03
C18:1n9	0.87 \pm 0.04	7.06 \pm 0.14	3.69 \pm 0.05	0.00 \pm 0.00	11.2 \pm 0.39	2.74 \pm 0.02
C20:1n9	2.47 \pm 0.09	2.24 \pm 0.0	2.37 \pm 0.01	2.16 \pm 0.03	2.21 \pm 0.00	1.77 \pm 0.02
C22:1n9	0.00 \pm 0.00	0.86 \pm 0.04	0.70 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00	0.83 \pm 0.01	0.84 \pm 0.03
ΣMUFA	7.46 \pm 0.10	13.8 \pm 0.14	10.9 \pm 0.11	5.94 \pm 0.05	17.5 \pm 0.36	9.50 \pm 0.05
C18:2n6	8.59 \pm 0.09	6.07 \pm 0.21	8.40 \pm 0.09	10.3 \pm 0.12	7.81 \pm 0.08	9.46 \pm 0.02
C18:3n3	17.8 \pm 0.05	13.0 \pm 0.18	13.4 \pm 0.16	15.6 \pm 0.15	10.6 \pm 0.28	14.4 \pm 0.03
C18:3n6	0.73 \pm 0.03	0.00 \pm 0.00	0.69 \pm 0.01	1.00 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
C18:4n3	7.71 \pm 0.11	5.93 \pm 0.12	5.98 \pm 0.08	7.80 \pm 0.21	5.52 \pm 0.22	7.34 \pm 0.05
C20:2n6	0.44 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.70 \pm 0.02	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
C20:3n3	1.17 \pm 0.03	0.56 \pm 0.01	0.57 \pm 0.01	1.43 \pm 0.01	0.57 \pm 0.03	0.85 \pm 0.01
C20:3n6	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.86 \pm 0.02	0.00 \pm 0.00	0.57 \pm 0.01
C20:4n3	9.62 \pm 0.02	7.77 \pm 0.06	7.40 \pm 0.03	9.79 \pm 0.10	5.09 \pm 0.10	7.18 \pm 0.05
C20:4n6	1.71 \pm 0.02	0.97 \pm 0.03	1.94 \pm 0.03	1.69 \pm 0.01	0.96 \pm 0.02	1.59 \pm 0.01
C20:5n3	8.52 \pm 0.09	7.99 \pm 0.14	8.75 \pm 0.09	8.70 \pm 0.16	6.27 \pm 0.11	8.71 \pm 0.06
C22:5n3	1.49 \pm 0.02	1.67 \pm 0.04	1.65 \pm 0.08	1.89 \pm 0.03	1.47 \pm 0.01	1.70 \pm 0.02
C22:6n3	5.47 \pm 0.13	10.3 \pm 0.41	8.34 \pm 0.21	4.71 \pm 0.10	16.0 \pm 0.27	6.76 \pm 0.06
ΣPUFA	63.1 \pm 0.30	54.1 \pm 0.27	57.1 \pm 0.14	64.5 \pm 0.31	54.3 \pm 0.62	58.6 \pm 0.08
Σ n-3	51.8 \pm 0.30	47.1 \pm 0.42	46.1 \pm 0.12	49.9 \pm 0.47	45.6 \pm 0.53	47.0 \pm 0.07
Σ n-6	11.3 \pm 0.14	7.05 \pm 0.23	11.0 \pm 0.12	14.6 \pm 0.16	8.78 \pm 0.09	11.6 \pm 0.01
DHA/EPA	0.64 \pm 0.01	1.28 \pm 0.04	0.95 \pm 0.02	0.54 \pm 0.01	2.56 \pm 0.09	0.78 \pm 0.01
Ukjent	8.22 \pm 0.19	10.6 \pm 0.24	11.0 \pm 0.11	10.7 \pm 0.09	7.08 \pm 0.14	10.34 \pm 0.12

4.2.3 Kvantitativt innhold av fettsyrer i totale lipider

Tabell 10 viser kvantitativt innhold av fettsyrer i *B. Nevada* og *B. Cayman* før og etter en anrikning med de to lipid emulsjonene. Ingen forskjeller i innhold av SFA ble funnet mellom Nevada rotatoriene ($p > 0.05$). Innholdet av SFA økte i Cayman etter anrikning noe som i all hovedsak skyldtes økning av C14:0 og C16:0 ($p < 0.05$). Innholdet av MUFA økte i begge stammene rotatorier ($p < 0.05$), og spesielt i CM-rotatorier (11.3 mg/g DW) som var 4.7 ganger høyere enn i CR-rotatorier (2.42 mg/g DW). Innholdet av MUFA i NM-rotatorier (5.21 mg/g DW) var 1.7 ganger høyere enn i NR-rotatorier (3.09 mg/g DW), mens innholdet av MUFA var 2.1 og 1.3 ganger høyere i CP og NP-rotatorier sammenlignet med innholdet før anrikning. Dette indikerer at Marol E var en mer effektiv emulsjon for anrikning av *B. Cayman* enn for *B. Nevada*.

Ingen forskjeller i innholdet av PUFA ble funnet mellom NR og CR-rotatorier. Innholdet av PUFA i *B. Nevada* ble redusert etter anrikning ($p < 0.05$), noe som hovedsakelig skyldtes en reduksjon av C18:3n3. I kontrast til dette, ble innholdet av PUFA i *B. Cayman* økt etter anrikning ($p < 0.05$), dette på grunn av økningen i DHA mens C18:3n3 var uendret. Ingen forskjeller i ARA innhold ble funnet etter anrikning ($p > 0.05$), bortsett fra ARA innholdet i NM-rotatorier, som ble redusert med omtrent 50% sammenlignet med NR-rotatorier.

Tabell 10. Kvantitativt innhold av fettsyrer (mg/g DW) i den totale lipid fraksjonen fra rotatorier, uttrykt som gjennomsnitt \pm SE, for tre replikater.

Fatty acid mg/g DW	Nevada			Cayman		
	NR	NM	NP	CR	CM	CP
C14:0	2.02 \pm 0.06	1.97 \pm 0.07	1.40 \pm 0.02	1.62 \pm 0.02	3.84 \pm 0.17	2.09 \pm 0.07
C16:0	5.20 \pm 0.08	4.88 \pm 0.09	5.12 \pm 0.04	4.71 \pm 0.05	8.11 \pm 0.15	7.67 \pm 0.27
C18:0	1.35 \pm 0.06	1.23 \pm 0.01	1.11 \pm 0.02	1.34 \pm 0.01	1.58 \pm 0.06	1.68 \pm 0.08
ΣSFA	8.57 \pm 0.19	8.08 \pm 0.18	7.63 \pm 0.07	7.67 \pm 0.06	13.5 \pm 0.36	11.4 \pm 0.41
C16:1n7	0.55 \pm 0.01	0.58 \pm 0.02	0.60 \pm 0.01	0.46 \pm 0.01	1.02 \pm 0.02	0.81 \pm 0.03
C18:1n7	1.15 \pm 0.03	0.79 \pm 0.01	1.02 \pm 0.01	1.08 \pm 0.02	1.08 \pm 0.05	1.40 \pm 0.04
C18:1n9	0.36 \pm 0.03	2.67 \pm 0.10	1.36 \pm 0.02	0.00 \pm 0.00	7.23 \pm 0.23	1.46 \pm 0.05
C20:1n9	1.02 \pm 0.04	0.85 \pm 0.02	0.87 \pm 0.01	0.88 \pm 0.01	1.42 \pm 0.04	0.94 \pm 0.03
C22:1n9	0.00 \pm 0.00	0.32 \pm 0.01	0.26 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00	0.53 \pm 0.02	0.44 \pm 0.02
ΣMUFA	3.09 \pm 0.09	5.2 \pm 0.15	4.03 \pm 0.04	2.42 \pm 0.03	11.3 \pm 0.31	5.06 \pm 0.16
C18:2n6	3.56 \pm 0.05	2.30 \pm 0.10	3.10 \pm 0.04	4.21 \pm 0.05	5.04 \pm 0.17	5.04 \pm 0.17
C18:3n3	7.38 \pm 0.15	4.90 \pm 0.07	4.93 \pm 0.06	6.36 \pm 0.18	6.85 \pm 0.34	7.68 \pm 0.25
C18:3n6	0.30 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00	0.25 \pm 0.00	0.41 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
C18:4n3	3.20 \pm 0.11	2.24 \pm 0.04	2.21 \pm 0.03	3.19 \pm 0.15	3.57 \pm 0.22	3.91 \pm 0.13
C20:2n6	0.19 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.29 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
C20:3n3	0.49 \pm 0.02	0.21 \pm 0.01	0.21 \pm 0.00	0.58 \pm 0.01	0.37 \pm 0.03	0.45 \pm 0.02
C20:3n6	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.35 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.31 \pm 0.01
C20:4n3	3.99 \pm 0.08	2.94 \pm 0.06	2.73 \pm 0.03	3.99 \pm 0.04	3.29 \pm 0.15	3.83 \pm 0.13
C20:4n6	0.71 \pm 0.02	0.37 \pm 0.01	0.71 \pm 0.01	0.69 \pm 0.01	0.62 \pm 0.03	0.85 \pm 0.03
C20:5n3	3.53 \pm 0.10	3.02 \pm 0.08	3.23 \pm 0.05	3.55 \pm 0.13	4.04 \pm 0.16	4.64 \pm 0.17
C22:5n3	0.62 \pm 0.01	0.63 \pm 0.03	0.61 \pm 0.03	0.77 \pm 0.01	0.95 \pm 0.03	0.91 \pm 0.03
C22:6n3	2.27 \pm 0.10	3.88 \pm 0.21	3.08 \pm 0.09	1.92 \pm 0.07	10.3 \pm 0.31	3.60 \pm 0.14
ΣPUFA	26.2 \pm 0.63	20.4 \pm 0.46	21.1 \pm 0.21	26.3 \pm 0.63	35.0 \pm 1.37	31.2 \pm 1.07
Σ n-3	21.5 \pm 0.55	17.8 \pm 0.40	17.0 \pm 0.18	20.3 \pm 0.58	29.3 \pm 1.16	25.0 \pm 0.85
Σ n-6	4.69 \pm 0.10	2.66 \pm 0.11	4.06 \pm 0.05	5.94 \pm 0.06	5.66 \pm 0.20	6.20 \pm 0.21
DHA/EPA	0.64 \pm 0.01	1.28 \pm 0.04	0.95 \pm 0.02	0.54 \pm 0.01	2.56 \pm 0.09	0.78 \pm 0.01
TFA	41.8 \pm 0.75	37.8 \pm 0.75	36.9 \pm 0.31	40.7 \pm 0.80	64.4 \pm 2.04	53.3 \pm 1.84

Det ble ikke funnet noen endringer i innholdet av EPA i Nevada ($p > 0.05$), dette til tross for det høyere EPA innholdet i dietten som ble gitt til NP behandlingen. EPA innholdet i CP-rotatorier var derimot høyere enn i CR og CM rotatorier ($p < 0.05$). Det ble også funnet en liten økning av DHA innholdet etter anrikning ($p < 0.05$). Høyeste innhold av DHA ble funnet i CM-rotatorier (10.3 mg/g DW), som var 5.4 ganger høyere enn i CR-rotatoriene (1.92 mg/g DW). DHA

innholdet i CP-rotatorier økte significant ($p < 0.05$), men likevel ikke så mye som verdien i CM-rotatorier.

4.2.4 PC og PE innhold i rotatorier

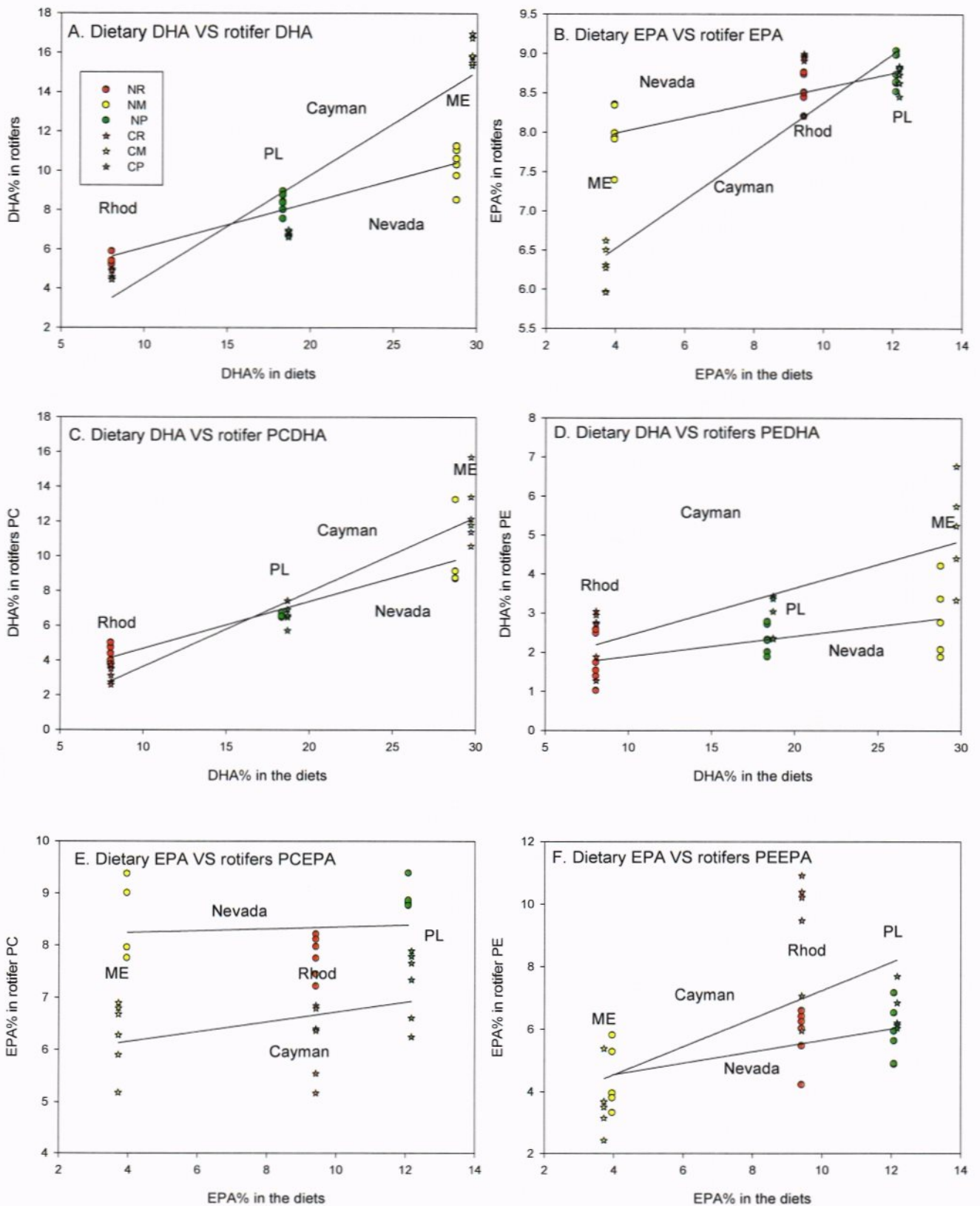
Tabell 11 viser innholdet av PC og PE (% av tørrvekt) i samtlige rotatorie behandlinger. Generelt er innholdet av PC høyere enn innholdet av PE i rotatoriene. Det ble funnet en liten økning (men ikke sigifikant) av PE/PC forholdet i *B. Nevada* etter anrikning og en liten reduksjon i dette forholdet i *B. Cayman* (ikke signifikant), dette tyder på en konstant PE/PC ratio uavhengig av stamme rotatorie og diett behandling. Innholdet av PC var konstant for *B. Nevada*, mens den var såvidt redusert i *B. Cayman* etter anrikning ($p > 0.05$). Den samme trenden med liten endring ble funnet for PE hos begge stammene ($p > 0.05$). Likevel, innholdet av PE i CM rotatorier var signifikant lavere sammenlignet med innholdet før anrikning ($p < 0.05$).

Tabell 11. Innhold av fosfatidylcholine (PC) og fosfatidylethanolamine (PE) (% av tørrvekt) i rotatorier, gjennomsnitt \pm SE av tre replikat.

%DW	Nevada			Cayman		
	NR	NM	NP	CR	CM	CP
PC	2.18 \pm 0.06	2.23 \pm 0.04	2.08 \pm 0.06	2.61 \pm 0.05	2.37 \pm 0.08	2.48 \pm 0.05
PE	1.88 \pm 0.08	2.21 \pm 0.05	1.90 \pm 0.05	2.34 \pm 0.05	1.82 \pm 0.06	2.10 \pm 0.06
PE/PC	0.86 \pm 0.04	0.99 \pm 0.03	0.92 \pm 0.03	0.90 \pm 0.02	0.76 \pm 0.02	0.85 \pm 0.06

4.2.5 Sammenheng n-3 HUFA nivåer i PC og PE mellom dietter og rotatorier

Signifikant sammenheng ($p < 0.0001$) ble funnet mellom % DHA i diett og % PC-DHA i *B. Nevada* og *B. Cayman* (Figur 27 C) og stigningskoeffisienten for *B. Cayman* var høyere enn for *B. Nevada*. PC-DHA innholdet i CM rotatorier (12.5%) var nært % DHA i totalt lipid funnet i CM rotatorier. PC-DHA innholdet i *B. Nevada* rotatorier (9.9%) var 33% av % DHA i dietten, noe som også var nært til DHA andel funnet i totalt lipid i NM rotatorier. Dette illustrerer at PC-DHA nivåer i rotatorier blir påvirket av dietten innhold av DHA.

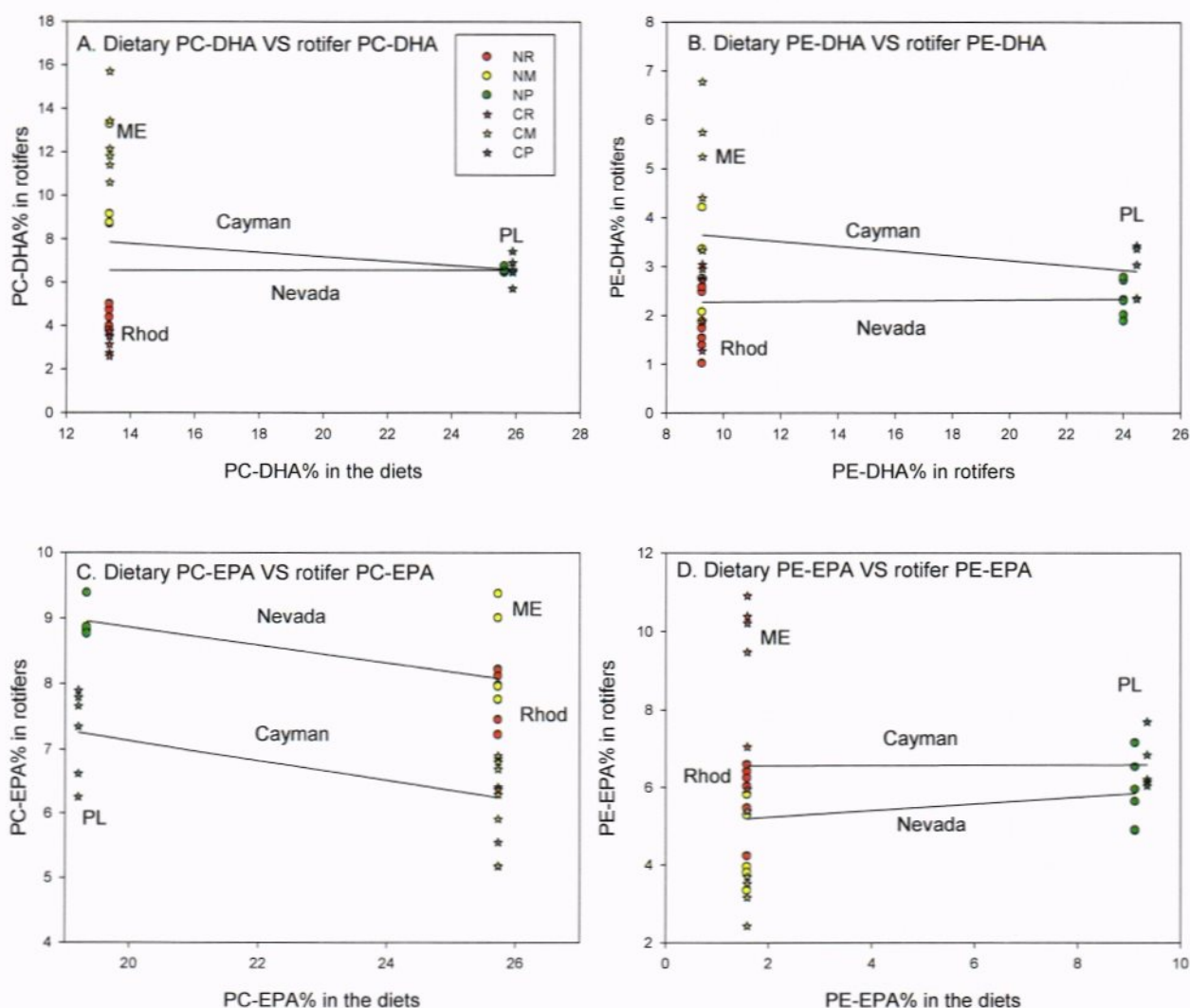


Figur 27. Sammenheng mellom nivå av % HUFA i diett og % HUFA i total lipid, PC and PE i rotatorier

DHA% i PE (Fig. 27 D) og EPA% i PE (Fig. 27 F) hos begge stammer av rotatorier hadde signifikant sammenheng med nivåene av HUFA i diettene ($p < 0.05$). Det var bare en lav økning av

PE-DHA og PE-EPA ettersom diettenes essensielle fettsyrer økte. r^2 verdien var også lav i regression analysene, noe som indikerer en svak positivt forhold mellom HUFA i PE mellom dietter og rotatorier. Innholdet av PC-EPA% (Figur 27 E) i begge stammer viste ikke signifikant samsvar med innholdet av EPA i diettene ($p>0.05$).

Figur 28 viser forholdene mellom n-3 HUFA i PC og PE mellom dietter og rotatorier. Korrelasjonene mellom andel PC-EPA i diettene og rotatoriene er vist i Figur 28 C var significant ($p<0.05$), men en negative a Verdi og en lav r^2 verdi i regresjonsligningen indikerer et svakt negativt forhold. De andre korrelasjonene vist i Figur 28 A, B og D var ikke statistisk significant ($p>0.05$). Høyere DHA eller EPA i PC og PE i diettene resulterte ikke i høyere verdier i den respektive fettklassen i rotatoriene. Lav r^2 og a verdi indikerer at HUFA nivåer i rotatorienes PC og PE var uavhengig eller svakt påvirket av diettenes HUFA nivå i PC og PE.



Figur 28. Forholdet mellom diettenes innhold av DHA, EPA i de to fettfraksjonene PC og PE, og innholdet av DHA, EPA i rotatorienes PC og PE.

4.3 Konklusjon

De to rotatoriene *B. Nevada* og *B. Cayman* oppnådde liknende fettsyreprofiler når de ble anriket med same lipid kilde, og fettsyresammensetningen i begge rotatoriene var godt korrelert med nivåene i diettene. Innholdet av PC og PE sammen med PE/PC forholdene for begge typene rotatorier var stabile og uavhengig av diett. Nivå av MUFA i PC og PE økte significant etter anrikning ($p < 0.05$). PC-DHA nivå i rotatoriene økte etter anrikning, mens PE-DHA nivåene forble uendret. Dette indikerer at DHA i PE var mer utfordrende å manipulere enn DHA i PC. Men, DHA og EPA nivåer i PC og PE i naturlig forekommende copepoder var mye høyere enn i anrikede rotatorier.

Det prosentvise innholdet av DHA av de totale fettsyrer i PC i rotatorier ble påvirket av det totale DHA nivået i diettene, og uavhengig av % DHA innholdet i diettens PC. Emulgerte marine fosfolipider fra torskerogn gav ikke en bedre anrikning enn når DHA ble gitt som triacylglyserider (Marol E), med tanke på DHA akkumulering av membran fosfolipider i rotatoriene.

Det synes som om både fosfolipider og triacylglyserider var fullt fordøyd og at membran fosfolipider blir resyntetisert i rotatorier. Videre ser det ut som om denne resyntetiseringen er basert på aktiverte frie fettsyrer, monoacylglyserider og lyso-fosfolipider.

5 SAMMENLIGNING AV DYRKEDE ROTATORIER, DYRKEDE COPEPODER OG PLANKTON FRA POLL (DP4)

5.1 Bakgrunn

Kontrollert produksjon av torskeyngel er avhengig av stabilt innhold i rotatoriene som brukes. Dette oppnås blant annet gjennom å følge gode protokoller for rotatorieanriking. For å bestemme hvor stabil sammensetningen av rotatorier er vil det være nødvendig å gjøre valg med hensyn på hvilke analytter man skal legge til grunn for stabiliteten. Dette vil kunne avgrense verdien av det målet på stabilitet som da vil være resultatet av å studere et utvalg i kontrast til det å analysere den komplette sammensetningen av rotatoriene. En slik komplett analyse kan ses på som utfordrende med tanke på det tusentall av metabolitter/analytter man da vil måtte analysere, men med metodesett som baserer seg på ikke selektive analysemetoder og multivariat databehandling så vil man kunne se på stabilitet og likheter i et stort antall kjente og ukjente analytter på en relativt enkel og kostnadseffektiv måte. Fagfeltet metabolomics er basert på omfattende analyser av

metabolitter ved hjelp av fortrinnsvis kjernemagnetisk resonans spektroskopi (NMR) og massespektrometri (MS) kombinert med multivariat statistikk og har et stort potensial for bruk innen en rekke fagfelt. Her har vi gjort en studie for å sammenligne dyrkede rotatorier (Cayman), dyrkede copeoder (*Acartia tonsa*) og høstet plankton fra poll (Lofilab, Steine). Det er analysert polare ekstrakter fra disse med NMR basert metabolomics for å studere et stort antall variabler og sammenlikne disse. De viktigste analyttene er beskrevet.

5.2 Mål

Sammenligning av dyrkede rotatorier, dyrkede copepoder og plankton fra poll

5.3 Materiale og metode

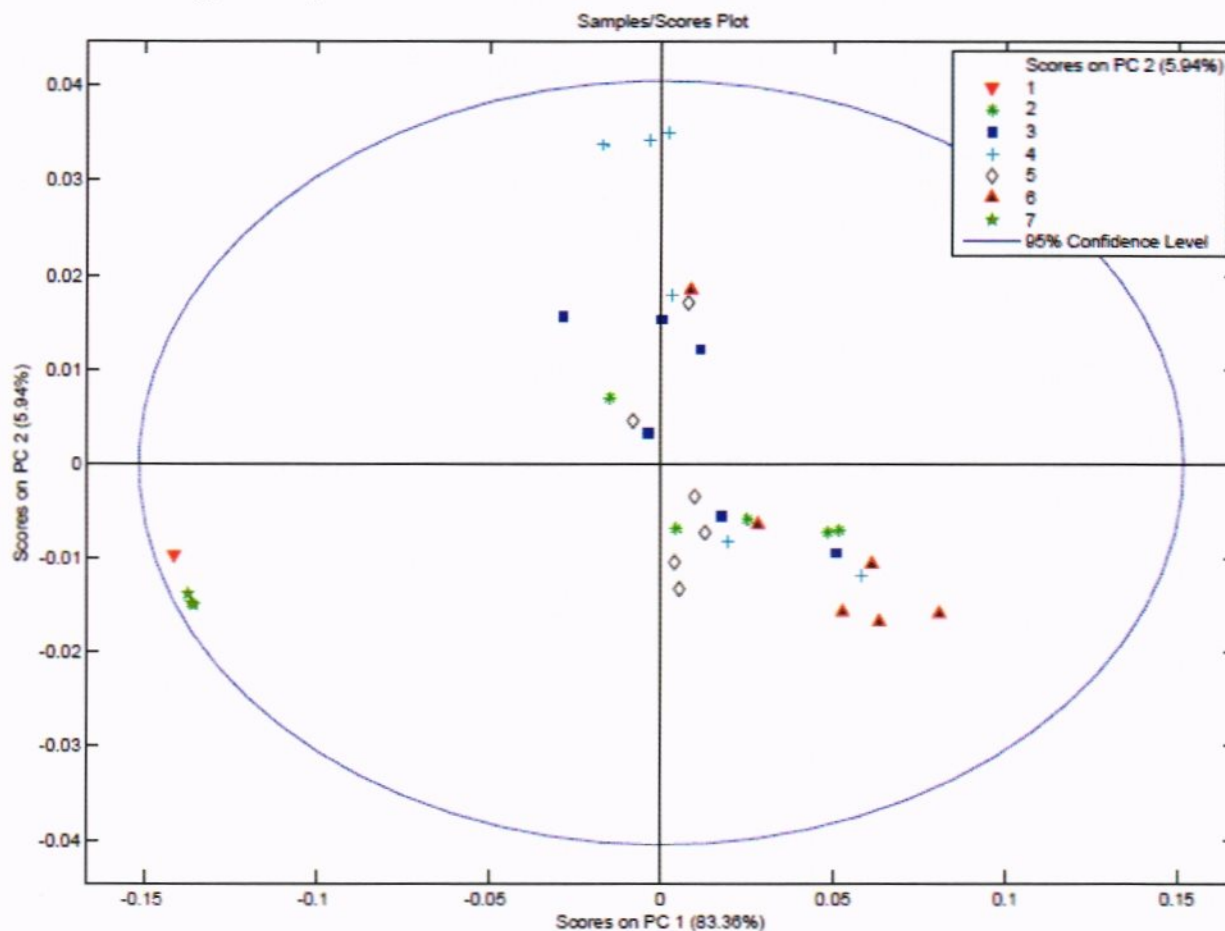
Uttak av rotatorier, copepoder og plankton til analyse med NMR ble gjort på samme måte. Vann med organismer ble først silt over plankton duk (64µm) og vasket godt med ferskvann (ca 20 °C). Deretter ble mest mulig vann fjernet ved å tørke under duken med papir. Massen ble så overført til prøveglass, frosset ned på tørris, og overført til fryser for lagring (-80 °C).

5.3.1.1 NMR metabolomics

Prøve (~50 mg våtvekt) ble ekstrahert i en Precellys 24 kulehomogenisator (2x15 s ved 5000G) i en vandig metanol-løsning (66 %, 1 ml). Ekstraktet ble sentrifugert og supernatanten ble dampet inn på en vakumsentrifuge. Prøvene ble løst med D₂O (i 550 µl) bufret med PBS til pH 7.4. 500 µl av løsningen ble brukt til NMR spektroskopi. Spektrene ble tatt opp med vannundertrykking på et BRUKER DRX 600 NMR spektrometer med en QXI-probe.

Rådata ble importert til matlab og multivariat dataanalyse ble gjort med PLS-toolbox. Det ble gjort en prinsipalkomponentanalyse for å redusere data bestående av 1624 variabler ned i 2 dimensjoner for forenklet tolkning av dataene.

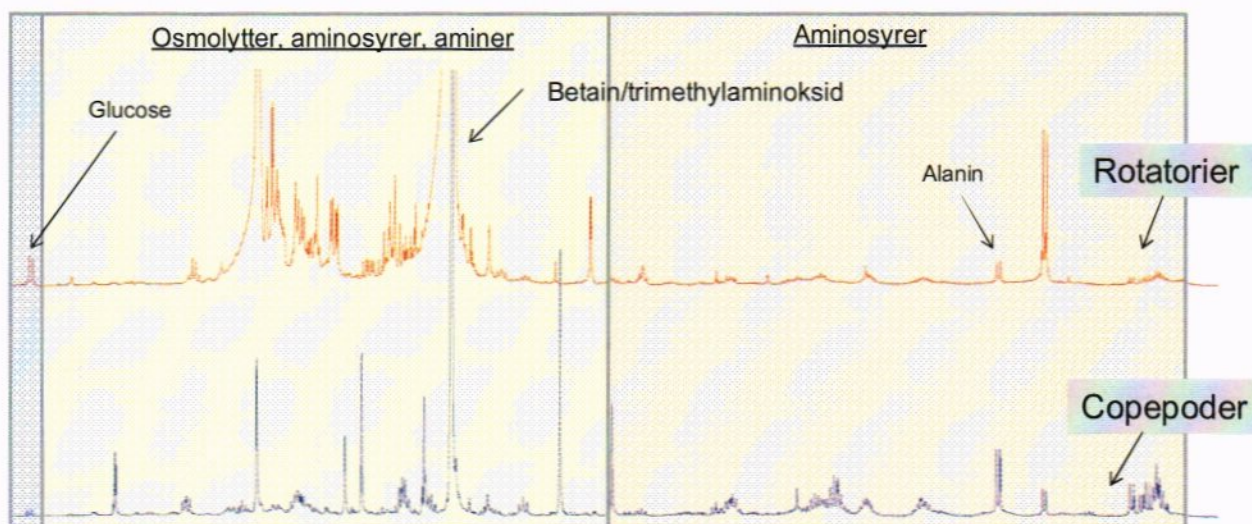
5.4 Resultat og diskusjon



Figur 29: PCA scores plot for analyse av prøver fra begge prøveuttakene (gruppe 2-6) og med en gruppe med høstede (gruppe 7) og dyrkede copepoder (gruppe 1). Det observeres at copepodene grupperer helt i utkanten av 95 % konfidensintervallet for gruppen med prøver og skiller seg med dette klart fra rotatoriene i sammensetning observert med NMR. Dyrkede copepoder og pollplankton grupperer likt.

Det var en klar forskjell mellom sammensetningen i pollplankton og dyrkede copepoder sammenliknet med rotatoriene i studien som vist i figur 29. Rotatoriene grupperer godt i PC1-retningen når de sammenliknes med så forskjellige prøver som plankton/copepodeprøvene. Forskjellene kan observeres med hensyn på hvilke variabler som gir opphav til likheter og ulikheter i loadings plot fra PCA analysen som er vist i figur 30. Dette viser at det er i stor grad lipider som utgjør den forskjellen. Dette er data som er tatt opp på polare ekstrakter og lipider som observeres er tilstede i små mengder. At lipidene selv da viser seg å være opphavet til mye av separasjonen av mellom de to gruppene er en sterk indikasjon på at det er betydelige forskjeller i denne stoffklassen det er snakk om. $^1\text{H-NMR}$ er en metode som gir lavopløste data med hensyn

på lipider og en sammenlinkning med multivariat analyse kunne vært ytterligere forsterket dersom metoder som kan gi detaljer for denne stoffklassen ble inkludert.



Figur 30: Figuren viser sammenlinkning av et metabolitt-fingerprint fra rotatorier og copepoder

I denne sammenlinkningen av et metabolitt-fingerprint fra rotatorier og copepoder er det tydelige forskjeller i nivåer av ulike metabolitter. Analysen gir forskjeller i en rekke ulike stoffklasser samtidig og vil kunne brukes i kvalitetskontroll og i optimalisering av sammensetning i levendeføret.

Konklusjon

I forhold til målene for delprosjektet så kan det konkluderes med at lipider er den store forskjellen mellom pollplankton og rotatorier. Dette er også tidligere vist med andre metoder. I tillegg viser resultatene i Figur 30 at vi kan se forskjeller i en lang rekke andre stoffklasser.

På generelt grunnlag, og som en kommentar til eventuelle videreføring av prosjektet kan andre ikke selektive analysemetoder som MS og flere klassiske analysemetoder som fettsyreanalyse, komplett aminosyreanalyse og lipidklasser være med på å styrke en multivariat analyse for vurdering av forskjeller og stabilitet/reproduserbarhet. Flere og hyppige prøveuttak vil også være med på å styrke studier av denne art.

6 NÆRINGSSAMMENSETNING I ROTATORIER VED ULIKE YNGELANLEGG (DP5)

6.1 Bakgrunn

Det har vært et ønske fra flere oppdrettere om å få sammenlignet næringsinnhold i rotatorier mellom de ulike anleggene som er i drift, for på den måten å kunne avdekke forskjeller og dermed gjøre det lettere å forbedre protokoller. For å få til dette skulle alle yngelanlegg besøkes to ganger, fortrinnsvis i løpet av perioden hvor rotatorier ble benyttet i startfôring av torsk. Under besøket ble det tatt ut prøver av rotatorier for kjemisk analyse og for analyse med NMR. Det ble i tillegg tatt ut prøver av fiskelarver for måling av tørrvekt og innhold av protein. Stopp i produksjonen av yngel på flere av anleggene gjorde det vanskelig å finne tidspunkt hvor besøk kunne gjennomføres. Anlegg hvor besøk ble gjennomført som planlagt var:

Troms Marin Yngel (TMY), Lofilab og Avlsstasjonen: 30.04.09 og 18.05.09

Codfarmers: 23.07.09 og 13.08.09

Atlantic Cod Juveniles: 08.06.09 og 22.06.09

Anlegg som ikke ble besøkt var: Sagafjord AS og Havlandet Marin Yngel AS, da de ikke hadde rotatorieproduksjon i tidsrommet som var aktuelt for besøk. Profunda sendte inn prøver av fiskelarver og rotatorier (tatt ut 04.12.09 og 26.12.09). Disse resultatene er ikke med i denne rapporten da de er behandlet etter andre prosedyrer.

6.2 Mål

Målet med dette delprosjektet var å gi deltakerne en mulighet til å sjekke hvor reproducerbar deres produksjon av rotatorier var med hensyn på næringsinnhold. Prosjektet ga samtidig en mulighet til å se på hvilke forskjeller som finnes i næringsinnhold i rotatorier mellom de involverte yngelanlegg. En annen viktig del av dette prosjektet var å diskutere rotatorieproduksjon med de ansvarlige på hvert enkelt anlegg og komme med innspill knyttet til denne.

6.3 Materiale og metode

6.3.1 Generell beskrivelse av rotatorieproduksjon ved anleggene

Det benyttes i hovedsak to ulike produksjonssystem i dagens klekkerier. Dette er ulike tanker i størrelsen 1-5m³, som driftes med en viss grad av vannutskifting (kontinuerlig eller semi-kontinuerlig), eller et ferdig innkjøpt resirkuleringssystem fra Aquatic ecosystem Ltd. Tettheten i produksjonen varierer fra 500-8000 individ/ml, men de fleste ligger på tettheter fra 1000 til 4000 individ/ml. For sikre nødvendig oksygen innhold i vannet tilsettes ren oksygen via ulike system til en ønsket metning på 80-100 %. Flere anlegg rapporterte at de har mistet kulturer på grunn av

problem med oksygen- overvåking og/eller tilsetning i perioder. En årsak til dette kan være at en del sensorer som benyttes i dag ikke er godt egnet til det relativt tøffe miljøet du finner i en rotatoriekultur.

Som dyrkingsfôr benyttes det i all hovedsak *Chlorella*, men enkelte klekkerier bruker også *Oriculture* (Skretting) eller en blanding av *Chlorella* og gjær. Som anriking benyttes ulike produkter, men mange har en innblanding av *Multigain* (Biomar). Andre anrikingsfôr som benyttes er *Origreen* (Skretting), *Pavlova* (Reed) og produkter som inneholder marine fosfolipider.

6.3.2 NMR metabolomics

Uttak av rotatorier til analyse med NMR ble gjort på samme måte ved alle anlegg. Vann med organismer ble først silt over plankton duk (64 μ m) og vasket godt med ferskvann (ca 20 °C). Deretter ble mest mulig vann fjernet ved å tørke under duken med papir. Massen ble så overført til prøveglass, frosset ned på tørris, og overført til fryser for lagring (-80 °C). Prøve (~50 mg våtvekt) ble ekstrahert i en Precellys 24 kulehomogenisator (2x15 s ved 5000G) i en vandig metanol-løsning (66 %, 1 ml). Ekstraktet ble sentrifugert og supernatanten ble dampet inn på en vakumsentrifuge. Prøvene ble løst med D₂O (i 550 μ l) bufret med PBS til pH 7.4. 500 μ l av løsingen ble brukt til NMR spektroskopi. Spektrene ble tatt opp med vannundertrykking på et BRUKER DRX 600 NMR spektrometer med en QXI-probe.

Rådata ble importert til matlab og multivariat dataanalyse ble gjort med PLS-toolbox. Det ble gjort en prinsipalkomponentanalyse for å redusere data bestående av 1624 variabler ned i 2 dimensjoner for forenklet tolkning av dataene.

6.3.3 CN analyser

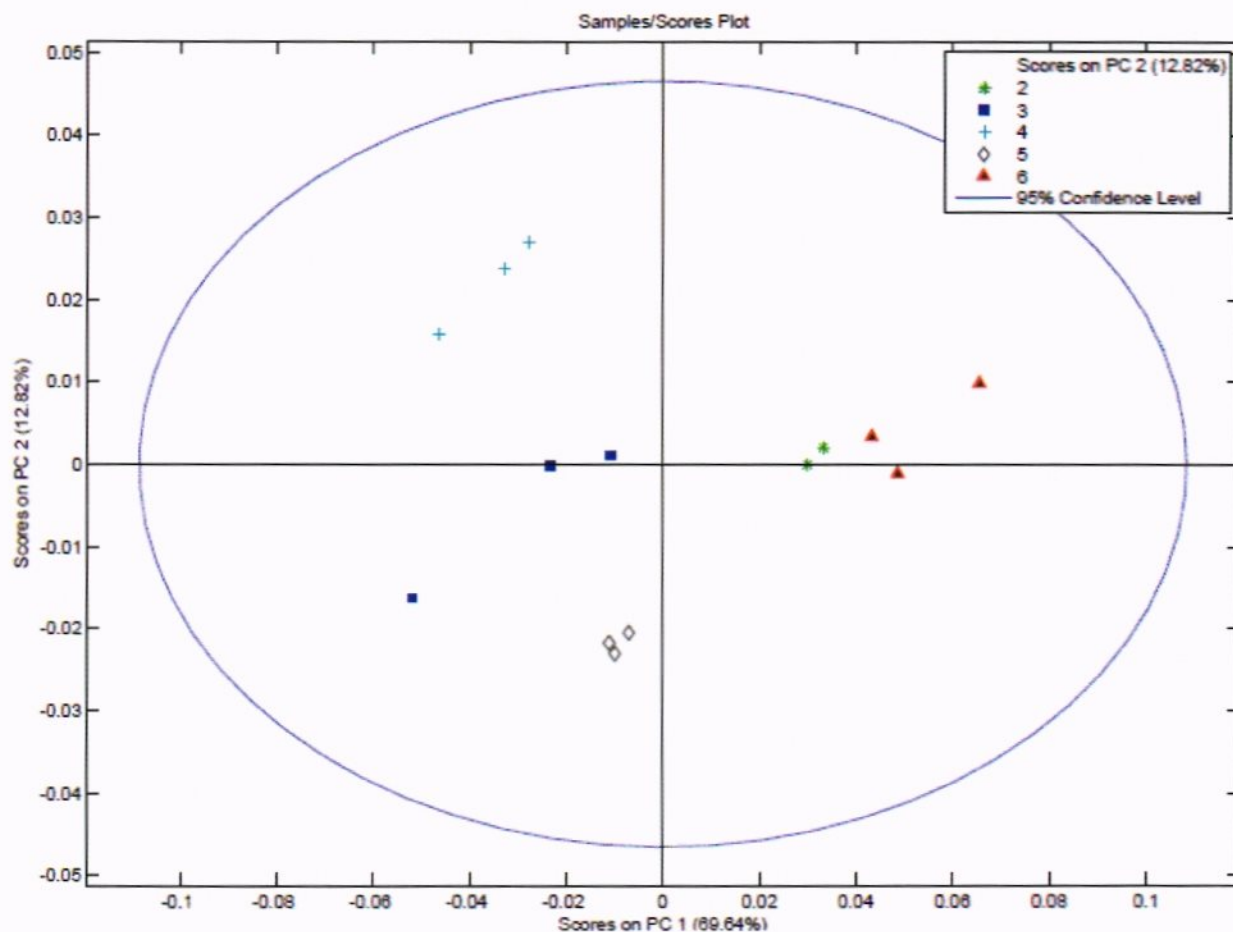
Prøver fra kultur ble vasket godt med filtrert sjøvann (1 μ m) ved bruk av en sil (64 μ m), og fortettet ned til 150 ml (med filtrert sjøvann) slik at det endte opp på rundt 1500 rotatorier/ml. Fra denne ble det så tatt ut 8 sub samples a 100 μ l som ble overført til tinnkapsler. Tilslutt ble kulturvann silt fra (64 μ m) og prøver av vannet ble overført til tinnkapsler med samme prosedyre som prøveuttak inneholdende rotatorier (4x 100 μ l).

Prøver (tinnkapsler) som skulle analyseres for innhold av karbon og nitrogen ble tørket i 60 °C for minimum to døgn før de ble analysert på en element-analysator (Costech instruments).

6.4 Resultat og diskusjon

6.4.1 NMR analyser

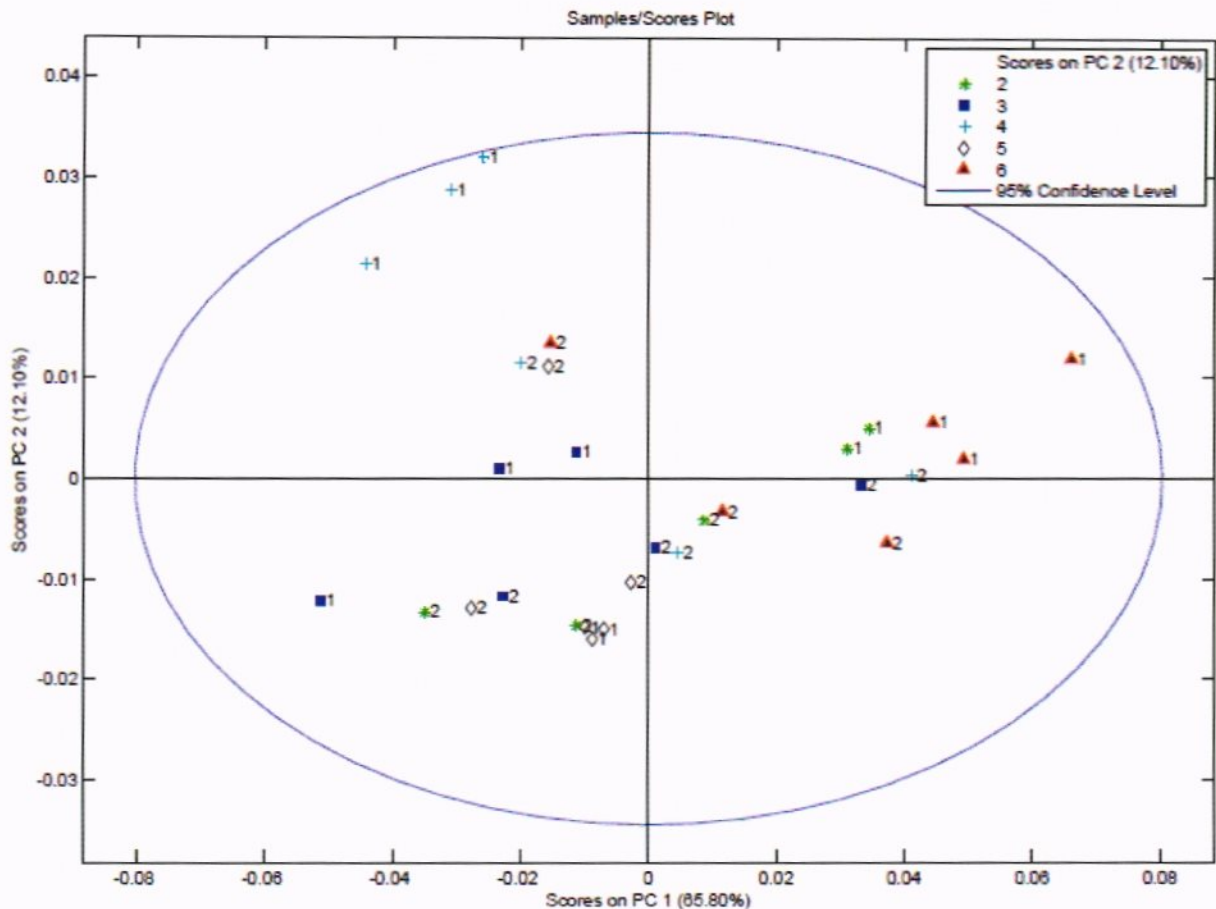
NMR analyser viste at næringsinnholdet varierer mellom de ulike yngelanleggene, og også innen samme anlegg (figur 31, 32 og 33).



Figur 31: PCA scores plot som viser god samling for alle anlegg (n=3, anlegg 2 har n=2) og at to av anleggene grupperer godt med hverandre som betyr at de har like analyttprofiler. De tre andre anleggene er spredt utover som viser at de er forskjellige fra hverandre og grupperingen med to anlegg.

Det ble ved PCA analyse vist at det er forskjeller mellom fire av de fem anleggene som er inkludert i studien. Forskjellene i det 2 dimensjonale plottet baserer seg på alle variablene som observeres i NMR analysen. NMR spekteret inneholder informasjon om en rekke stoffgrupper med sukker, lipid, aminosyrer og osmolytter som eksempler. Forskjeller i PCA analysen baserer seg da på alle disse stoffklassene i større eller mindre grad. En slik analyse vil kunne avdekke

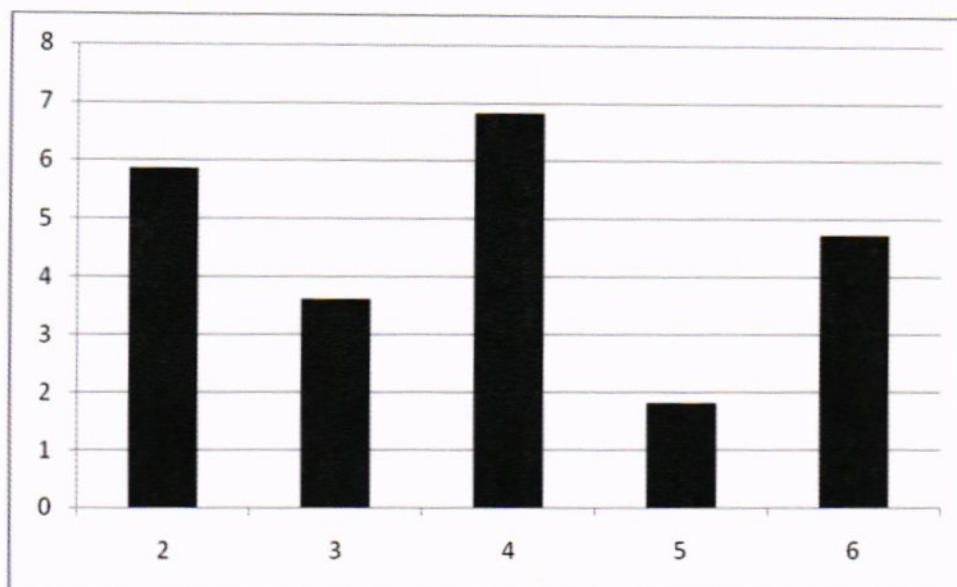
forskjeller som ikke avdekkes ved klassiske analyser av f.eks. lipidklasser og fettsyreanalyser, og vil kunne peke på andre forskjeller i rotatoriene. Ved å inkludere slike ikke selektive analyser i tillegg til klassiske analyser ved startføringsforsøk, vil man på en kostnadseffektiv måte kunne kontrollere et større antall analytter med hensyn på stabilitet og kvalitet på anriking. Kobling mellom sammensetning i rotatorie og i larvene vil også kunne gjennomføres på et høyere detaljnivå dersom metabolomics inkluderes i studien.



Figur 32: PCA scores fra analysen av to prøvettak for 5 ulike anlegg.

PCA analyse av $^1\text{H-NMR}$ spektrene fra anleggene viser at det er forskjeller i hvor god likhet det er mellom de to prøvettakene. Her er det igjen viktig å huske på at forskjellene baserer seg på alle variablene i NMR spektrene. Det at noen av anleggene har liten spredning mellom prøvetidspunktene og noen har stor kan ha flere årsaker. Det er også viktig å nevne at det her er snakk om to prøvetidspunkt og konklusjonene som kan dras fra en slik sammenlikning vil måtte vurderes opp i mot dette. Det er mulig at anlegg som har stor variasjon i denne studien jevnt over har god stabilitet og motsatt. I den grad det i denne studien er viktig å komme med konklusjoner på *hvilke* spesifikke anlegg som har stabil produksjon og ikke vil antallet prøvetidspunkt være

begrensede. Det kan derimot konkluderes med at det *er* forskjeller mellom prøvetakingene for noen anlegg og for andre ikke. En større studie med mange tette prøvetidspunkt vil være nødvendig for å vurdere anleggene mot hverandre. Videre vil det å inkludere analyser av larver som har blitt føret med rotatoriene til en hver tid kunne være en studie med potensiale til å fange opp effekter av stabil vs ikke stabil produksjon av rotatorier.



Figur 33: Forskjell mellom de to analyserundene beregnet som forskjellen mellom gjennomsnittsverdiene av scores-verdiene for de to kjøringene. Dette tilsvarer avstand mellom midtpunktene i kjøringene. Jo mindre verdi jo mer lik er sammensetningen i de to prøveuttakene.

6.4.2 CN analyser

Analyse av karbon og nitrogen (CN) innhold i rotatorier fra fem anlegg viser at dette også varierer mye både mellom og innen anleggene (figur 34). Tørrvekt pr rotatorie har blitt beregnet ved å multiplisere karbon innholdet pr rotatorie med en faktor på 2,25. Dette ga verdier som varierte fra 0,1-0,3 μ g. Når det gjelder protein innholdet i rotatorier viser analysene at dette varierer på samme måte som tørrvekten, mens forholdet mellom protein innhold og tørrvekt er rimelig konstant. Protein utgjør 36(\pm 3) % av tørrvekten, noe som er i samsvar med tidligere publiserte data og resultatene i delprosjekt 2.

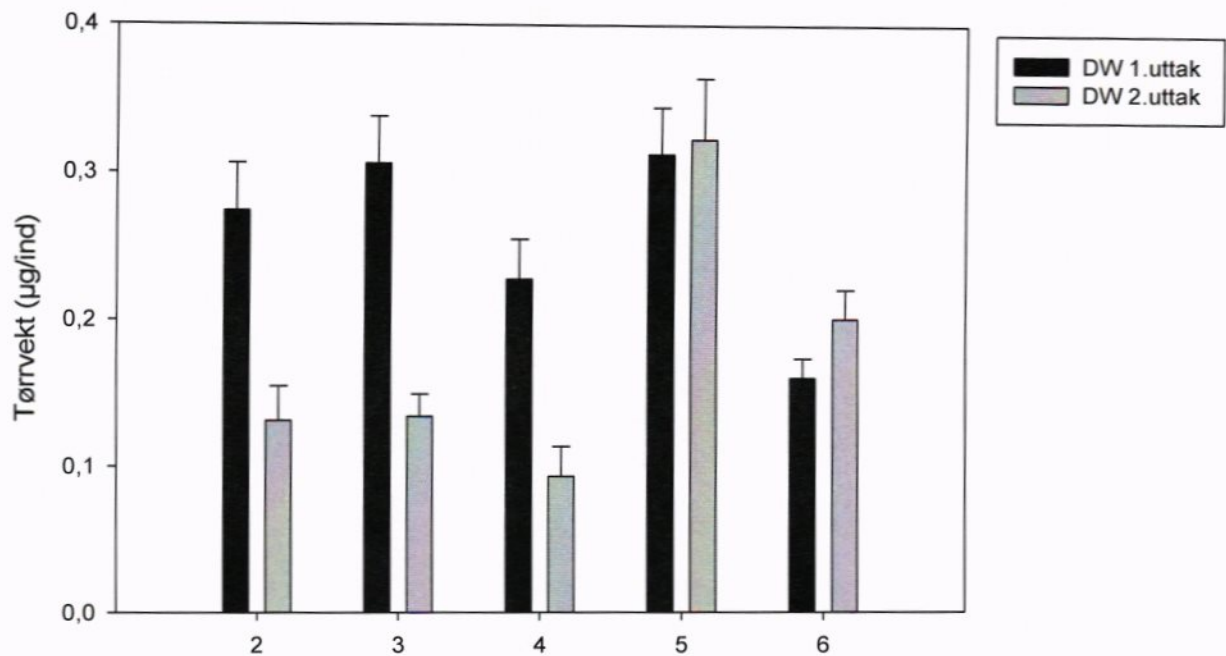
Den store variasjonen skyldes trolig i all hovedsak to faktorer: Metodiske feil og varierende produksjonsforhold hos oppdretterne. Når det gjelder metodiske feil, ser vi at det er en utfordring å benytte denne metoden i dette prosjektet da metoden innebærer at en levende rotatoriekultur blir tatt med tilbake for bearbeiding på laboratoriet. Rotatoriene vil endre næringsinnhold betraktelig

dersom de sultes i lengre perioder, noe som dessverre var tilfelle ved enkelte besøk av anlegg med lang reisetid. Det jobbes med å forbedre metoden slik at den skal bli mer pålitelig i fremtiden.

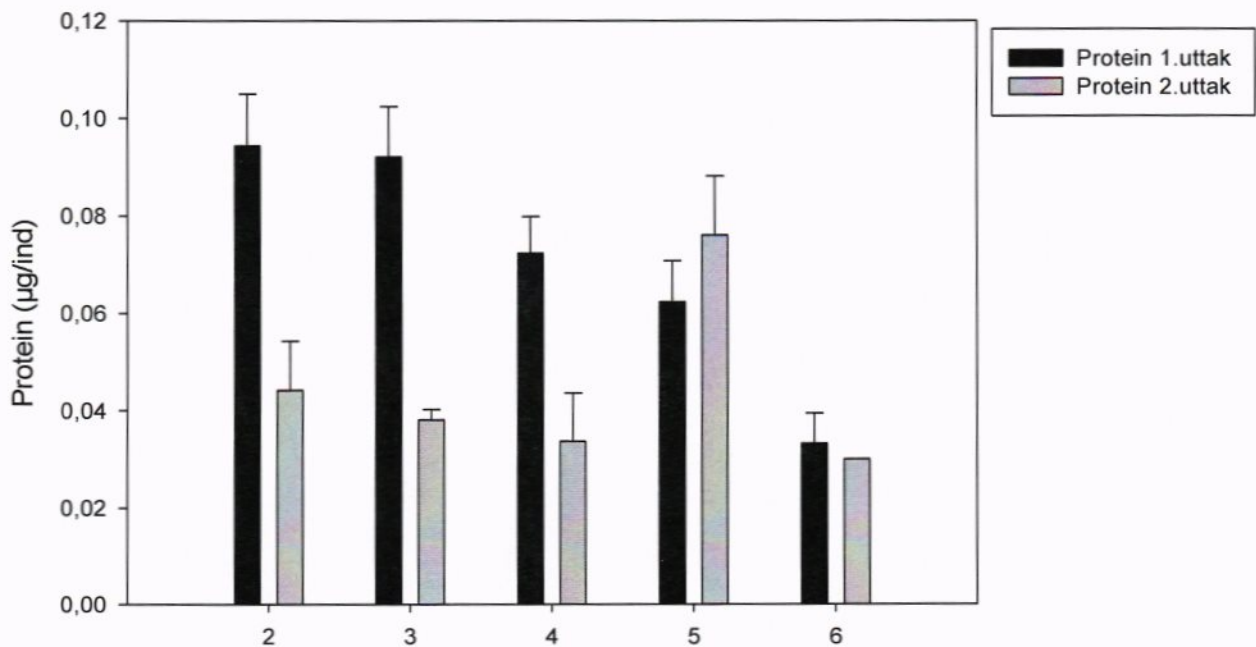
Den store variasjonen kan trolig i tillegg tilskrives produksjonsforhold ved de ulike anleggene. Det er derfor viktig at det jobbes systematisk ved hvert enkelt anlegg for å forbedre driftsrutiner, samt investere i utstyr som reduserer svingninger i kritiske faktorer som temperatur og oksygen innhold. I tillegg er det i dag for liten kontroll og styring av fôr tilsetningen i produksjonstankene. I dag baseres fôringen på en telling og en beregning som typisk bare utføres en gang pr dag. Når en rotatoirekultur har muligheten til å doble seg i tetthet pr døgn vil dette gi for lite informasjon til å føre kulturene optimalt. Dette gir seg utslag i økt fôrspill, redusert vekst, økt fare for kultur kollaps og økte produksjonskostnader. Det er en tendens til at tørrvekten til rotatoriene avtar ved andre uttak noe som kan indikere at noe ved produksjonsforholdene endrer seg over tid under et startfôringsforsøk. Årsaker kan være bruk av Chlorella utover utløpsdato, utarming av rotatorier ved intensiv produksjon på høye tettheter og bruk av "gamle" kulturer med rotatorier med lavere vekstrate.

En annen utfordring for yngeloppdretterne er at det trolig finnes en blanding av ulike rotatoriearter i flere klekkerier. I dag gjøres det for lite testing av rotatoriene med hensyn på arts bestemming. For å rette på dette har SINTEF utviklet en metode for arts bestemming av rotatorier og det er nå mulig for oppdretterne å sende inn prøver for analyse.

Tørrvekt hos rotatorier ved fem klekkerier

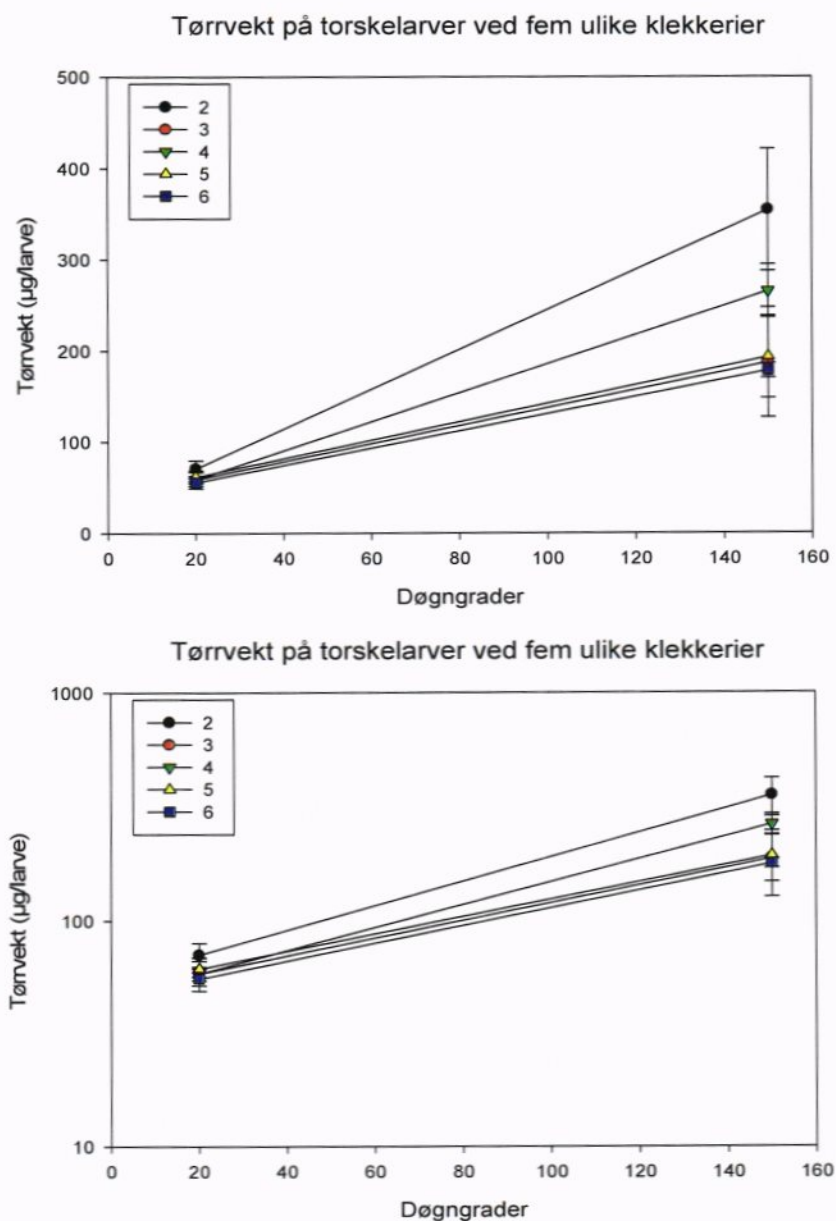


Innhold av protein hos rotatorier ved fem torskeklekkerier



Figur 34. Tørrvekt og protein innhold i rotatorier ved fem ulike klekkerier. Rotatoriene skal ha blitt behandlet på samme måte i forkant av begge uttakene, som ble gjort ved ca to ukers mellomrom.

I tillegg til rotatorieprøver ble det også tatt ut prøver av fiskelarver ved de ulike yngelanleggene. Det ble målt tørrvekt på larver ved 20 døgngader og ved 150 døgngader (figur 35). Dette ble gjort for å kunne undersøke om metoden kan si noe om yngelkvaliteten. Resultatene viser stor forskjell i tørrvekt mellom de ulike larvegruppene allerede etter 150 døgngader. Det er ønskelig å få informasjon om hvordan disse larvegruppene presterte senere i vekstfasene. Dersom fiskelarver med høy veksthastighet de første 150 døgngadene er de som presterer best senere i livet, kan denne testen bli en nyttig kvalitetstest. Metoden kan utvikles videre til å bli en kvalitetstest som kan utføres i tidlige faser.



Figur 35. Tørrvekt av torskelarver ved ca 20 og ca 150 døgngader ved fem ulike yngelanlegg (i lineær og logaritmisk skala).

6.5 Konklusjon

I forhold til målene for delprosjektet så kan det konkluderes med

1. Det er forskjeller mellom anleggene ved de prøveuttak som er gjort
2. Det er forskjeller i reproduserbarhet mellom prøveuttakene for de ulike anleggene, å gi slik at et langt større prøvemateriale er nødvendig for å gi klare konklusjoner.

7 Litteratur

- Atwater, W.O. & Woods, C.D. (1896) The chemical composition of American food materials. *United States Department of Agriculture Office of Experiment Stations, Bulletin 28. Washington, DC, Government Printing Office.*
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.
- Campillo, S., Garcia-Roger, E.M., Martinez-Torres, D., Serra, M. (2005) Morphological stasis of two species belonging to the L-morphotype in the *Brachionus plicatilis* species complex. *Hydrobiologia*, 546, 181-187.
- Dooms, S., Papakostas, S., Hoffman, S., Delbare, D., Diercckens, K., Triantafyllidis, A., De Wolf, T., Vadstein, O., Abatzopoulos, T., Sorgeloos, P., Bossier, P. (2007) Denaturing gel electrophoresis (DGGE) as a tool for the characterization of *Brachionus* sp. strains. *Aquaculture* 262, 29-40.
- Dumas, J.B.A. (1984) Procédes de l'analyse organique. *Ann. Chim. Phys.*; 247:198-213, 1831.
- Emerson, K., Russo, R.C., Lund, R.E., Thurston, R.V. (1975) Aqueous ammonia equilibration calculations: effect of pH and temperature. *J. Fish. Res. Bd, Can.* 32, 2379-2383.
- Fontaneto, D. Giordani, I., Melone, G., Serra, M. (2007) Disentangling the morphological stasis in two rotifer species of the *Brachionus plicatilis* species complex. *Hydrobiologia*, 583, 297-307.

Gnaiger, E. and Bitterlich, G. Proximate biochemical composition and caloric content calculated from elemental CHN analysis: a stoichiometric concept, *Oecologia*, 62, 289-298.

Gómez, A., Carmona, M.J., Serra, M. (1997) Ecological factors affecting gene flow in the *Brachionus plicatilis* complex (Rotifera). *Oecologia*, 111, 350-356.

Gomez, A., Serra, M., Carvalho, G.R., Lunt, D.H. (2002) Speciation in ancient cryptic species complexes: evidence from the molecular phylogeny of *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Evolution* 56, 1431-1444.

Hamre, K., Sirivastava, A., Rønnestad, I., Mangor-Jensen, A., Stoss, J. (2008) Several micronutrients in the rotifer *Brachionus* sp. may not fulfill the nutritional requirements of marine fish larvae. *Aquaculture nutrition*, 14, 51-60.

Jung, D. A. Rickert, N. A. Deak, E. D. Aldin, J. Recknor, L. A. Johnson and P. A. Murphy, (2003) Comparison of kjeldahl and dumas methods for determining protein contents of soybean products, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 80 (12), 1169-1173.

Kjeldahl J., (1883) A new method for the determination of nitrogen in organic matter, *Z. Anal. Chem.*, 22:366-82.

Kotani, T., Hagiwara, A., Snell, T.W., Serra, M. (2005) Euryhaline *Brachionus plicatilis* strains (Rotifera) from tropical habitats: morphology and allozyme patterns. *Hydrobiologia*, 546, 161-167.

Li, K. (2010) Manipulation of the composition of phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE) of rotifers *Brachionus* sp. Nevada and *Brachionus* sp. Caymen. Thesis for the degree of Master of Science in Marine Coastal Development, Dept. of biology, Norwegian University of Science and Technology (NTNU), Trondheim. Norway..

Lubzens, E., Zmora, O., Barr, Y. (2001) Biotechnology and aquaculture of rotifers. *Hydrobiologia*, 446/447, 337-353.

Merrill A.L. and Watt, B.K. (1973) Energy value of foods, basis and derivation. *Agric. Handbook No. 74. US Dep of agriculture, Washington DC.*

Merrill, A.L. & Watt, B.K. (1955) Energy value of foods, basis and derivation. *Agric. Handbook. No. 74. Washington, DC, United States Department of Agriculture.*

Metcalfe, L.D., Scmitz, A.A., Pleka, J.R., (1966). Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.* 38, 514-515.

Miller, E. L., A. P. Bimbo, Barlow, S. M. and Sheridan, B., (2007) Repeatability and reproducibility of determination of the nitrogen content of fishmeal by the combustion (Dumas) method and comparison with the Kjeldahl method: interlaboratory study, *J. AOAC Int.*, 90(1): 6-20.

Monsen, M. H. (2008) Comparing the culture performance of the rotifers *Brachionuc plicatilis* (Nevada) and *Brachionus ibericus* (Cayman) batch cultured at five different water exchange rates. Thesis for the degree of master of Science in aquaculture biology, Institutt for Biologi, Universitetet i Bergen.

NRC (1993) *Nutient requirements of fish*. National research council, National Academy press, Washington, DC.

Papakostas, S., Doods, S., Trianfyllidis, A., Deloof, D., Kappas, I., Dierckens, K., De Wolf, T., Bossier, P., Vadstein, O., Kui, S., Sorgeloos, P., Abatzopoulos, T.J. (2006) Evaluation of DNA methodologies in identifying *Brachionus* species used in European hatcheries. *Aquaculture*, 255, 557-564.

Simonne A.H., Simonne, E. H., Eitenmiller R.R., Mills H.A. and Cresman III C. P.n(1997) Could the Dumas Method Replace the Kjeldahl Digestion for Nitrogen and Crude Protein Determinations in Foods? *J. Sci. Food Agric.*, Volume 73, Issue 1 , Pages 39 – 45.

Sosulski, F.W and Imafidon, G.I. (1990) Amino acid composition and nitrogen to protein conversion factors for animal and plant foods. *J. Agric. Food. Chem.*, 38, p 1351-1356.

Suatoni, E., Vicario, S., Rice, S., Snell, T., Caccone, A. (2006) An analysis of species boundaries and biogeographic patterns in a cryptic species complex: the rotifer-*Brachionus plicatilis*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 41, 86-98.

Theilacker, G.H. & McMaster, M.F. (1971) Mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis* and its evaluation as food for larval anchovies. *International. J. of Life in Oceans and Coastal Waters*, 10, 2, 183-188.

Thompson, M., Owen, L., Wilkinson, K. Wood, R. and Damant, A. (2002) A comparison of the Kjeldahl and Dumas methods for the determination of protein in foods, using data from a proficiency testing scheme, *Analyst*, 127 (12), 1666-8.

Øie, G. and Olsen, Y (1997) Protein and lipid content of the rotifer *Brachionus plicatilis* during variable growth and feeding condition. *Hydrobiologia*, 358, 251-258.



Teknologi for et bedre samfunn

www.sintef.no