

OC2017 A-029 - Åpen

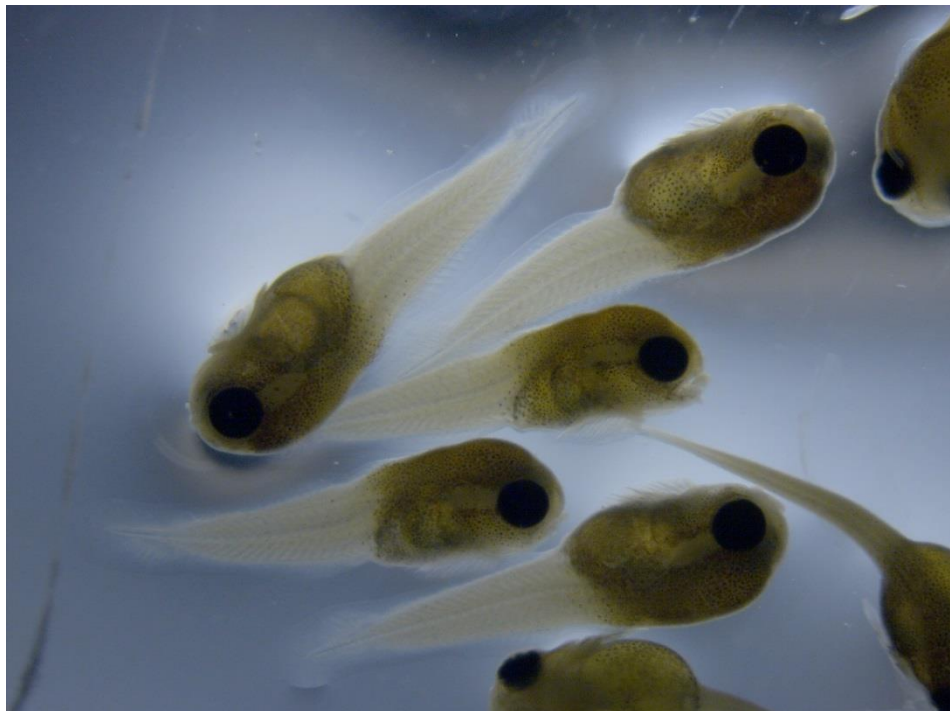
Rapport

Vannkvalitet og startfôring av rognkjeks

Effekt av fôring med levende copepoder i tidlige faser (FHF prosjekt nr 901174)

Forfattere

Stine Wiborg Dahle, Andreas Hagemann, Kari J. K. Attramadal (SINTEF Ocean)
Elin Kjørsvik, Tora Bardal (Institutt for Biologi, NTNU)



Rapport

Vannkvalitet og startfôring av rognkjeks

Effekt av fôring med levende copepoder i tidlige faser (FHF prosjekt nr 901174)

EMNEORD:

Rognkjeks
Vannkvalitet
Levendefôr
Utvikling
Tidlige stadier

VERSJON

1

DATO

2017-01-24

FORFATTERE

Stine Wiborg Dahle, Andreas Hagemann, Kari Kihle Attramadal (SINTEF Ocean)
Elin Kjørsvik, Tora Bardal (Institutt for Biologi, NTNU)

OPPDRAKSGIVERE

FHF og NCE Aquaculture

OPPDRAKSGIVERS REF.

Eirik Sigstadstø og Svenn Jensen

PROSJEKTNR

6022172 (SINTEF)

ANTALL SIDER OG VEDLEGG:

38

SAMMENDRAG

I oppdrett av rognkjeks benyttes formulert tørrfôr av små partikler fra start, som gir mye forspill i karene. Høy og varierende organisk belastning i systemet gir grobunn for oppblomstring av opportunistiske bakterier som kan gi sykdom. Prosjektet undersøkte effekter av å tilby rognkjeks larver hoppekreps (*Acartia tonsa*) de første 12 dagene av startfôringen, i stedet for tørrfôr, og effekt på vekst, overlevelse, utvikling og mikrobiell vannkvalitet ble evaluert. Rognkjeks fôret med copepoder fikk høyere våtvekt, lengde og myotomhøyde, og tørrfôr ga negativ effekt på tarmepitel og lever. Effektene var synlige under hele forsøksperioden. Forbeining av skjelettet var svært uferdig ved forsøkslutt, og ingen konklusjon om eventuelle forskjeller i deformiteter kunne trekkes. Også overlevelsen var høyere gjennom forsøket for copepodegruppa, men ikke signifikant. Fôring med copepoder førte til en stor reduksjon i andel generelle marine opportuniste i tankene med 36 % samt en reduksjon i antall dyrkbare bakterier med 33 %. Denne reduksjonen kan være viktig for å sikre lavt innhold av opportuniste og unngå et ugunstig forhold mellom larver og bakterier, spesielt om larvene er stresset. Det var store variasjoner i bakteriesammensetningen i vannet og biofilmen mellom replikate tanker og over tid, noe som tyder på at det kan være en del å hente på tiltak for å redusere variasjonen og ustabiliteten i mikrobiotaen for en høyere og mer forutsigbar yngelproduksjon. Det ble påvist grupper som *kan* inneholde potensielle sykdomsbakterier i forsøket, men ingen spesifikke patogener ble artsbestemt. Bruk av copepoder førte generelt til et mer positivt bakteriemiljø i vannet, noe som gir gode forhold i tidlige faser og tilrettelegger for en mer robust yngel.

UTARBEIDET AV

Stine Wiborg Dahle/Andreas Hagemann

KONTROLLERT AV

Jan Ove Evjemo

GODKJENT AV

Gunvor Øie

RAPPORTNR

OC2017 A-029

ISBN

978-82-7174-272-0

GRADERING

Åpen

SIGNATUR**SIGNATUR****SIGNATUR****GRADERING DENNE SIDE**

Åpen

Innholdsfortegnelse

1	Bakgrunn.....	3
2	Metode	4
2.1	Produksjonsdata Nordland Rensefisk	4
2.2	Startfôringsforsøk	4
2.3	Analyser.....	5
2.3.1	Vekst	5
2.3.2	Mikrobiota	6
2.3.3	Organisk belastning (Total organisk karbon, TOC)	6
2.3.4	Utvikling.....	6
2.3.5	Overlevelse	7
2.4	Statistikk.....	7
3	Resultater og diskusjon.....	7
3.1	Generelle observasjoner	7
3.2	Vekst og utvikling	7
3.3	Organisk belastning (Total organisk karbon, TOC).....	17
3.4	Mikrobiota	18
3.5	Artsidentifikasjon	20
3.5.1	Sammenlikning av mikrobiota mellom biofilm og vann	20
3.5.2	Potensielle sykdomsbakterier	21
4	Konklusjon	22
5	Litteraturliste	23
6	Appendix 1: Kronadiagrammer for bakteriesammensetning.	25

BILAG/VEDLEGG

1 Bakgrunn

Oppdrettsnæringen har behov for en sikker tilgang på store mengder av robust rensefisk, året rundt, for å holde laksen fri for lakselus. Antall selskap som har rapportert bruk av rensefisk mot lakselus har økt kraftig de siste 10 årene, og antallet med kjøpt (oppdrettet, 41 %) og selvfisket (villfanget, 59 %) rensefisk som ble brukt i 2015 er estimert til nesten 26 millioner individer. De mest vanlige artene er bergnebb, berggylt, grønngylt og rognkjeks, hvorav rognkjeks var den mest brukte arten i 2015 (10 millioner ind.). Rognkjeks er nå den tredje viktigste oppdrettsarten i Norge etter laks og regnbueørret med hensyn til verdi, og flere aktører har nylig startet opp med produksjon av rognkjeks eller har søkt om konsesjon (Fiskeridirektoratet, 2016).

De fleste rognkjeksprodusentene bruker formulert fôr til rognkjeks-larvene fra start (2 dager etter klekking). Larvefôret gir mye fôrspill i karene (lekkasje og fine partikler/støv) og forårsaker dårlig karhygiene og nedsatt vannkvalitet med hensyn til høy belastning av bakterier og ugunstig sammensetningen av bakterier. Under slike forhold vil det raskt dannes biofilm på karveggene, og for rognkjeks som sitter mesteparten av tida på overflater i tanken kan tilstedeværelse av sykdomsbakterier eller opportunistiske i biofilm øke kontakttiden mellom larvene og en potensiell smittekilde. Godt renhold av startfôringskarene er kritisk og svært tidkrevende (Lars Ulvan, Rensefiskkonferansen, 2016). Perioden med det minste tørrfôret (ca. 20 dager) er ønskelig å unngå (Lars Ulvan, pers. komm.). Produksjonen preges også av en variabel overlevelse og størrelse på yngelen hvilket gjør det vanskelig å planlegge produksjonen. Dette fører til at det må legges inn langt flere egg enn det er behov som igjen gir høyere tetthet av fisk og økt fôrmengde fra start. Dette gir negative effekter på vannkvaliteten.

Halvveis i produksjonen (2,5 mnd) observeres det ofte halenapping. Dette resulterer i alvorlige sår som gir bakterier fri adgang, og dette kan resultere potensielt dødelige infeksjoner. Halenapping anses som en indikasjon på stress, og henger sannsynligvis sammen med suboptimale produksjonsforhold i den tidlige fasen. Problemene antas å være relatert til både ernæring og vannkvalitet.

SINTEF og NTNU har vist at fiskelarver av blant annet berggylt (*Labrus berggylta*), torsk (*Gadus morhua*) og makrellstørje (*Thynnus thunnus*) fôret på copepoder (*Acartia tonsa*, Dana) får bedre vekst og overlevelse, færre deformiteter og bedre stresstoleranse sammenliknet med larver fôret med tradisjonelt levendefôr som rotatorier og *Artemia* sp. (Øie et al., 2015; Dahle et al., 2014; Doan, 2014; Evjemo, pers. comm). Det er også observert at den organiske belastningen i karet blir lavere ved bruk av copepoder, sammenliknet med tradisjonelt levendefôr (SINTEF, pers. comm). Lav organisk belastning henger sammen med god vannkvalitet, særlig sammenliknet med kar fôret med tørrfôr. **Vår hypotese** er at bruk av copepoder de første 12 dagene av startfôringen vil føre til bedre utvikling, tilvekst og overlevelse hos rognkjeks-yngel. I tillegg vil det gi bedre vannkvalitet, og en bedre sammensetning og mer stabil flora av bakterier i vannet. Dette vil sørge for optimale forhold i tidlige faser og vil tilrettelegge for en mer robust yngel, som vil være mer motstandsdyktig mot bakteriesykdommer og stress. Kunnskap om de tidlige fasene er svært viktig, da en god start er av avgjørende betydning for yngelkvalitet og produksjon av robust fisk til utsett i merd for å spise lakselus.

Målsetting

- Øke overlevelse og vekst hos rognkjeks-yngel ved å bruke copepoder som startfôr.
- Evaluere eventuelle effekter av startfôret på tarm- og beinutvikling.
- Identifisere bakteriesamfunn i produksjon av rognkjeks (vann, larver og biofilm) ved fôring med tørrfôr sammenliknet med fôring med copepoder.
- Å finne forebyggende strategier som kan hindre vekst av opportunistiske og sykdomsfremkallende bakterier.
- Skaffe grunnleggende input for videre arbeid med å optimalisere vannkvalitet og mikrobiell kontroll i rognkjeksoppdrett.
- Økt forutsigbarhet i rognkjeksproduksjon og en bedre yngelkvalitet.

2 Metode

2.1 Produksjonsdata Nordland Rensefisk

Produksjonskarene brukt til startfôring hos Nordland Rensefisk (NR) er 500 liter, har sorte karvegger med en hvit, kon bunn. Sjøvannet som brukes i produksjonen passerer gjennom et partikkelfilter (200 μm) og UV-behandles før det når karene, og vannutskiftingen er satt til 50 % av karvolumet per time. I tillegg filtreres noe av vannet inn til startfôringen med et patronfilter på 5 μm . Det benyttes kontinuerlig, dimmet belysning fra tildekkede lysstoffrør i taket. Villfanget stamfisk strykes og befruktete egg legges inn i Sterner familieklekkere i 300 d° (temperatur 7,5 – 10 °C). Det benyttes formulert fôr fra dag 2/3 etter klekking (Gemma micro 150 μm , Skretting) i en periode på ca. 20 dager. Karene røktes daglig ved bruk av hevert og nal.



Figur 1. Startfôringsavdelingen hos Nordland Rensefisk med produksjonskar på 500 liter, som ble benyttet under forsøkene.

2.2 Startfôringsforsøk

Startfôringsforsøket ble utført hos Nordland Rensefisk på Lovund og hadde en varighet på 32 dager (12. mai - 12. juni 2016). Copepoder i ulike stadium (Tab. 1) og mikroalger (*Rhodomonas baltica*) ble dyrket opp av C-Feed AS på Fosen og fraktet i IBC containere (1000 L) med bil til Lovund i to ulike leveranser. Den første leveransen med copepoder og mikroalger ble levert dagen før startfôringen begynte (11. mai). Containerne ble lagret kaldt (10 °C) frem til bruk for å bremse videre vekst og øke holdbarheten. Den andre leveransen ble levert 19. mai (dag 9 etter klekking, dph). Mikroalgen *R. baltica* ble benyttet som fôr til copepodene under kjølelagringen. Seks produksjonskar ble benyttet til startfôringsforsøket, hvorav tre kar ble fôret med copepoder og tre kar fikk formulert fôr (Gemma Micro, Skretting). Fra 2 til 8 dph ble copepoder tilsatt startfôringskarene i en blanding av stadium N6, C1 og C2 (Tabell 1). Ved dag 9 til dag 13 etter klekking ble det tilsatt en blanding av stadium N6, C1 og C2. Under hele forsøket ble det ble fôret kontinuerlig for å gi en tetthet på ca. 2-3000 individer/L i produksjonskarene (Tabell 1).

Tabell 1. Oversikt over ulike utviklingsstadium av copepoder benyttet i forsøket. N=nauplii, C=copepoditt

Levert	Dph	Stadium (snitt)	Blandede stadium	Størrelse (µm)	Tetthet (Individ/L)
11.05.16 (1 dph)	3-8	C1	N6, C1, C2	240 - 450	2000 (d3-5) / 3000 (d6-8)
19.05.16 (9 dph)	9-13	C1	N6, C1, C2	240 - 450	3000

Tabell 2. Oversikt over fôringsregime og prøveuttak i løpet av forsøket. Gruppe C= copepoder, Gruppe TF=tørrfôr

		Dato	12.5	15.5	19.5	23.5	23.5	30.5	4.6	9.6	12.6
		Dag e kl. (dph)	2	5	9	13	13	20	25	30	33
Gruppe C	Kar 1, 2, 3		Copepoder				Tørrfôr*				
Gruppe TF	Kar 4, 5, 6		Tørrfôr**								
Prøveuttak											
Vekst		Våt- og tørrvekt/lengde/høyde									
Mikrobiota		CFU/ml									
	Sekvensering 16S rRNA	Vann tank									
		Biofilm tankvegg									
		Larver									
Utvikling		Beinfarging, histologi									
Organisk belastning		TOC									
Overlevelse		Samband med røkting									
Prøveuttak utført av		S=SINTEF, N=Nordland Rensefisk	S	N	N	S		N	N	N	N

*Weaning til tørrfôr av størrelse 150 µm fra dag 13 dph – 23 dph, introduksjon av tørrfôr størrelse 300 µm ved 17 dph.

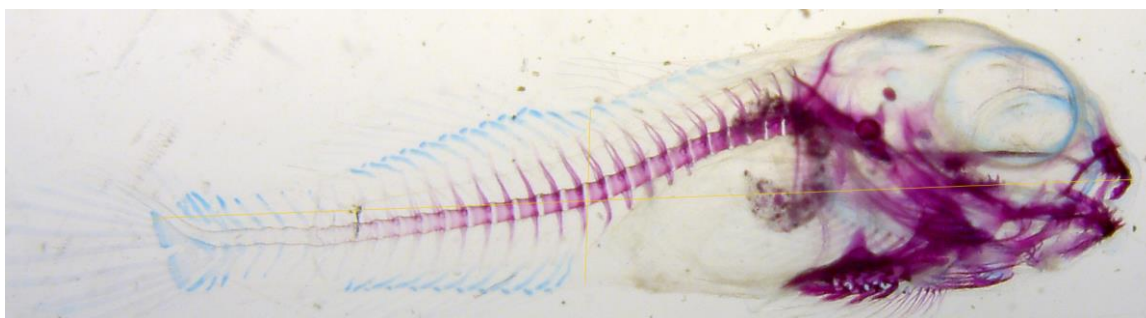
** Tørrfôr størrelse 150 µm fra dag 2 dph – 23 dph, introduksjon av tørrfôr størrelse 300 µm ved 17 dph-33 dph.

2.3 Analyser

Prøver av fisk, biofilm og vann ble tatt ut ved ulike dager i forsøksperioden i henhold til prøveuttaksplan (se Tabell 2). Prøver tatt ut på dag 2 etter klekking ble tatt før det ble tilsatt fôr i karene for alle behandlinger. Prøveuttak på dag 13 var på den siste dagen med copepodefôring, før weaning til tørrfôr begynte i copepodebehandlingene.

2.3.1 Vekst

Rognkjeks-larver (n= 9-12) ble samlet fra alle behandlinger, bedøvet i en gitt overdose av MS222 og lagt i forhåndsveide eppendorfrør (150 µL). Larver i rør ble oppbevart kaldt (ca. 4 °C) frem til veiing. Våtvekten på larvene ble veid med en mikrovekt (Mettler Toledo microgram balance) med en leselighet på 0,0001 mg. Eppendorfrørene ble deretter åpnet og lagt i et varmeskap (60 °C) to uker for å tørke larvene. Deretter ble rørene veid en gang til på samme vekt for registrering av tørrvekt. Standardlengde og myotomhøyde ble målt på fikserte larver (se avsnitt 2.8), fotografert i et stereomikroskop (Leica M205C, Tyskland) med kamera (Zeiss Axiocam Erc5s), og målt ved hjelp av softwareprogrammet ImageJ. (Fig. 2).



Figur 2. Illustrasjon av måling av standard lengde. Larve som er 33 dph og fiksert/farget. Foto: T. Bardal, NTNU.

2.3.2 Mikrobiota

Prøver for mikrobiell vannkvalitet ble tatt ut fra de to behandlingene (n=3) ved 2, 9 og 13 dph (Tabell 2). Prøver for måling av CFU ble fortynnet i sterilt sjøvann og strøket ut i ulike fortynninger til Marin agar og TCBS agar (n=3) ved anlegget (lab gjort så steril som mulig). Prøvene ble oppbevart kjølig ved oppbevaring i en isoporkasse fylt med fryseelementer frem til ankomst Trondheim (via båt og fly, ca. 3 timer). Agarskålene ble inkubert ved 10 °C i to og 14 dager for registrering av henholdsvis opportunistiske og saktevoksende bakterier. Ferske vannprøver for artsidentifikasjon av bakterier ble presset igjennom sterile Sterivex® filter (Millipore) ved hjelp av steril sprøyte på 50 ml i et totalt volum på 200 ml og øyeblikkelig fryst ned ved anlegget. Biofilm ble samlet ved å stryke swabs (BD Cultureswab®) langs karoverflatene i tankene og fryst ned umiddelbart. Rognkjekslarver fra hver behandling/tank ble tatt ut og lagt i eppendorfrør og fryst umiddelbart. Total bakteriell DNA fra biomasse (filter, biofilm, larver) ble isolert med FastDNA Spin kit for soil (MP) og FastPrep-24 homogenizer (MP). Isolert DNA ble kvantifisert, kvalitetskontrollert og brukt for 16S rDNA amplitikonbibliotek-tillaging. Bibliotek-tillaging ble gjennomført etter Illumina's "16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Guide" og sekvensering ble gjennomført på en Illumina MiSeq platform. Sekvenseringsdata ble prosessert med bioinformatiske verktøy (Qiime, Phyloseq) og resultatene ble visualisert med KronaTools programvaren. Mikrobiell samfunnsanalyse basert på 16S amplitikonbibliotek-sekvensering tillater en detaljert kartlegging av hele bakterielle samfunnet i prøvemateriale, helt ned til spesies-nivå, inkludert relative andelen av alle taxa i prøven.

Ved dag 9 etter klekking var det ansatte ved anlegget som tok ut prøvene, og sendt til SINTEF via Jetpak (ca. 8 timer). CFU-prøver ble sendt som vannprøve som ble holdt kjølig i en isoporkasse med fryseelement frem til ankomst Trondheim, hvorpå prøvene ble strøket ut på agar som beskrevet over. Resterende prøver ble holdt fryst som ved de andre prøveuttakene gjort av SINTEF.

2.3.3 Organisk belastning (Total organisk karbon, TOC)

Vannprøver fra de to gruppene (n=3) ble silt gjennom en filterduk (64 µm, SEFAR NITEX) for å fjerne copepoder fra vannprøvene og tilsatt flasker som ble fryst ned inntil analyse. Prøvene ble sendt til Eurofins AS i Moss for analyse, hvor de ble analysert for totalt organisk karbon (TOC) ved hjelp av en akkreditert metode (NS EN 1484).

2.3.4 Utvikling

Prøver av rognkjekslarver ble tatt ut i henhold til samplingsplan (Tabell 2). For hver sampling ble 15 larver fra hvert kar bedøvet i en overdose MS222 og fiksert 4 % formaldehyd i fosfatbuffer (Merck 100496) og oppbevart i kjøleskap.

For analyser av bein- og brusktvikling, ble 15 fikserte larver fra hver behandling og hvert prøveuttak farget med Alcian blå for brusk og Alizarin rødt for bein (etter Kjørsvik et al., 2009). Analyser av larvene ble gjort fra bilder og gjennom stereomikroskop (Leica M205C, Tyskland). Beinutvikling av ryggvirvler ble klassifisert som transparent, kompakt eller fullt ossifisert (etter Eidsvik, 2010), basert på utbredelse og metning av rød merking, og totalt antall virvler ble telt. Programmet ImageJ ble brukt for telling og måling av disse larvene.

For histologiske studier ble fem fikserte larver fra hver behandling og hvert prøveuttak målt for standard lengde og støpt inn i parafin, tverrsnitt ble laget på en Leica RM2255, og snittene ble farget med Alcian Blue/PAS/Mayer. Tre larver fra hver av 2, 5, og 13 dager etter klekking ble også støpt inn i Technovit, og lengdesnitt ble laget på en Reichert Ultracut S og farget med toluidinblå. Snittene ble vurdert og fotografert med en Hamamatsu Digital Skanner med NDP.view2 software.

2.3.5 Overlevelse

Overlevelse ble kalkulert daglig basert på data innhentet i forbindelse med røktning, samt avslutningsvis ved flytting av larver til større kar på dag 37 etter klekking.

2.4 Statistikk

Statistisk analyse ble utført ved hjelp av SPSS Statistisc vX. Et signifikans nivå på $p=0.05$ ble benyttet for alle statistiske tester.

3 Resultater og diskusjon

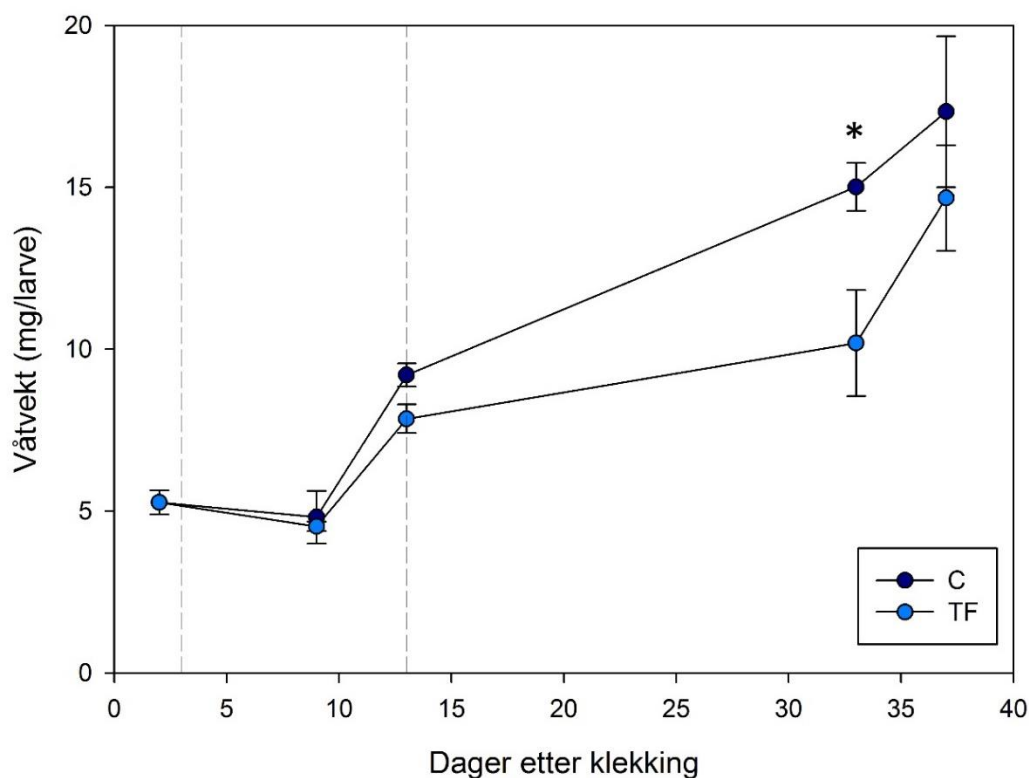
3.1 Generelle observasjoner

Ved startfôring ble det observert en forskjell i adferd mellom de to gruppene. De tre tankene med fisk som fikk copepoder (heretter kalt C-gruppe) var svært rolige i tankene. De fleste larvene satt på karveggen, lå på bunn eller svømte rolig rundt i tankene. Tørrfôrgruppen (heretter kalt TF-gruppe) var aktiv og svømte hurtig rundt i tankene i jakt på fôr, og færre satt på tankveggen. Det var forventet motsatt atferd for de to gruppene, det vil si at C-gruppa skulle være mer aktiv sammenliknet med TF-gruppa siden de må jakte aktivt på det bevegelige føret. Copepodene var trolig enkle å oppdage for rognkjekslarvene i tankene, selv med et så dimmet lys som det er i startfôringsfasen.

3.2 Vekst og utvikling

Vekt

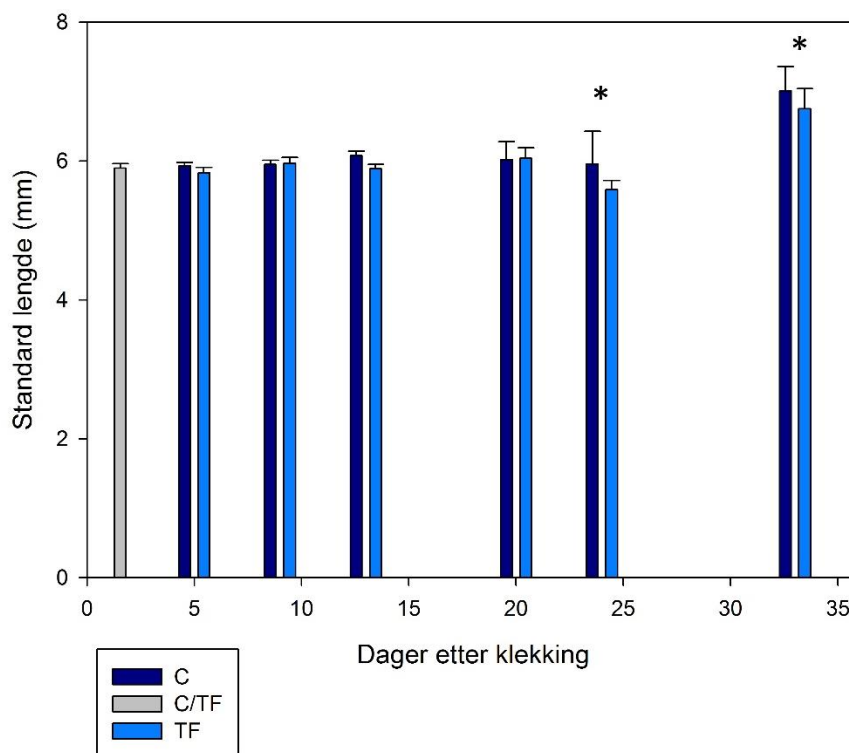
C-gruppa hadde høyere våtvekt enn TF-gruppa under hele forsøksperioden (dag 9-33 etter klekking) (Fig. 3). Ved dag 33 var våtvekten signifikant høyere for C-gruppa sammenliknet med TF-gruppa. Man kunne også ifølge Nordland Rensefisk se en størrelsesforskjell mellom de to gruppene ved å se ned i karene i fra dag 20 etter klekking. Nordland Rensefisk registrerte våtvekt på dag 37 dph (ved flytting av fisk). Våtvekt på 37 dph ble veid med en mindre nøyaktig vekt enn vekten SINTEF brukte (mikrovekt) og kan derfor være mer unøyaktig. Tørrvektsverdier er ikke vist da de viste samme trend som våtvekt. Våtvekt er vist fordi oppdretterne benytter dette målet for vekst selv.



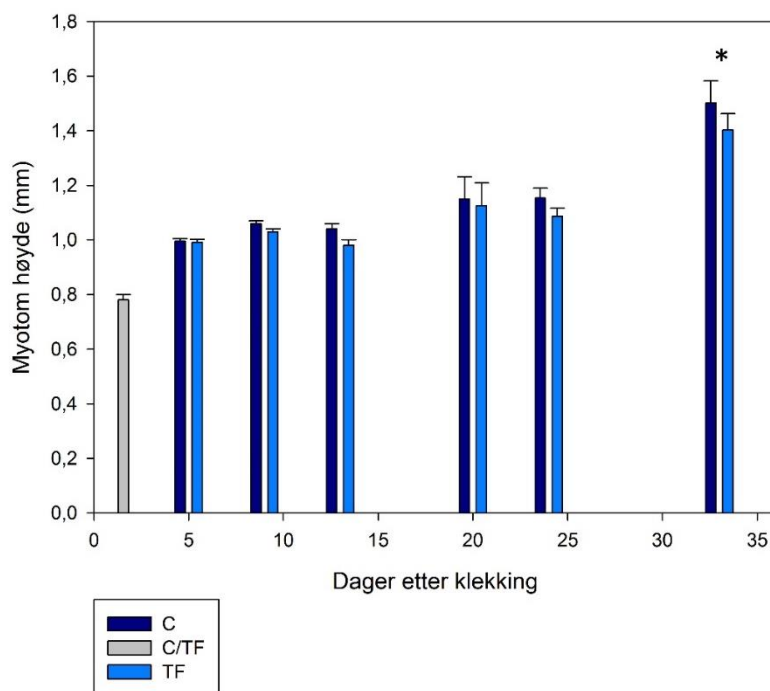
Figur 3. Våtvekt (mg/larve) hos rognskjeks-larver (n=9-12) ved dag 2, 9, 13, 33 og 37 dph, fra føring med copepoder (C) og tørrfôr (TF), vist som gjennomsnitt ± SE for triplikate behandlinger. Stiplede linjer angir start startfôring (d3) og weaning med tørrfôr (d13). Copepodefôring avsluttet ved 17 dph. Asterisk (*) angir signifikante forskjeller mellom gruppene. Måling av våtvekt ved dag 37 er utført av NR, de andre er utført av SINTEF.

Standard lengde og myotomhøyde

Larvenes gjennomsnittlige standardlengde økte ikke de første 20 dagene etter klekking, men var signifikant høyere for C-gruppa enn TF-gruppa ved 24 og 33 dph (Figur 4). Gjennomsnittlig myotomhøyde var signifikant høyere for C-gruppa ved 33 dph (Figur 5). Myotomhøyde var vanskelig å måle nøyaktig på grunn av rognskjeks-larvenes karakteristiske, runde utforming.



Figur 4. Standard lengde (mm) hos rognkjeks larver ved dag 2, 5, 9, 13, 24 og 33 etter klekking, fra fôring med copepoder og tørrfôr, vist som gjennomsnitt \pm SE for triplikate behandlinger. Start startfôring var ved d3 og weaning med tørrfôr d13. Copepodefôring ble avsluttet ved 17 dph. Asterisk (*) angir signifikante forskjeller mellom gruppene.



Figur 5. Myotomhøyde (mm) hos rognkjeks larver ved dag 2, 5, 9, 13, 24 og 33 etter klekking, fra fôring med copepoder og tørrfôr, vist som gjennomsnitt \pm SE for triplikate behandlinger. Start startfôring var ved d3 og weaning med tørrfôr d13. Copepodefôring ble avsluttet ved 17 dph. Asterisk (*) angir signifikante forskjeller mellom gruppene.

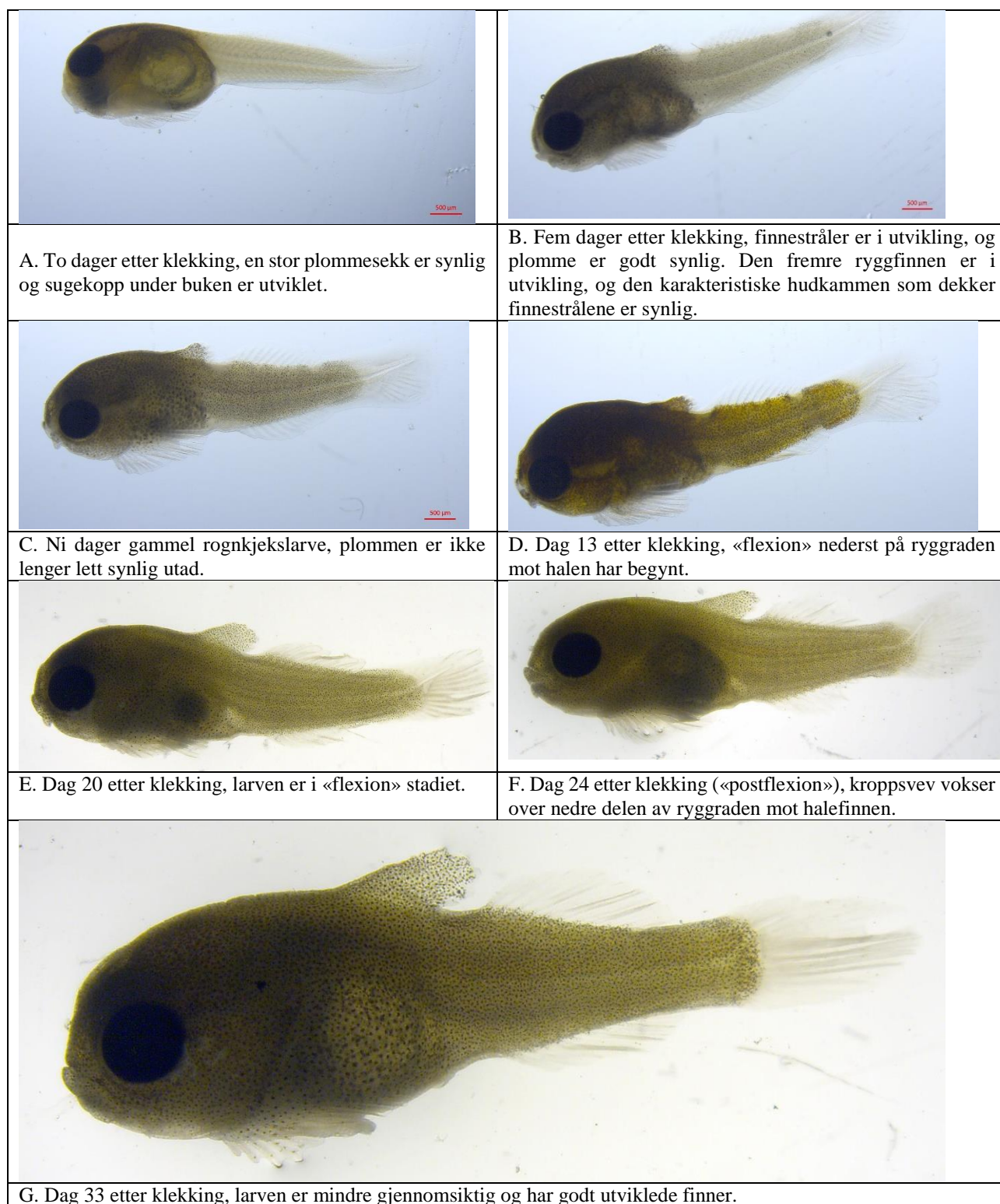
Larveutvikling og effekter av fôrtype

De yngste larvene hadde en stor plommesekk, finnestråler var synlig i brystfinner, og sugeskoppen var funksjonell (Fig. 6A). Den første utviklingen av noen finnestråler var synlig i alle finner ved dag fem etter klekking (Fig. 6B), og en antydning til vevsdannelse over fremre ryggfinne ble observert. Denne utviklingen fortsatte (se dag 9, Fig. 6C), og fra dag 13 (Fig. 6D) ble tidlig «flexion»-stadiet observert (nedre del av «rygggraden»/notochorden bøyes oppover). På dag 20 og 24 var alle finnestråler dannet (Fig. 6E,F), og ved dag 33 var fremre ryggfinne og flexion-området helt omvokst av kroppsvev (Fig. 6G). Ingen unormale larver ble observert blant de fikserte larvene.

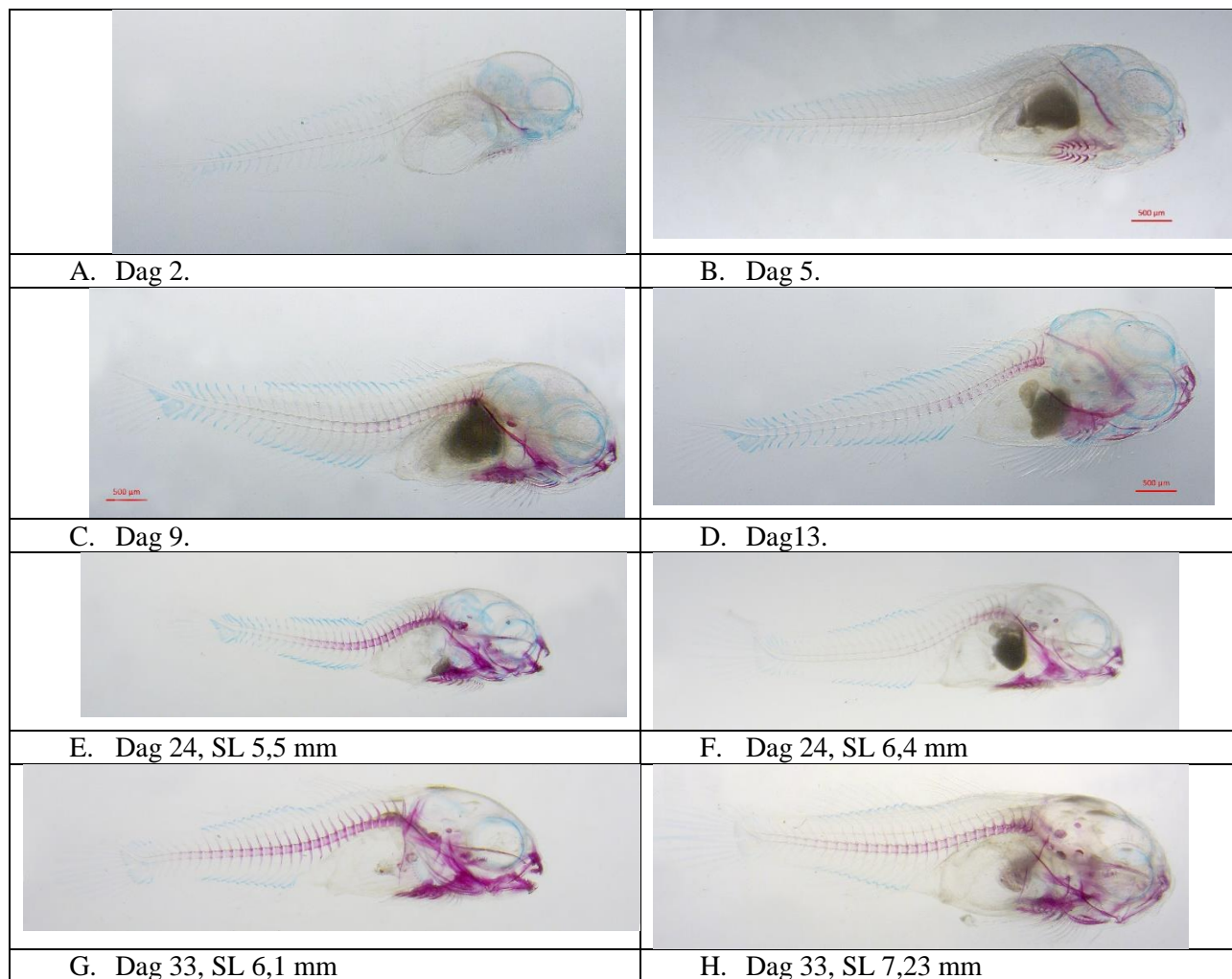
Beinutvikling

To dager gamle larver hadde synlig forbeining i sugeskiva og cleithrum/»skulderbein» (Fig. 7A), og pterygiophorene (feste for finnene) og kraniet var dannet med brusk. Ved dag fem etter klekking var også de fremre knokler i kjevepartiet noe forbeinet (Fig. 7B). I ni dager gamle larver var forbeiningen startet i ryggvirvlene, otolittene var forbeinet, samt flere kjeveknokler (Fig. 7C). Anlegg til finnestråler var synlig i alle rygg- og bukfinner, og i halefinnen var det også brusk i flere finnestråler. Fra dag ni til dag 24 er det særlig kjevebeina som blir mer forbeinet, og forbeining er synlig i stadig flere virvler (Fig. 7D, E).

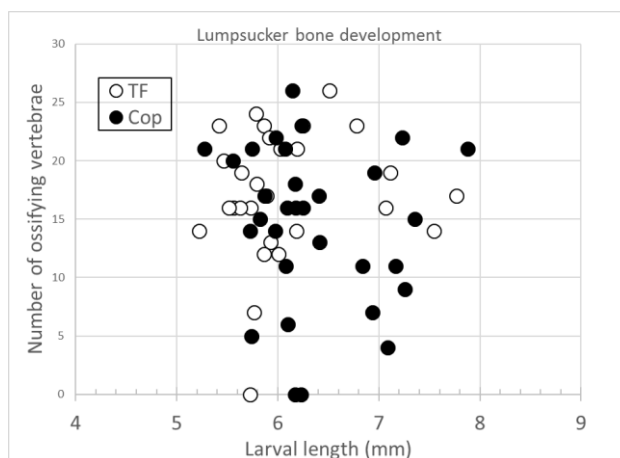
Fra dag 24 (Fig. 7E, F) var det stor individuell forskjell i forbeining mellom larvene, og de største kunne ha mindre beindannelse enn mindre larver. Det samme mønsteret gjorde seg gjeldende 33 dager etter klekking (Fig. 7F, G). Ingen larver hadde forbeining i alle virvler ved siste prøveuttak på dag 33. Larvene på dag 24 og 33 var 5-8 mm lange, og vi det kunne ikke påvises noen forskjell i graden av forbeining mellom larvene føret med copepoder eller tørrfôr (Fig. 8). Forbeiningsprosessen var kommet såpass kort at det heller ikke er mulig å trekke noen konklusjoner om eventuelle effekter fra startfôringen på beinutvikling. I sugeskiva under buken var alle elementer forbeinet mellom dag 9 og 13, en så rask utvikling av dette organet vitner om høyeste prioritet for tidlig funksjonalitet.



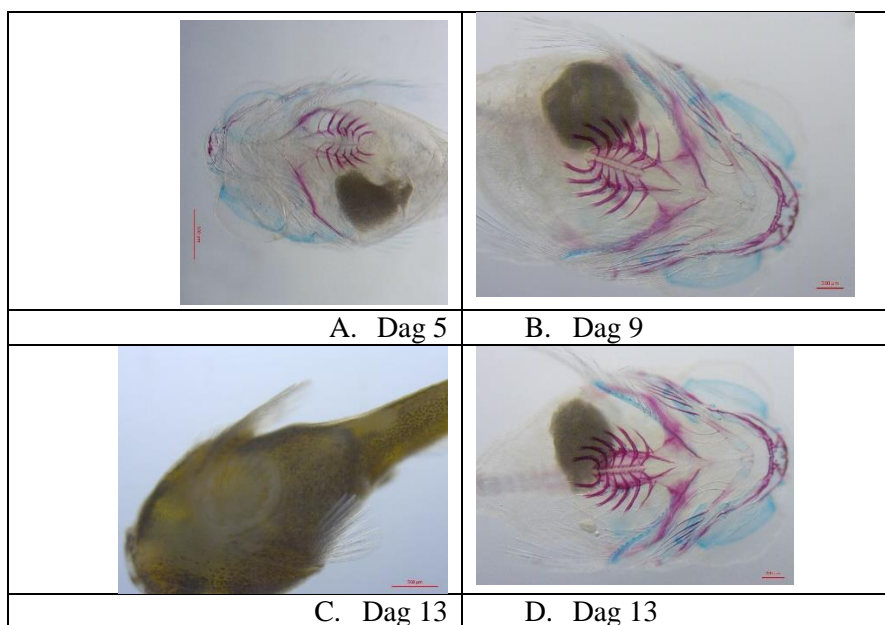
Figur 6. Larveutvikling hos rognkjeks de første 33 dager etter klekking. Bildene viser fikserte larver fra C-gruppen.



Figur 7. Beinutvikling hos rognkjekslarver føret med copepoder de første 13 dagene etter klekking. Fra dag 24 var det stor individuell forskjell mellom larvene i graden av forbeining, og de største kunne ha mindre beindannelse enn mindre larver.



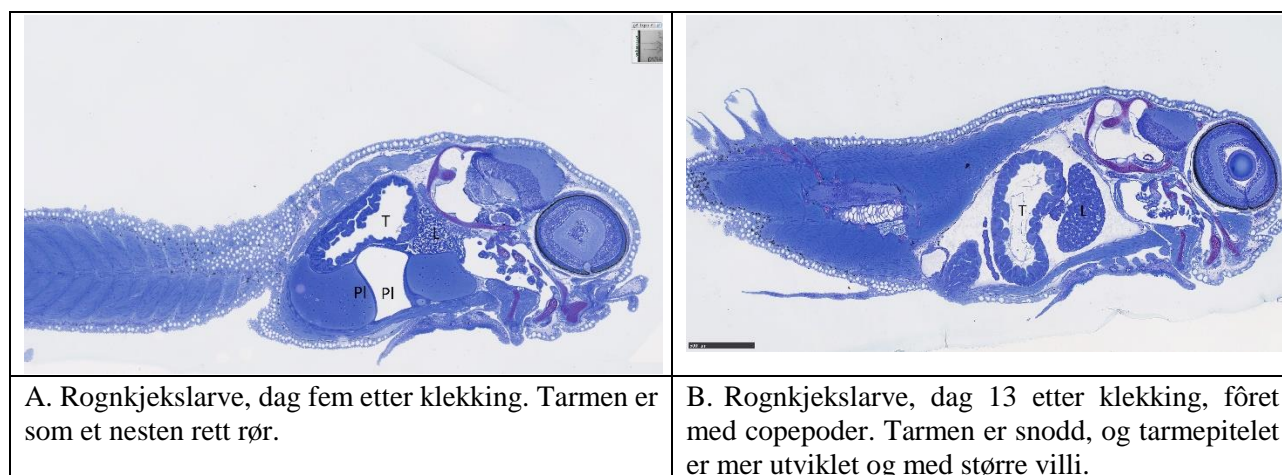
Figur 8. Antall virvler i forbeining i forhold til rognkjekslarvenes standard lengde ved dag 24 og 33 etter klekking. Larvene var fortsatt i starten av forbeiningsprosessen, og det var ikke mulig å påvise noen forskjeller mellom gruppene.



Figur 9. Beinutvikling i sugeskiva var synlig fra første prøveuttak to dager etter klekking, og alle elementer var forbeinet mellom dag 9 og dag 13.

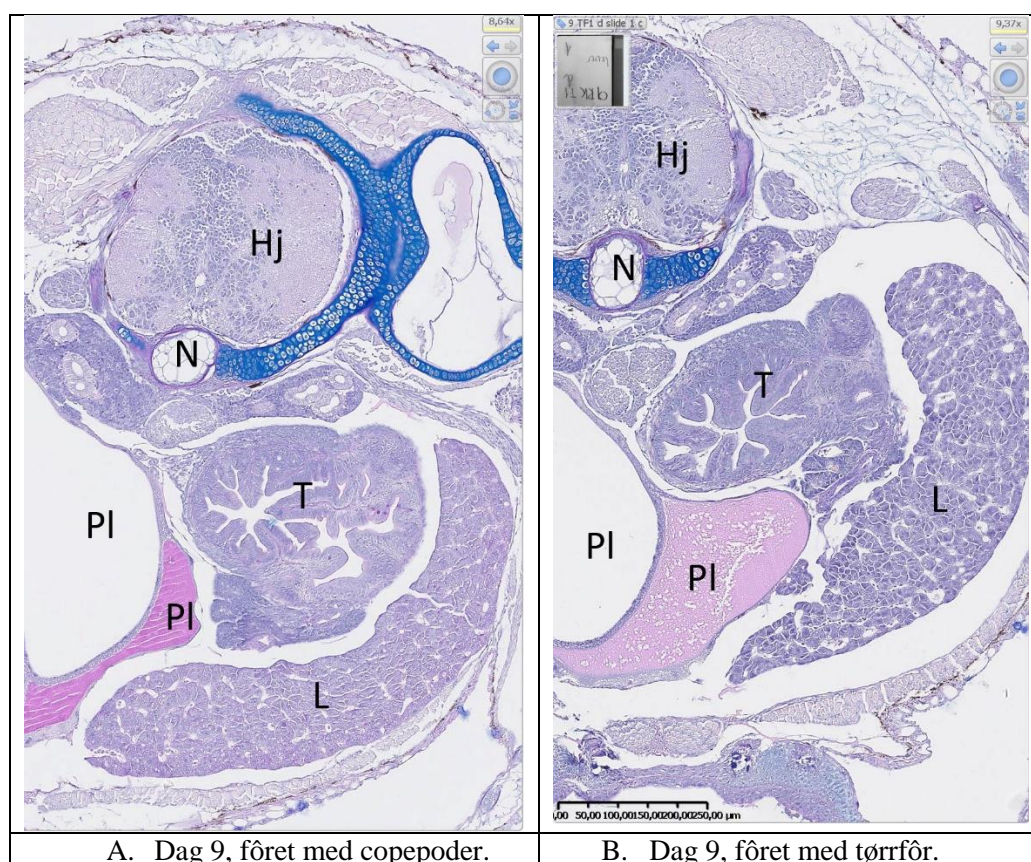
Histologi

Larvenes tarm var et enkelt rør to og fem dager etter klekking (Fig. 10A), plommen var stor og hepatocytene i leveren hadde tydelig høy energistatus med store glycogenlagre. Hos 13 dager gamle larver var størrelse og antall av villi i tarmen økt, og gjellebuer var i tydelig utvikling (Fig.10B).



Figur 10. Lengdesnitt av rognkjeks larver, dag 5 og 13 etter klekking. Technovit, farget med toluidinblå. L=lever, T=tarm, PI=plomme.

I ni dager gamle larver var tarmen snodd hos begge larvegruppene, plommesekken var fortsatt stor, men glycogen i lever ble bare observert hos larver fôret med copepoder (Fig. 11A). Larvene som ble fôret med tørrfôr hadde mindre lever, og hepatocytene var mindre (Fig. 11B).

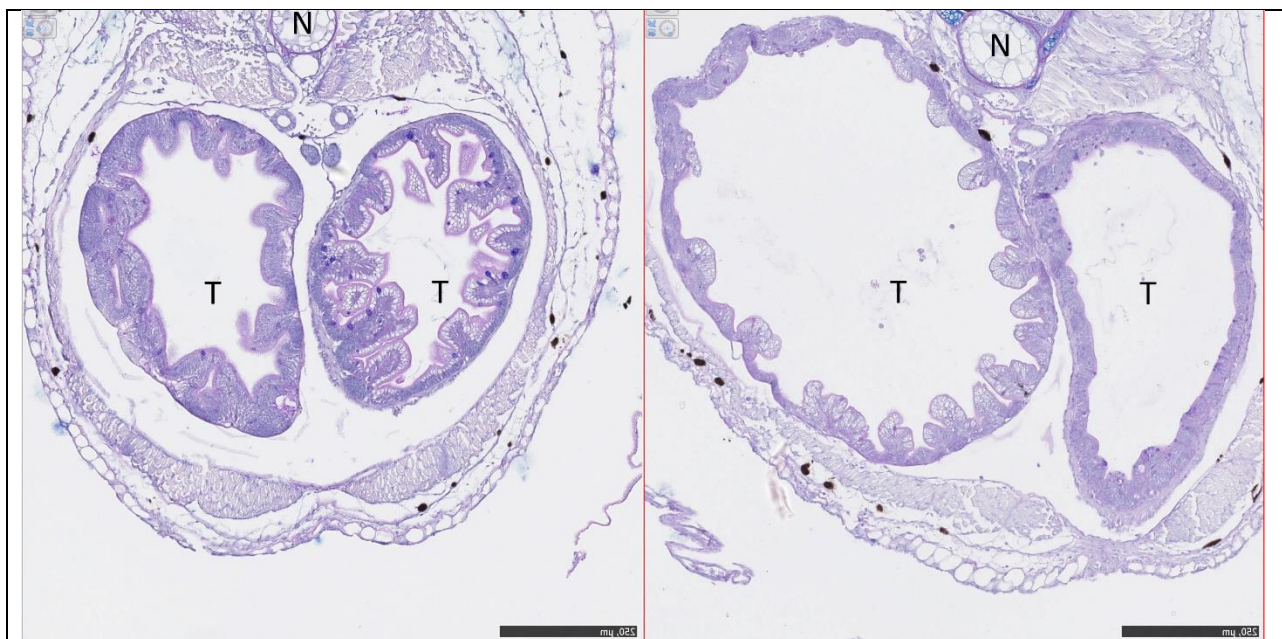


Figur 11. Histologisk tverrsnitt av ni dager gamle rognkjeks-larver. Parafinsnitt, farget med Alcian Blue/PAS/Mayer. Hj=hjerne, L=lever, N=notochord, Pl=plomme, T=tarm.

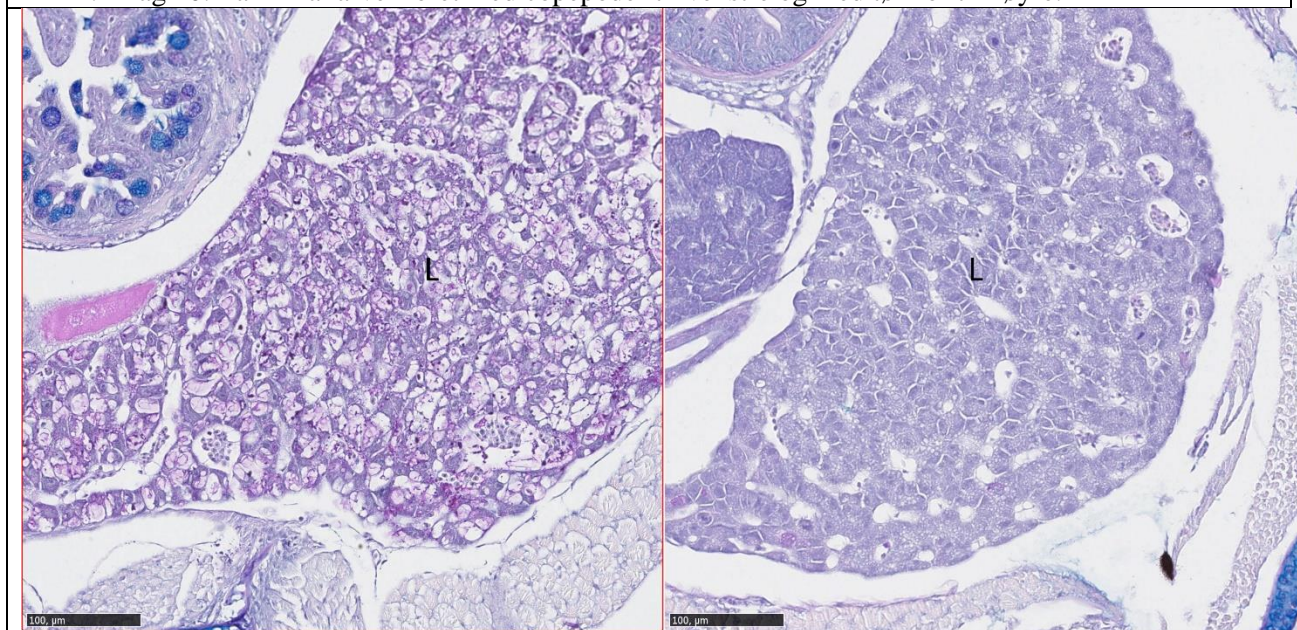
Hos tjue dager gamle larver, ca en uke etter weaning til tørrfôr for begge gruppene, var Cop-larvenes tarmepitel preget av undulerende villi med relativ jevn epiteltykkelse (Fig. 12A). Hos TF-larvenes ble det observert lavere epiteltykkelse, og antall villi var tydelig færre (Fig. 12A). I leveren hos Cop-larvene ble det observert mye glykogen, men i TF-larvenes lever ble det ikke observert (Fig. 12B). En rest av plommesekken ble observert i larver fra begge gruppene.

Ved slutten av forsøket, 33 dager etter klekking, var ikke forskjellen mellom larvegruppenes tarmstruktur like tydelig, selv om det også her var en tendens til lavere villihøyde i TF-larvenes tarm (Fig. 13). I leveren hos Cop-larver ble det fortsatt observert mye glykogenlagre, mens TF-larvenes lever ikke hadde tydelig glykogen (Fig. 13).

En foreløpig konklusjon ut fra histologiske data er at larvenes tarm- og leverutvikling ble påvirket positivt av startfôring med copepoder, og at larvene opprettholdt et høyt energilager i leveren også etter den første plommesekkefasen. Tarmvevets og leverutviklingen hos TF-larvene kunne tyde på en sultliknende tilstand med noe nedbrytning av tarmvevet i tidlig fase, og denne effekten var synlig gjennom hele forsøket.

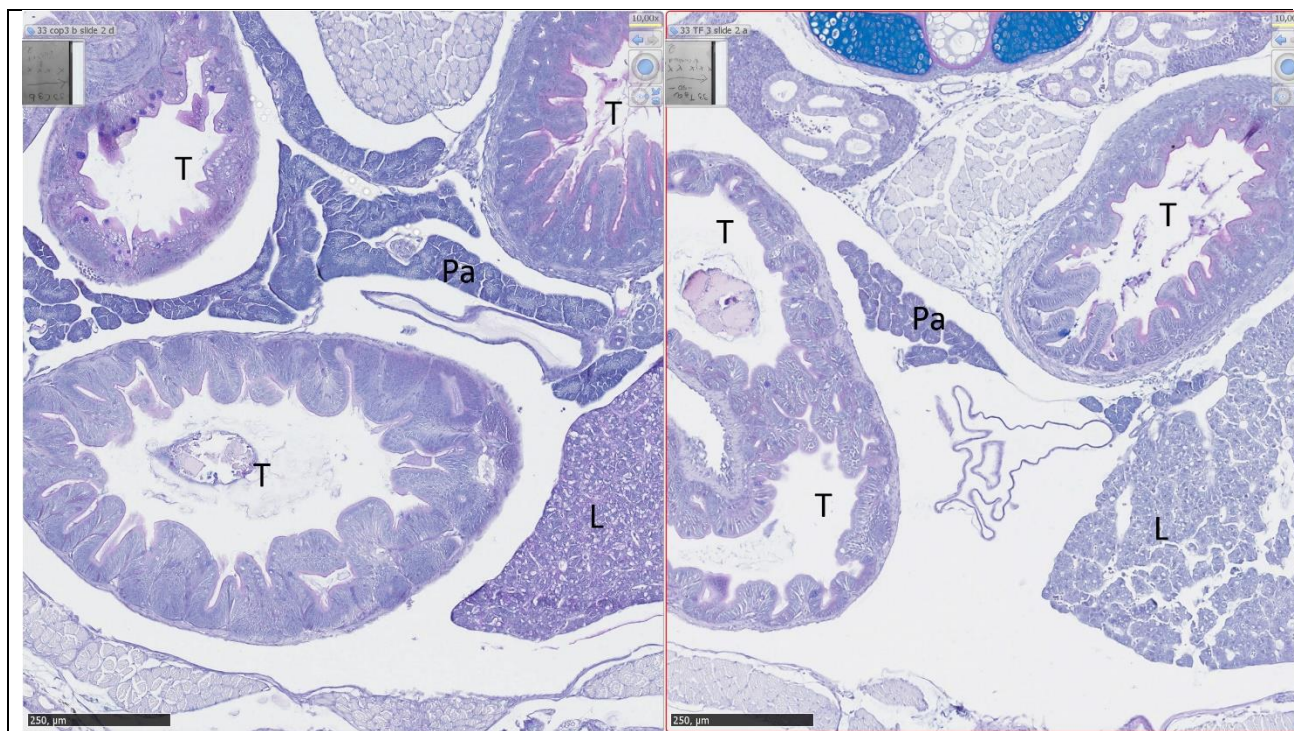


A. Dag 20. Tarm fra larver føret med copepoder til venstre og med tørrfôr til høyre.



B. Dag 20. Lever fra larver føret med copepoder til venstre og med tørrfôr til høyre.

Figur 12. Tverrsnitt av tarm (A) og lever (B) hos 20 dager gamle rognkjekslarver startføret med copepoder eller tørrfôr fram til dag 13 etter klekking. Parafinsnitt, farget med Alcian Blue/PAS/Mayer. T=tarm.



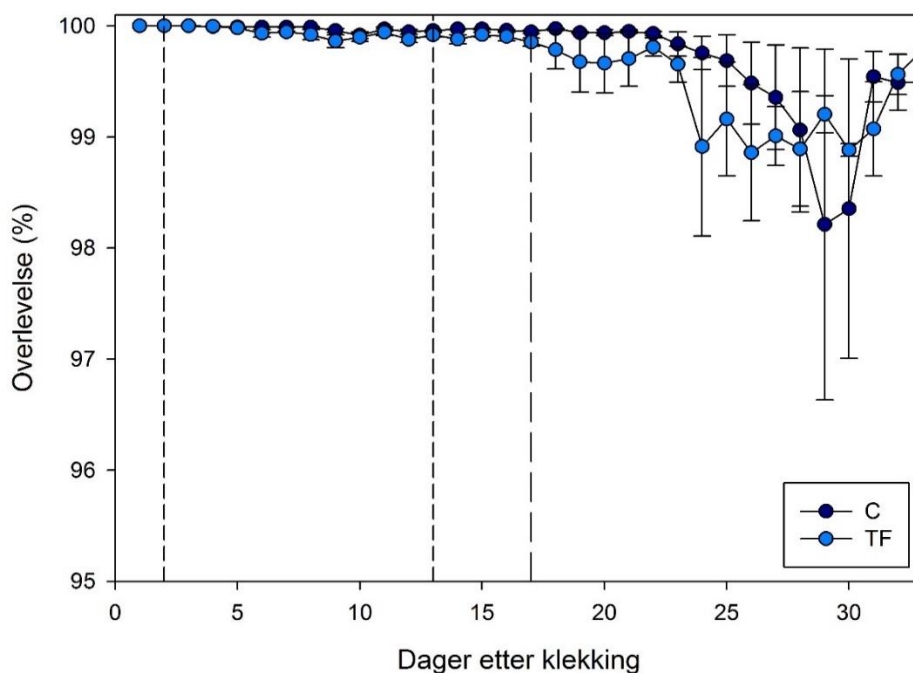
Figur 13. Tversnitt av tarm og lever hos 33 dager gamle rognkjekslarver startfôret med copepoder (til venstre) eller tørrfôr (til høyre) fram til dag 13 etter klekking. Parafinsnitt, farget med Alcian Blue/PAS/Mayer. L=lever, Pa=pankreas, T=tarm.

Overlevelse

Begge gruppene hadde en høy og stabil overlevelse frem til 17 dph på mellom 99,6 og 100 % (Fig. 14). Fra 17 til 31 dph sank overlevelsen for TF-gruppa, der spesielt to tanker (TF2, TF3) hadde høyere dødelighet som resulterte i høye standardfeil. Fra 23 til 30 dph sank også overlevelsen for C-gruppa, der tank C3 hadde høyest dødelighet. For C3 kommer den høye dødeligheten i denne perioden sannsynligvis av for høy larvetetthet i karet (Nordland Rensefisk, pers comm.). C-gruppa hadde en høyere overlevelse enn TF-gruppa gjennom hele forsøksperioden med unntak av 29, 30 og 32 dph, men forskjellene var ikke signifikante. Hva som var årsaken til den høye dødeligheten i TF2 og TF3 vites ikke, da det ikke så ut til å være for høy tetthet i disse karene, men man kan lett bli lurt av å bare studere tettheten ved å se ned i karet.

Ved forsøkets slutt (33 dph) var den totale dødeligheten på $9,3 \pm 5,0$ % for C-gruppa og $13,2 \pm 1,7$ % for TF-gruppa.

NR opplyser at dødeligheten kan være underestimert. Det er vanskelig å telle riktig når det blir mange å røkte ut pr dag.



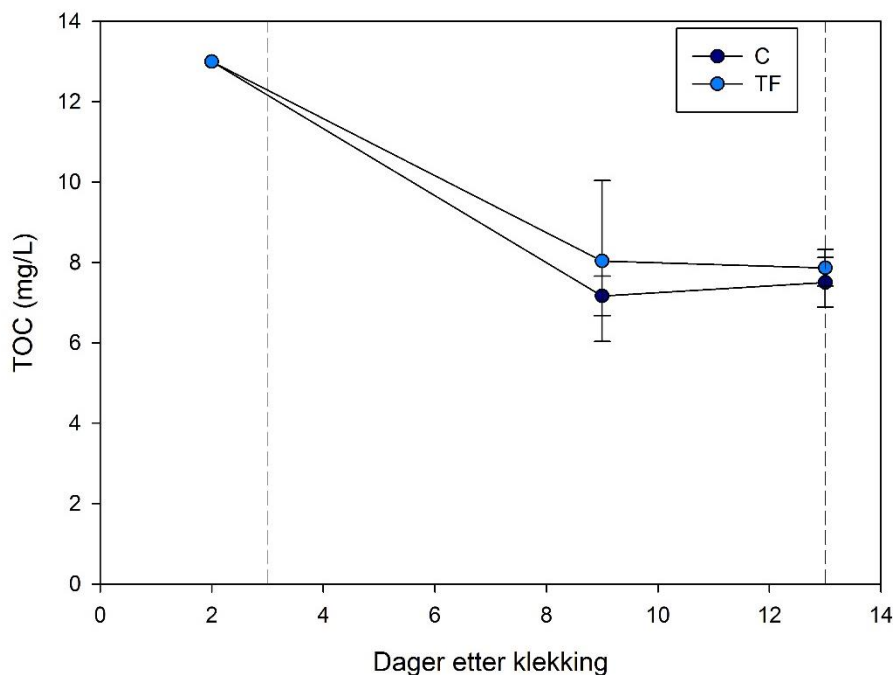
Figur 14. Gjennomsnittlig overlevelse fra dag 2 til dag 33 etter klekking angitt i prosent \pm SE. Små, stiplede linjer på dag 2 angir første copepodefôring for C-gruppe og fôring med tørrfôr av størrelse 150 μ m for TF-gruppe. Dag 13 angir start weaning med 150 μ m tørrfôr for C-gruppe. Store, stiplede linjer på dag 17 angir slutt på copepodefôring for C-gruppe og introduksjon til 300 μ m tørrfôr for begge grupper.

Overlevelse og vekst kunne muligens vært bedre for C-gruppen hvis man hadde tilbudt copepoder i 5-7 dager til, for å kunne korte ned på bruksperioden for 150 μ m fôret enda mer eller eventuelt droppe det og weanet larvene direkte på 300 μ m (Lars Ulvan, Nordland Rensefisk, pers. komm.).

Forsøket fikk levert for store copepoder i forhold til det som var opprinnelig bestilt hos C-Feed. Man fikk stadium C1 i snitt (N6, C1, C2) i stedet for N5 i snitt (N4, N5, N6) ved første leveranse (se Tab. 1). Det var vanskelig å se om rognkjekslarvene klarte å spise C1, men siden overlevelsen var høy i starten, går man ut fra at størrelsen passet rognkjekslarvenes munnstørrelse. Man vet derimot ikke hvordan resultatene hadde blitt med mindre størrelse på copepodene fra start.

3.3 Organisk belastning (Total organisk karbon, TOC)

Det høyeste nivået av totalt organisk karbon (TOC) ble registrert før startfôringen (2 dph, 13 mg/L; Fig. 15). Dette kan skyldes at klekking av egg ofte fører til en frigjøring av løst organisk karbon (Skjermo et al., 1997). Selv om klekkingen foregår i egen inkubator, er denne koblet til tanken via en slange, og det vil dermed føres over partikler og løst organisk materiale til larvetankene. Etter oppstart av startfôring sank nivået av TOC (9 dph) for begge gruppene, og holdt seg relativt stabil ved dag 13 etter klekking. TF-gruppa hadde noe høyere innhold av TOC ved sampling 9 og 13 dph, selv om forskjellene ikke var signifikante.



Figur 15. Total organisk karbon (TOC) fra gruppe fôret med copepoder og tørrfôr, ved 2, 9 og 13 dph. Verdiene viser gjennomsnitt (n=3) og standard avvik (SD). Stiplede linjer angir start startfôring (3 dph) og weaning med tørrfôr størrelse 150 μ m (13 dph).

3.4 Mikrobiota

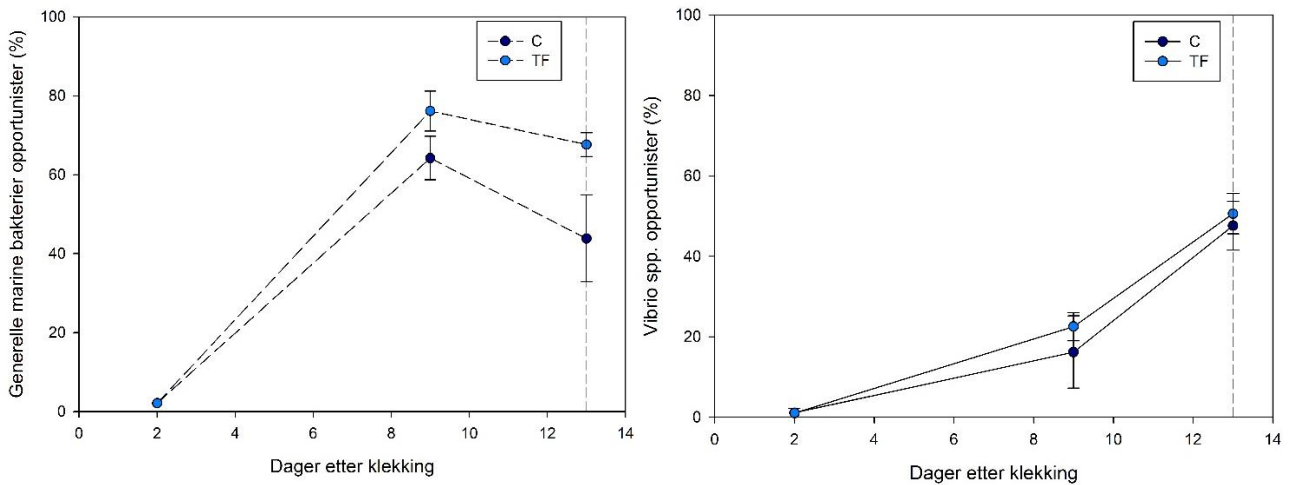
Opportunister

Ved dag 2 etter klekking var innholdet av opportunistiske bakterier lavt, både generelle marine bakterier og *Vibrio* spp. (Henholdsvis 2,1 og 1,1 %) (Fig. 16), selv om den organiske belastningen var relativt høy (Fig. 15). Det er positivt for larvene.

Tilførsel av levendefôr og tørrfôr førte til en økning i andel opportunister, både generelle marine bakterier og *Vibrio* spp. (9 dph), som forventet. TF-gruppa hadde en svært høy andel av opportunister (76 %) på Marin agar, mens C-gruppa hadde 64 %. Andelen var noe lavere for *Vibrio* spp., men også her var TF-gruppa høyest (22 %) sammenliknet med C-gruppa (16 %).

Ved dag 13 etter klekking ble andelen opportunister redusert for generelle marine bakterier, mens den fortsatte og økte for *Vibrio* spp. For generelle marine bakterier var andelen av opportunister 67 % for TF-gruppa og 43 % for C-gruppa (Fig. 16). Det er viktig her å merke seg at levendefôr førte til en stor reduksjon i andel generelle marine opportunister i tankene ved 13 dph (reduksjon på 36 %). Denne reduksjonen kan være viktig for å sikre lavt innhold av opportunister og unngå et ugunstig forhold mellom larver og bakterier, spesielt om larvene er stresset.

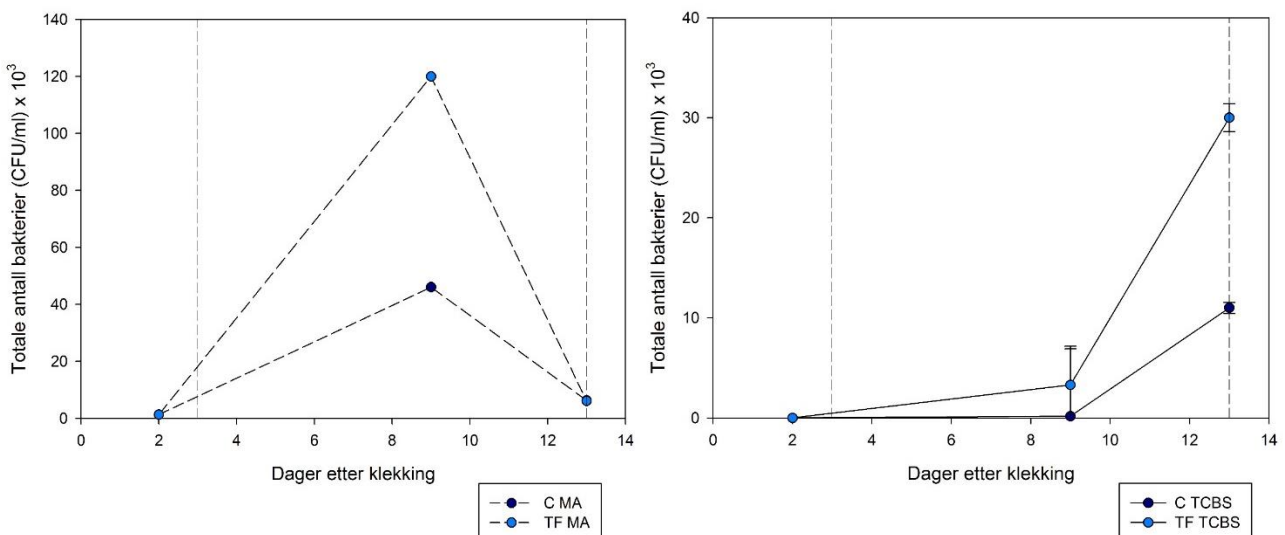
For å redusere andelen opportunister ytterligere kan flere tiltak for å bedre vannkvaliteten settes i verk, f. eks modning av vannet/intern eller sentral resirkulering, ytterligere filtrering for å fjerne flere små partikler og/eller hyppigere røkting av avfall i tank.



Figur 16. Andel opportuniste (%) fra fôring med copepoder (C) og tørrfôr (TF), ved dag 2, 9 og 13 etter klekking. Venstre: generelle marine bakterier og høyre: Antatt *Vibrio*-bakterier. Verdiene viser gjennomsnitt (n=3) og standardfeil. Stiplede linjer angir start startfôring (3 dph) og weaning med tørrfôr størrelse 150 µm (13 dph).

Totale antall dyrkbare bakterier (CFU/ml)

Det totale antall dyrkbare bakterier målt som CFU/ml viste en svært lav konsentrasjon ved 2 dph for deretter å øke ved 9 dph for generelle marine bakterier og *Vibrio* spp. for begge gruppene. TF-gruppene hadde høyest innhold av bakterier ved alle uttak bortsett fra ved 13 dph på Marin agar, hvor gruppene hadde et likt innhold (Fig. 17). Ved dag 9 på Marin agar og dag 13 på TCBS (*Vibrio*-selektiv) hadde C-gruppen ca. 30 % lavere innhold av bakterier sammenliknet med TF-gruppen.



Figur 17. Totale antall dyrkbare bakterier, målt som CFU/ml x 10³, på Marin agar (venstre) og TCBS (*Vibrio*-selektiv, høyre), for grupper fôret med copepoder og tørrfôr, ved dag 2, 9 og 13 etter klekking. Stiplede linjer angir start for startfôring (d3) og weaning med tørrfôr størrelse 150 µm (d13). Verdiene viser gjennomsnitt (n=3) og standardfeil

Det var forventet at det totale antall bakterier skulle øke i forsøksperioden i takt med økningen i fôrkonsentrasjonene. Dette var ikke tilfellet for generelle marine bakterier ved 13 dph (Figur 17) hvor konsentrasjonen gikk ned. Årsaken til dette kan være prøveuttaksprosedyre, siden NR utførte prøveuttak ved 9 dph og SINTEF ved 13 dph. Uttaket ble gjort på to ulike måter. Anlegget filtrerte bort larver, filtrerte gjennom en silduk for å fjerne fôr og samlet deretter opp vannet i ei bøtte. SINTEF Filtrerte kun gjennom silduk og direkte opp i prøveglass. I tillegg kan tidspunkt på dagen påvirke resultatet. Ved dag 9 dph ble prøvene tatt ut klokka 17 (ca. 7 timer etter røkting), mens ved dag 13 dph ble prøvene tatt ut klokka 12 (ca. 2 timer etter røkting). Økt vannutskiftning i fisketankene på dag 13 kan også ha bidratt til å redusere antallet bakterier i vannet i tankene.

3.5 Artsidentifikasjon

3.5.1 Sammenlikning av mikrobiota mellom biofilm og vann

Mikrobiota i vann og biofilm var forskjellig, om man studerer familienivå av bakterier (Tabell 3), slektsnivå og artsnivå (Appendiks 1). Det var store forskjeller mellom bakteriesammensetningen i vannet i replikate tanker på samme dag, vannet i samme tank med bare fire dagers mellomrom, mellom biofilm og vann i samme system, mellom biofilm i samme system over tid og mellom vann og biofilm i de ulike behandlingene. Dette er et interessant resultat som sier noe om kompleksiteten og dynamikken i systemet. Mange av prøvene hadde relativt høy diversitet med en relativt jevn fordeling mellom de mest vanlige gruppene (se for eksempel Figur A i Appendiks 1), mens noen prøver var veldig dominert av en gruppe bakterier. Det kan tolkes som positivt at bakteriesamfunnet har høy diversitet og ikke noen få dominerende arter, siden det tyder på et mer balansert og modent bakteriesamfunn som vil være mer konkurransedyktig og mer robust mot påvirkninger og opportunistiske bakterieoppblomstringer. Vannet på dag 9 i tank 15 som fikk copepoder var for eksempel dominert av *Leucothrix* (63 % av bakterieartene, Figur C i Appendix 1), som er Gram negative, aerobe, heterotrofe, typisk marine filamentdannende (tråddannende) bakterier. I vannet i tank 13 som fikk tørrfôr dominerer *Flavobacterium* på dag 9 (41 %, Figur G i Appendiks 1), mens *Pseudorhodobacter* (18 %) og *Flavobacterium* (23 %) er de to dominerende gruppene på dag 13 (Figur F i Appendiks 1). Den replikate tørrfôrtanken tank 14, er til sammenligning dominert av *Pseudoalteromonas* på dag 9 (46 %, Figur I i Appendiks 1), men har høyere diversitet og jevn fordeling av dominerende bakteriegrupper på dag 13 (Figur H i Appendiks 1). Den omvendte utviklingen skjedde i den replikate tank 17 som også fikk tørrfôr, fra en jevn fordeling av dominerende arter på dag 9 (Figur K i Appendiks 1) til mer dominans av *Pseudoalteromonas* på dag 13 (24 %, Figur J i Appendiks 1). Biofilmen i tørrfôrbehandlingen skifter dominans fra *Flavobacterium* (23 %) og *Pseudorhodobacter* (17 %) på dag 9 (Figur M i Appendiks 1) til *Sulfitobacter* (23 %) på dag 13 (Figur L i Appendiks 1). Man kunne forventet mer stabilitet i sammensetningen i en biofilm, men endringene kan ha sammenheng med tid siden vasking (økende tykkelse på biofilm) eller ved flekkvis tykkelse av biofilm og heterogen fordeling av arter som påvirker prøvene. Den store variasjonen i artssammensetning av bakterier vist her er interessant fordi det kan bety at fiskelarvene utsettes for veldig forskjellige og varierende mikrobielle karmiljø som kan ha betydning for vekst, utvikling, sykdomsmotstand, immunsystem og overlevelse. De blir også utsatt for raske endringer i mikrobiota og for ulike mikrobiota ved ulike stadier av utviklingen i de ulike (replikate) karene. Dette kan være en del av forklaringen på ulike overlevelse i "like" kar med samme eggruppe og fôr. Det kan være mye å vinne på å redusere variasjonen og ustabiliteten i mikrobiotaen for å få en høyere og mer forutsigbar yngelproduksjon. Stabilitet og reproduserbarheten kan økes ved målrettet vannbehandling og drift for å holde et modent bakteriesamfunn, noe som er vist å øke vekst, reproduserbarhet og overlevelse i marin yngelproduksjon (Vadstein et al., 1993, Skjermo et al., 1997, Attramadal et al., 2012, 2014). Mikrobiotaen på og i hele skylte larver ble også forsøkt kartlagt i dette forsøket, men vi lyktes ikke å få opp nok bakterie-DNA for sekvensering. Det var også noen av vannprøvene som gav for lite bakterie-DNA til å kunne sekvenseres.

Tabell 3. Sammenlikning av mikrobiota fra biofilm og vann i de to behandlingene. Tabellen viser prosentandel for hver familie med en forekomst $\geq 1\%$ av Bacteria.

% av Bacteria dag 9	Copepode tanker						
Familie	Vann (tank 12)	Vann (tank 15)	Biofilm	Vann (tank 13)	Vann (tank 14)	Vann (tank 17)	Biofilm
Alphaproteobacteria	19	13	15	15	7	51	21
Betaproteobacteria	41	1		9		1	15
Gammaproteobacteria	30	80	35	25	83	8	16
Flavobacteria	8	5	43	42	8	37	26
Sphingobacteria				3			5
Fusobacteria							
Bacteroidia							
Cytophagia				5			11
Acidimicrobiia							1

% av Bacteria dag 13	Copepode tanker						
Familie	Vann (tank 12)		Biofilm	Vann (tank 13)	Vann (tank 14)	Vann (tank 17)	Biofilm
Alphaproteobacteria	13		5	22	20	13	80
Betaproteobacteria	2			24	2		1
Gammaproteobacteria	48		62	15	43	60	9
Flavobacteria	33		25	25	28	21	6
Sphingobacteria	2			3	5	3	1
Fusobacteria			3				
Bacteroidia			1				
Cytophagia				5			
Acidimicrobiia							

% av Bacteria i biofilm	Før fôring	Copepodetanker		Tørrfôrtanker	
Familie	Dag 2	Dag 9	Dag 13	Dag 9	Dag 13
Alphaproteobacteria		15	5	21	80
Betaproteobacteria				15	1
Gammaproteobacteria		35	62	16	9
Flavobacteria	97	43	25	26	6
Sphingobacteria	3			5	1
Fusobacteria			3		
Bacteroidia			1		
Cytophagia				11	
Acidimicrobiia				1	

3.5.2 Potensielle sykdomsbakterier

De vanligste sykdommer hos rognkjeks forårsaket av bakterier er atypisk *Aeromonas salmonicida*, *Pasturella* sp., *Vibrio anguillarum*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *Vibrio ordalii* og *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida* (Fiskehelserapporten, 2016; Bornø et al., 2016). Det rapporteres også om sår bakterien *Tenacibaculum* sp., enten alene eller sammen med andre *Vibrio* arter (Bornø et al., 2016). Flavobakterier gir sykdom og sår hos laks, men det er usikkert om dette er også tilfelle for rognkjeks (Bornø et al., 2016; Johansen et al., 2016). Disse bakterietypene er også kjent fra laks, men det ser ut til at rognkjeks infiseres av spesielle ”rognkjeks”-stammer (Fiskehelserapporten, 2016). Resultatene av 16S Metagenomic Sekvensering ble gjennomgått spesifikt for de nevnte bakterieartene. Som forventet ble *Vibrio* ssp. påvist i nesten alle prøver (utenom dag 9 i tank 13 med tørrfôr), men hverken *Vibrio anguillarum* eller *Vibrio ordalii* ble identifisert på artsnivå. Det betyr at vi ikke kan garantere at denne gruppen bakterier ikke inneholder disse artene, men det kan også bestå av helt andre og ufarlige *Vibrio*arter. *Vibrio* forekom i en lav andel av bakterieartene ($\leq 1\%$ av Bacteria) i alle prøver utenom dag 9 og 13 i T14 med tørrfôr (14% begge dagene) og dag 13 i T17 med tørrfôr (7%). Alle prøver viste på samme måte forekomst av *Aeromonas* og *Pseudomonas*, men hverken *Aeromonas salmonicida* eller *Pseudomonas anguilliseptica* ble identifisert på artsnivå i noen av prøvene. *Aeromonas* forekom i en lav andel av bakterieartene ($\leq 1\%$) unntatt dag 9 i biofilm i behandlingen med tørrfôr og i tank 13 med tørrfôr på dag 9 og 13 der de utgjorde 2-3 %. *Pseudomonas* forekom i en lav andel av bakterieartene

(≤ 1 %) unntatt dag 9 i tank 15 med copepoder (12 %), dag 9 og 13 i tank 13 med tørrfôr (henholdsvis 8 og 17 %), dag 13 i tank 17 (2 %) og dag 9 i biofilm med tørrfôr (10 %) Pasturella ble ikke påvist i noen av prøvene. Tenacibaculum forekom i alle prøver i en lav andel av bakterieartene (≤ 1 %) unntatt i biofilmen på dag 2 (4 %), dag 13 i tank 12 med copepoder (12 %), i biofilmen i copepodebehandlingen dag 9 og 13 (henholdsvis 6 og 5 %) og dag 13 i tank 17 med tørrfôr. Flavobacterium var vanlig i alle prøver, og utgjorde fra 5 til 33 % av bakterieartene i vannet og 25 og 43 % av biofilmbakterieartene i copepodebehandlingen og 8 til 42 % i vannet og 6 og 26 % av biofilmbakterieartene i tørrfôrbehandlingen. I biofilmen før fôringen startet (dag 2) utgjorde Flavobacterium 38 % av artssammensetningen. Det ble altså påvist grupper som *kan* inneholde potensielle sykdomsbakterier i forsøket. Det var stor variasjon i hvor stor del av bakteriesamfunnet de undersøkte slektene utgjorde i de ulike prøven.

4 Konklusjon

- Rognkjeks fôret med copepoder hadde høyere våtvekt, standard lengde og myotomhøyde under hele forsøket. Ved forsøkets slutt (33 dph) var forskjellene signifikante.
- Fôring med copepoder førte til en reduksjon i andelen generelle marine opportuniste i tankene med 36 % (13 dph).
- Fôring med copepoder førte til en reduksjon i antall dyrkbare bakterier med 33 % (9 og 13 dph for henholdsvis generelle bakterier og *Vibrio* Spp.).
- C-gruppa hadde noe lavere innhold av TOC i vannet under forsøksperioden (9 og 13 dph), men forskjellene var ikke var signifikante.
- Larvenes skjelett var i ikke ferdig med forbeiningsprosessen ved slutten av forsøket, og det kunne ikke konkluderes med eventuelle effekter på deformiteter.
- Fôring med tørrfôr hadde negativ effekt på tarmepitel og energilagring i lever, og effekten var synlig gjennom hele forsøket.
- Det var store variasjoner mellom bakteriesammensetningen i vannet i replikate tanker på samme dag, vannet i samme tank med bare fire dagers mellomrom, mellom biofilm og vann i samme system, mellom biofilm i samme system over tid og mellom vann og biofilm i de ulike behandlingene. Det kan være mye å vinne på å redusere variasjonen og ustabiliteten i mikrobiotaen for å få en høyere og mer forutsigbar yngelproduksjon.
- Det ble påvist grupper som *kan* inneholde potensielle sykdomsbakterier i forsøket. Det var stor variasjon mellom prøvene i hvor stor del av bakteriesamfunnet disse gruppene utgjorde, men ikke et tydelig mønster hverken mellom biofilm og vann, over tid eller mellom de to behandlingene.
- C-gruppa hadde en høyere overlevelse enn TF-gruppa ved alle 33 dager, bortsett fra ved 29, 30 og 32 dph, men forskjellene var ikke signifikante.
- Det antas at dersom man hadde fôret noe lengre med copepoder kunne man sett en større effekt på overlevelsen.

5 Litteraturliste

Attramadal, K.J.K., Salvesen, I., Xue, R., Øie, G., Størseth, T.R., Vadstein, O., Olsen, Y., 2012. Recirculation as a possible microbial control strategy in the production of marine larvae. *Aquac. Eng.* 46, 27–39.

Attramadal, K.J.K., Truong, T.M.H., Bakke, I., Skjermo, J., Olsen, Y., Vadstein, O., 2014. RAS and microbial maturation as tools of K-selection of microbial communities improve survival in cod larvae. *Aquaculture* 432, 483–490.

Bornø, G., Alarcón, M., Linaker, M.L., Colquhoun, D., Nilsen, H., Gu, J., Gjerset, B., Hansen, H., Thoen, E., Gulla, S., Jensen, B.B. (2016). Akutt dødelighet hos rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*) i 2015 Veterinærinstituttets rapportserie – 2 – 2016.

Dahle, S.W., Hagemann, A., Attramadal, Y., Stavrakaki, M., Evjemo, J.O., Kjørsvik, E. (2014). Long term feeding with copepods. In: Production of ballan wrasse – science and practice (Eds. Synnøve Helland, Stine Wiborg Dahle, Courtney Hough and Jørgen Borthen). s. 46-47.

Doan, X. N. (2014). Larval staging, growth, prey selection and bone development in Atlantic bluefin tuna (*Thynnus thynnus*) fed with cultivated copepodes (*Acartia tonsa*). MSc-oppgave, Inst. for biologi, NTNU, Trondheim.

Eidsvik, Elin 2010. Co-feeding Atlantic cod larvae (*Gadus morhua*) with copepod nauplii (*Acartia tonsa*) and rotifers (*Brachionus plicatilis*): Effects on growth and osteological development. MSc-oppgave, Inst. for biologi, NTNU, Trondheim.

Fiskeridir (2016). <http://www.fiskeridir.no/Akvakultur/Statistikk-akvakultur/Statistiske-publikasjoner/Statistikk-for-akvakultur>

Fiskehelse rapporten 2015 (2016). Veterinærinstituttets årlige oversikt over fiskehelsen i Norge. Brit Hjeltnes, Cecilie S. Walde, Britt Bang Jensen og Asle Haukaas (red.). Veterinærinstituttet rapportserie nr 3/2016.

Kjørsvik, E., Olsen, C., Wold, P.-A., Hoehne-Reitan, K., Cahu, C.L., Rainuzzo, J., Olsen, A.I., Øie, G., and Olsen, Y. (2009). Comparison of dietary phospholipids and neutral lipids on skeletal development and fatty acid composition in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*, 294: 246–255.

Skjermo et al. (1997). Microbially matured water: a technique for selection of a non-opportunistic bacterial flora in water that may improve performance of marine larvae. *Aquaculture International*, 5: 13-28.

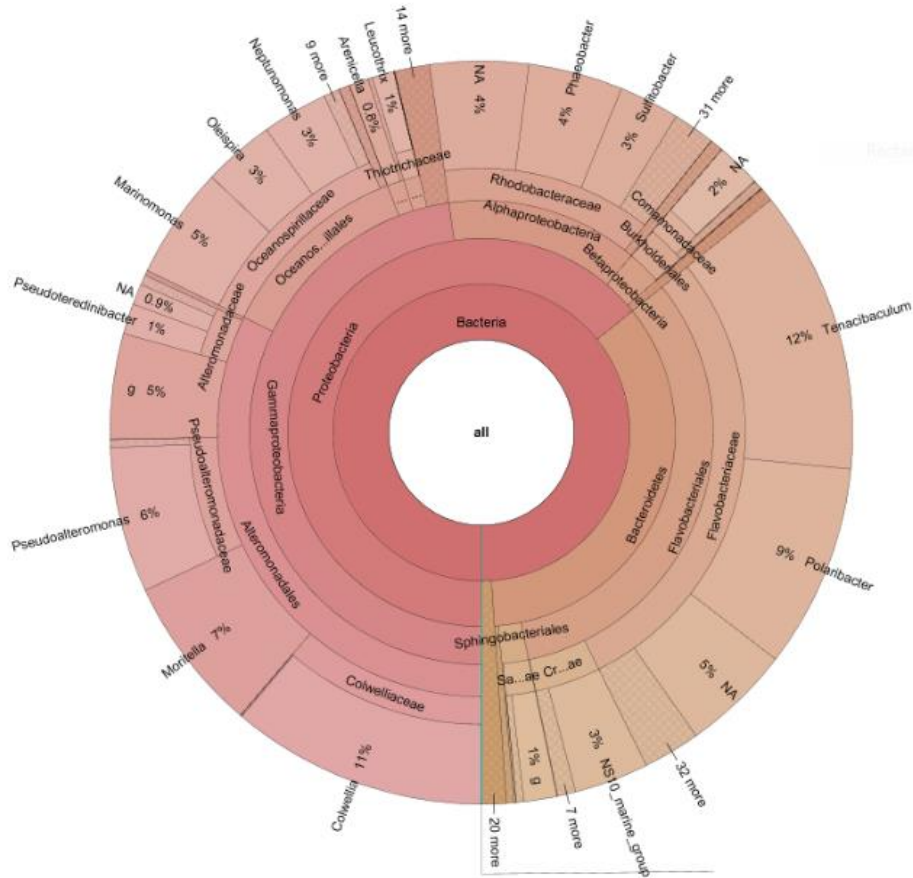
Sørøy, Maria 2012. Dietary effects of different live prey on growth and functional development in ballan wrasse (*Labrus bergylta*) larvae and juveniles. MSc-oppgave, Inst. for biologi, NTNU, Trondheim.

Ulvan, L. J. (2016). Landbasert oppdrett av rognkjeks, det er lett det? Rensefiskkonferansen 2016, Gardermoen 8.-9. februar.

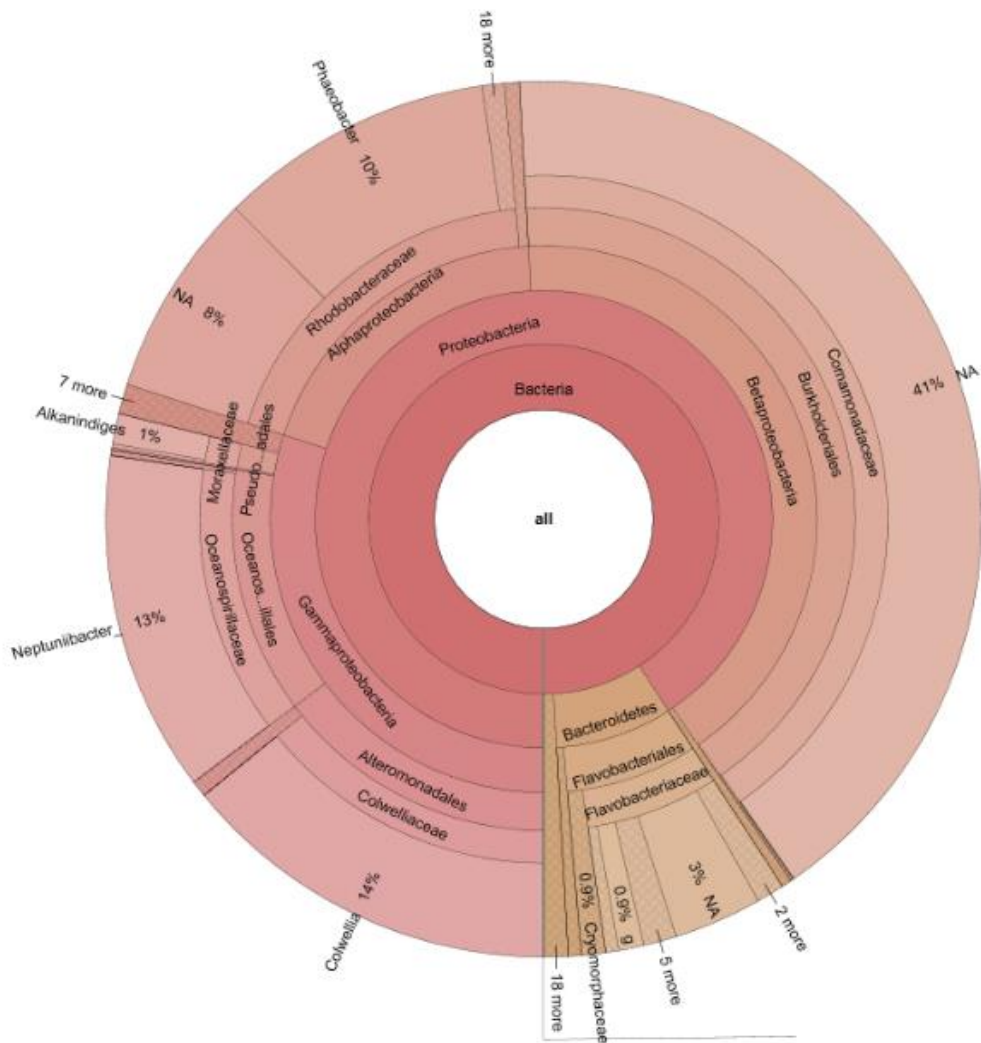
Vadstein, O., Øie, G., Olsen, Y., Salvesen, I., Skjermo, J., Skjåk-Bræk, G., 1993. A strategy to obtain microbial control during larval development of marine fish. In: Reinertsen, H., Dahle, L.A., Jørgensen, L., Tvinnereim, K. (Eds.), Proceedings of the First International Conference on Fish Farming Technology, Trondheim, Norway, 9–12 August 1993. Balkema, Rotterdam, pp. 69–75.

Øie et al., (2015). Effect of cultivated copepods (*Acartia tonsa*) in first feeding of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and ballan wrasse (*Labrus bergylta*) larvae. *Aquaculture nutrition*, DOI: 10.1111/anu.12352.

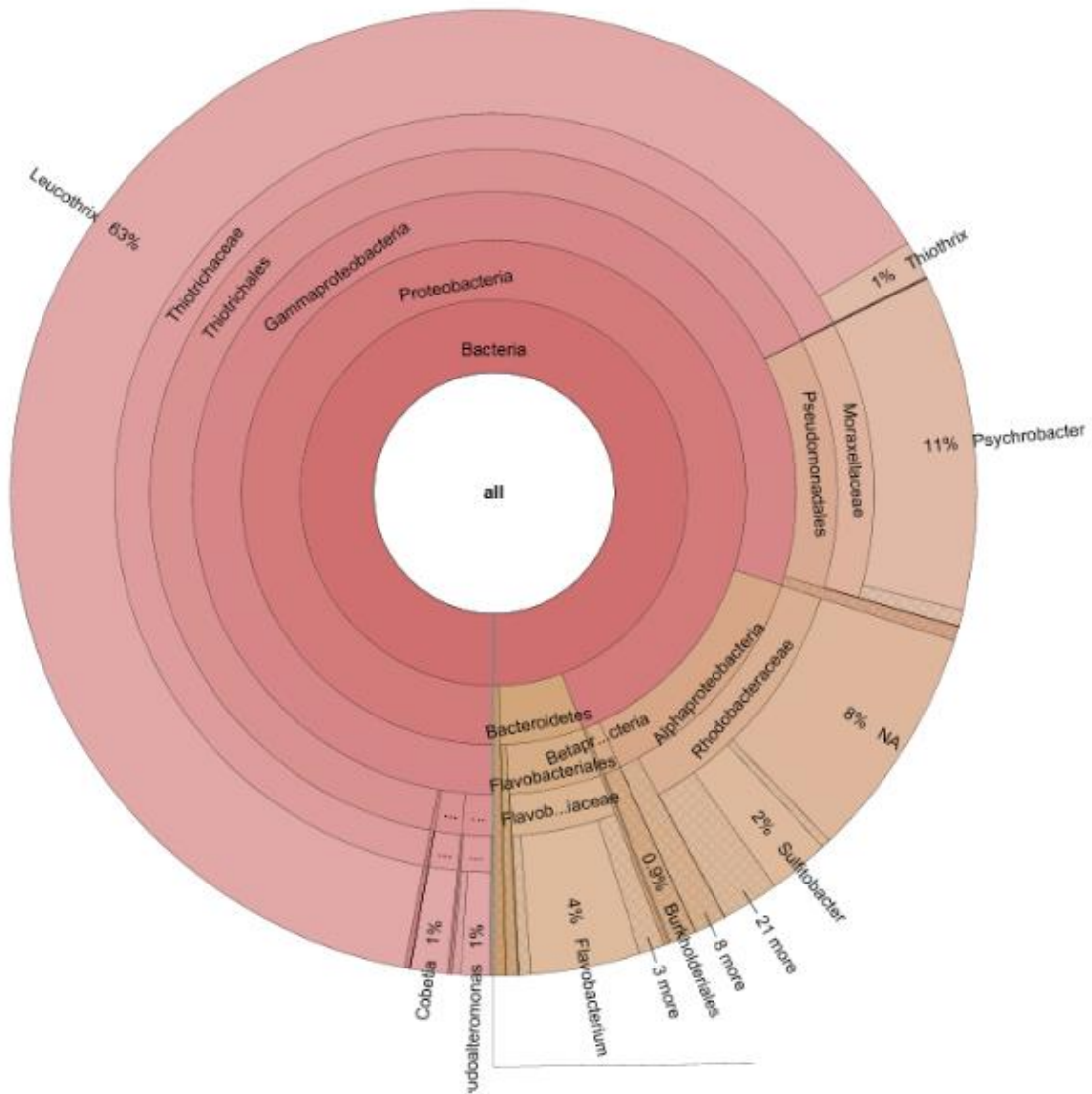
6 Appendix 1: Kronadiagrammer for bakteriesammensetning.



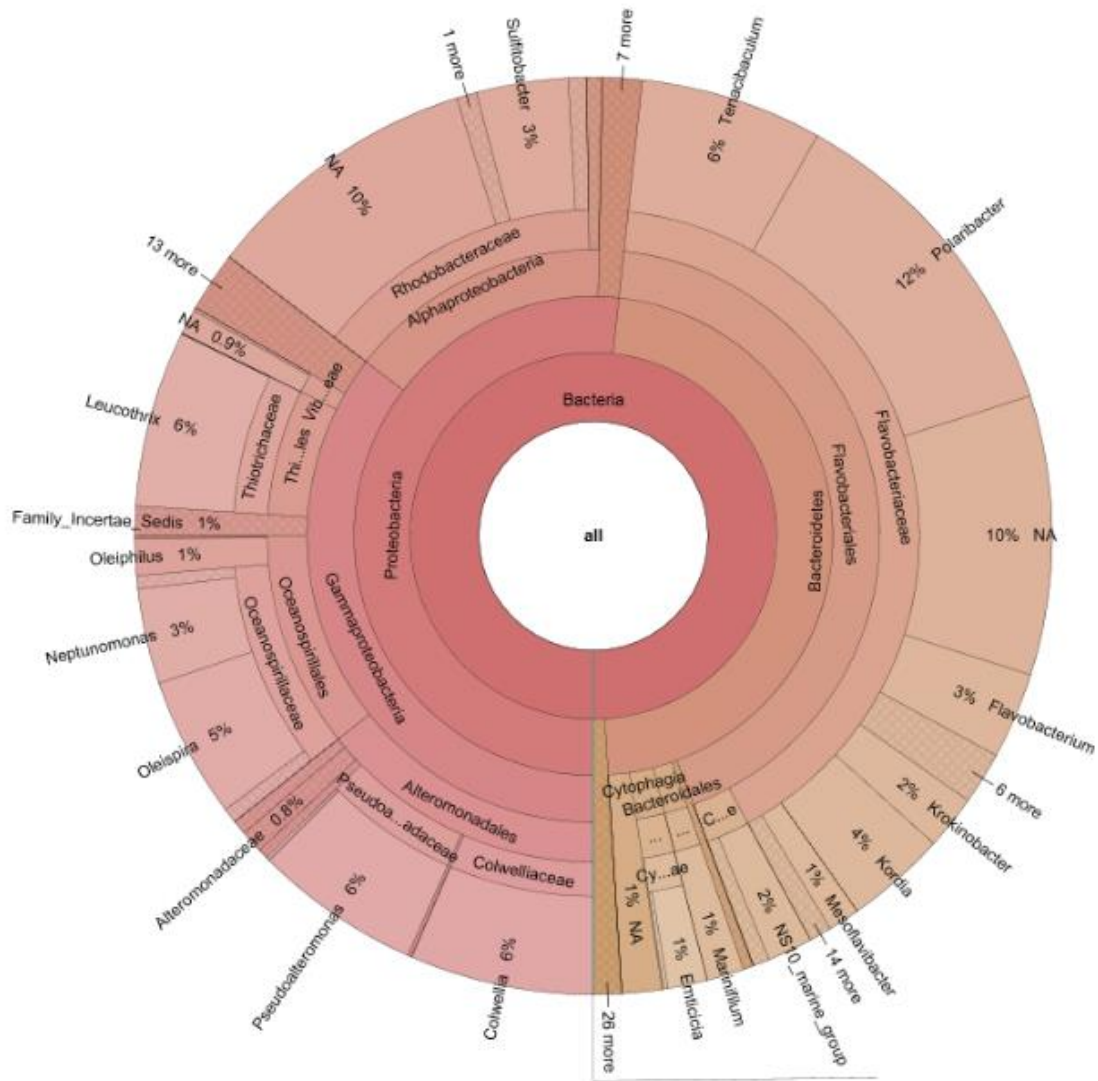
Figur A: Bakteriesammensetning på artsnivå i vann dag 13 i tank 12 med copepoder.



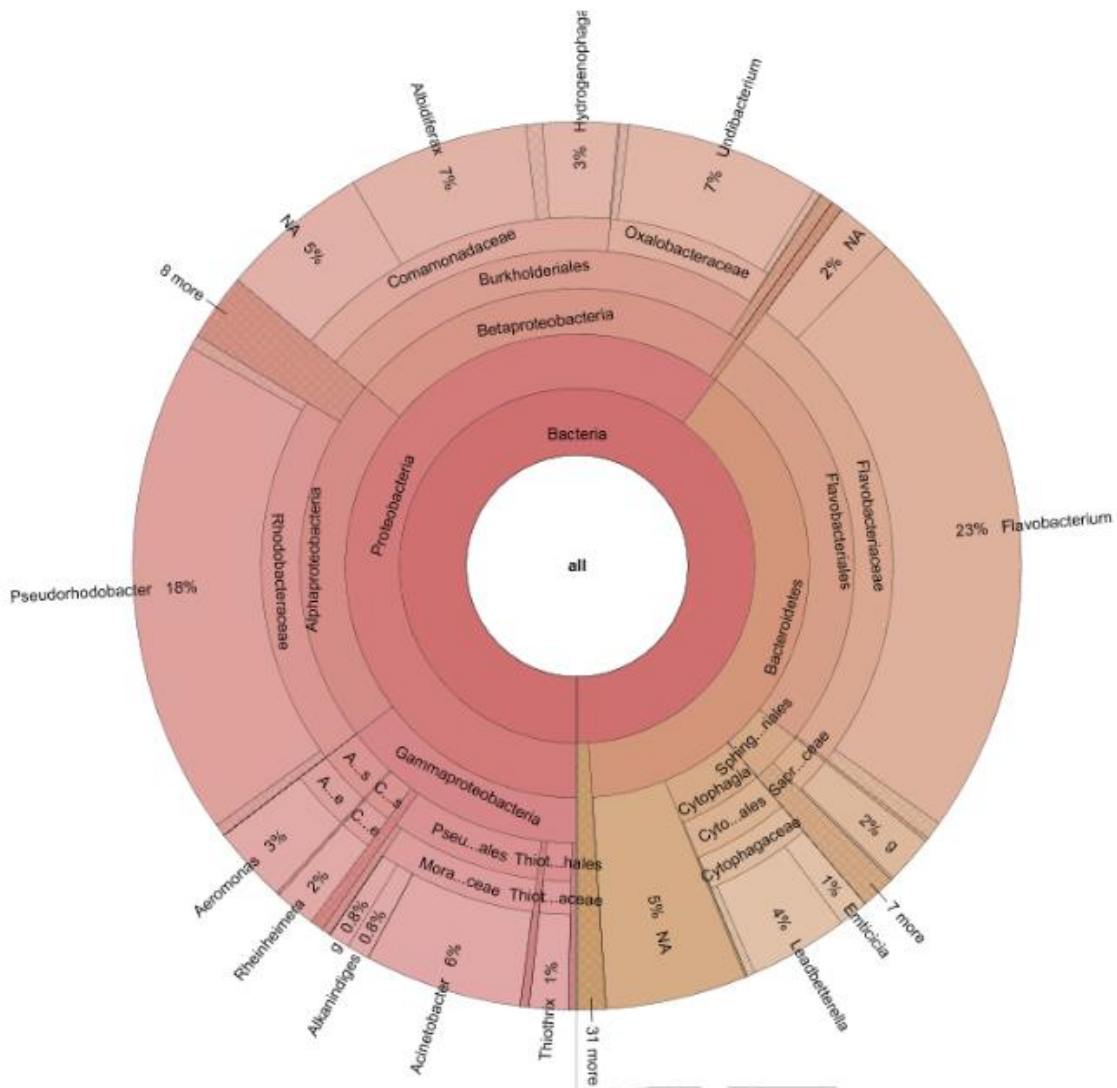
Figur B: Bakteriesammensetning på artsnivå i vann dag 9 i tank 12 med copepoder.



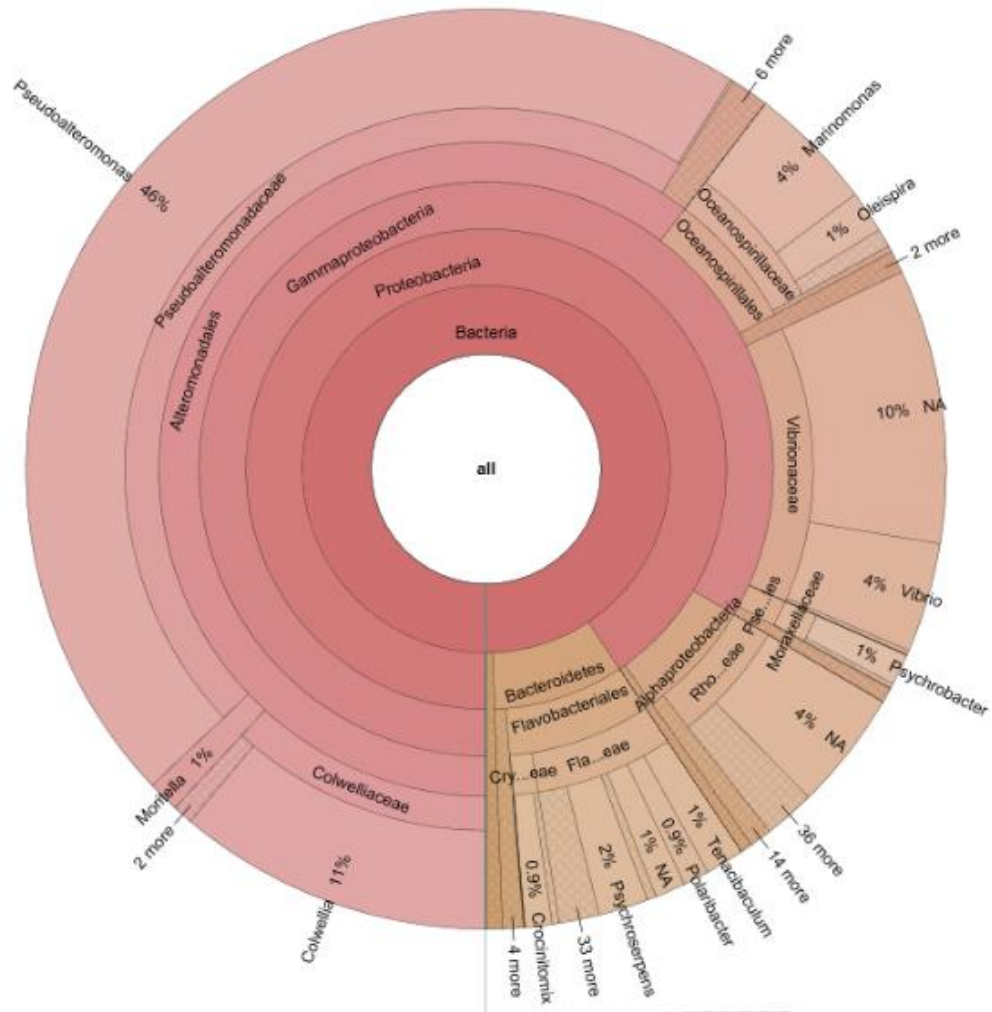
Figur C: Bakteriesammensetning på artsnivå i vann dag 9 i tank 15 med copepoder.



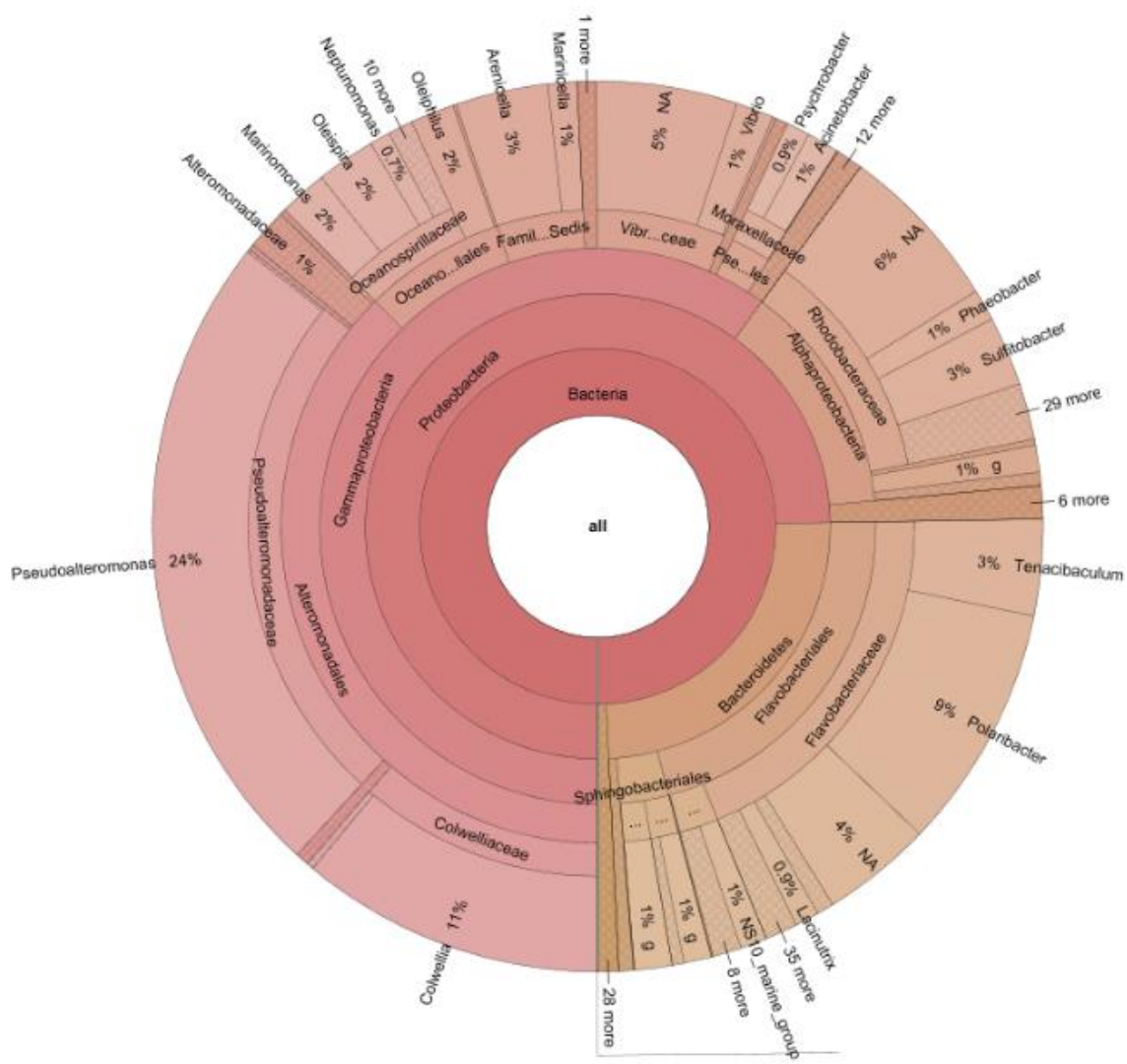
Figur E: Bakteriesammensetning på artsnivå i biofilm dag 9 i copepodebehandlingen.



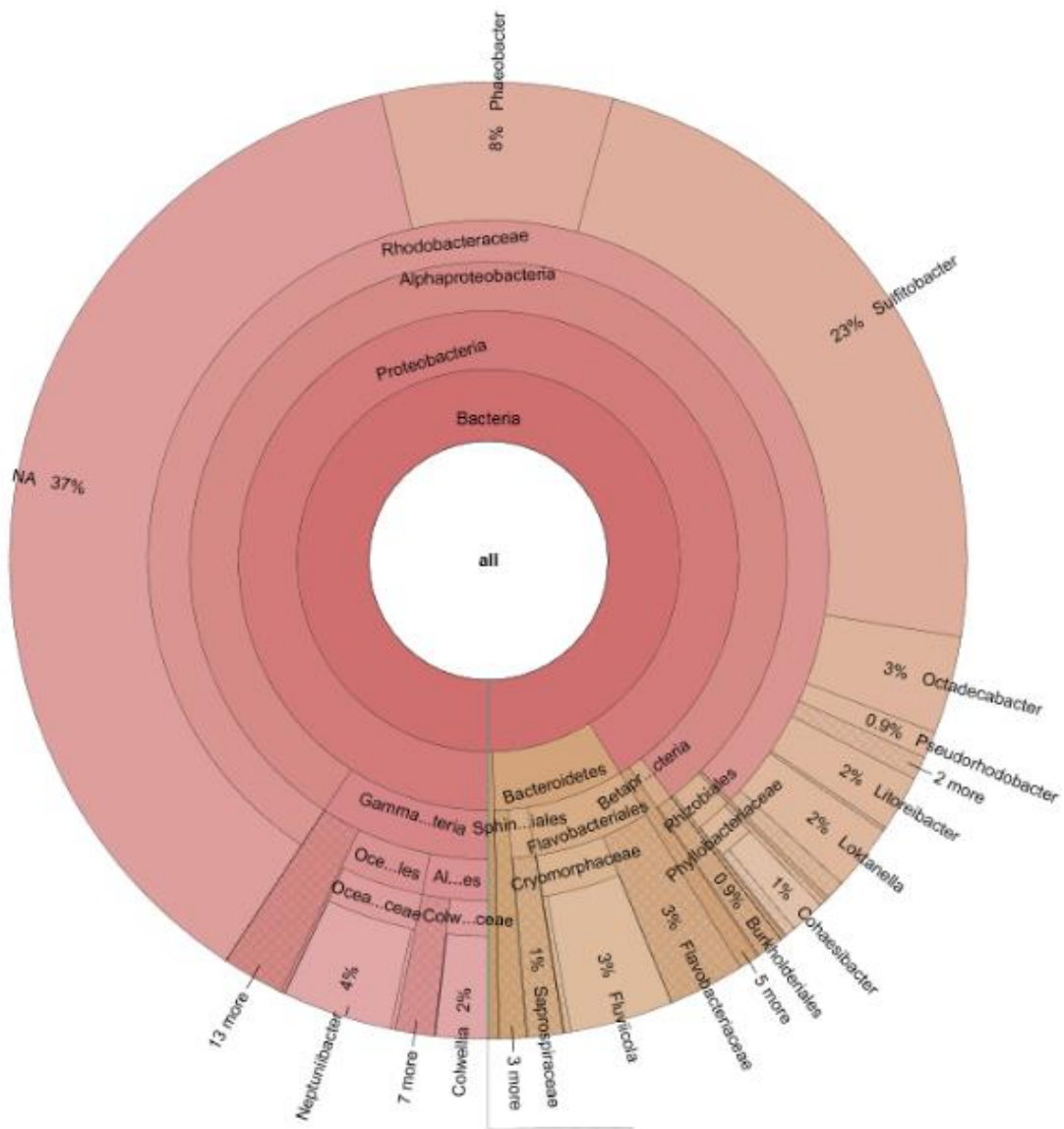
Figur F: Bakteriesammensetning på artsnivå i vann dag 13 i tank 13 med tørrfôr.



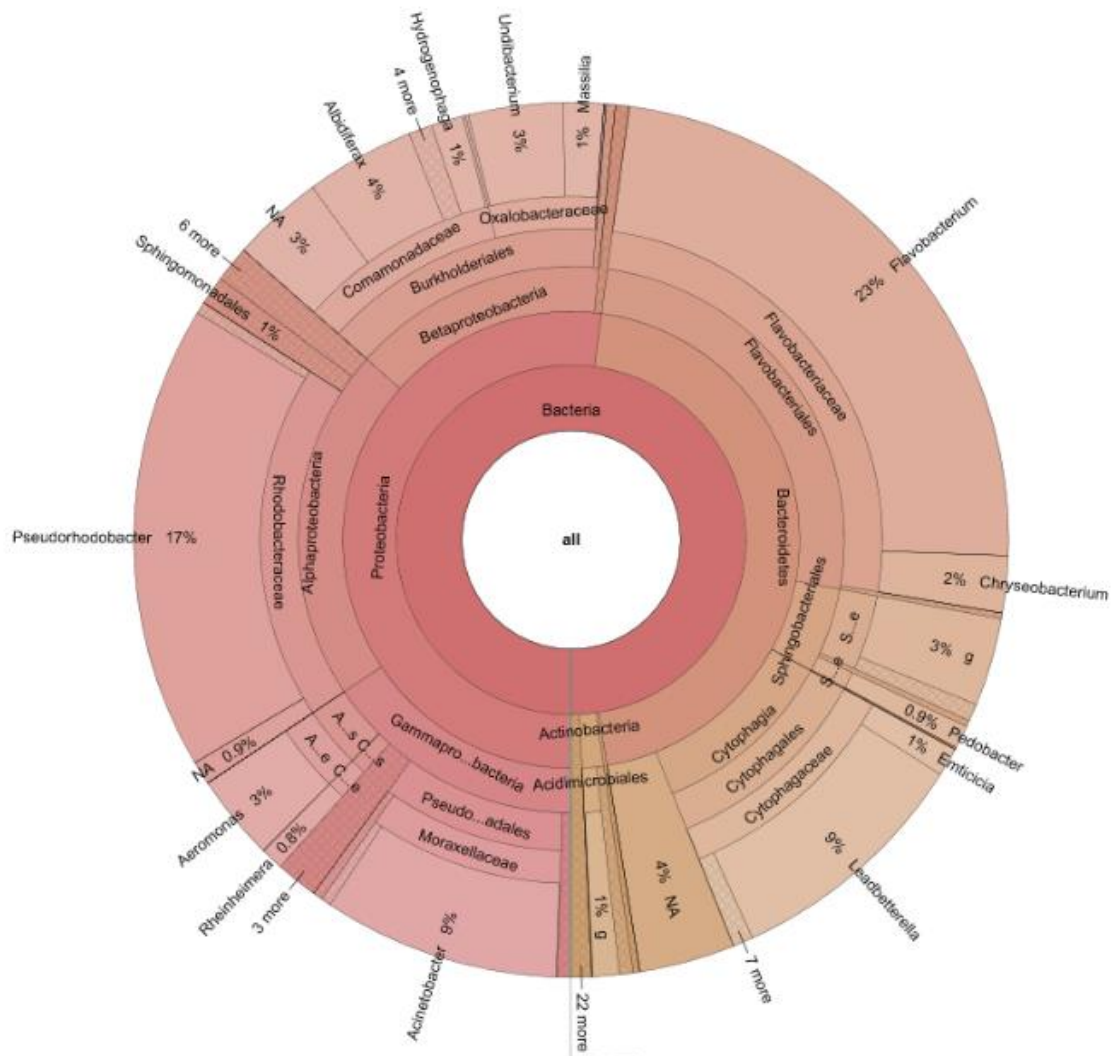
Figur I: Bakteriesammensetning på artsnivå i vann dag 9 i tank 14 med tørrfôr.



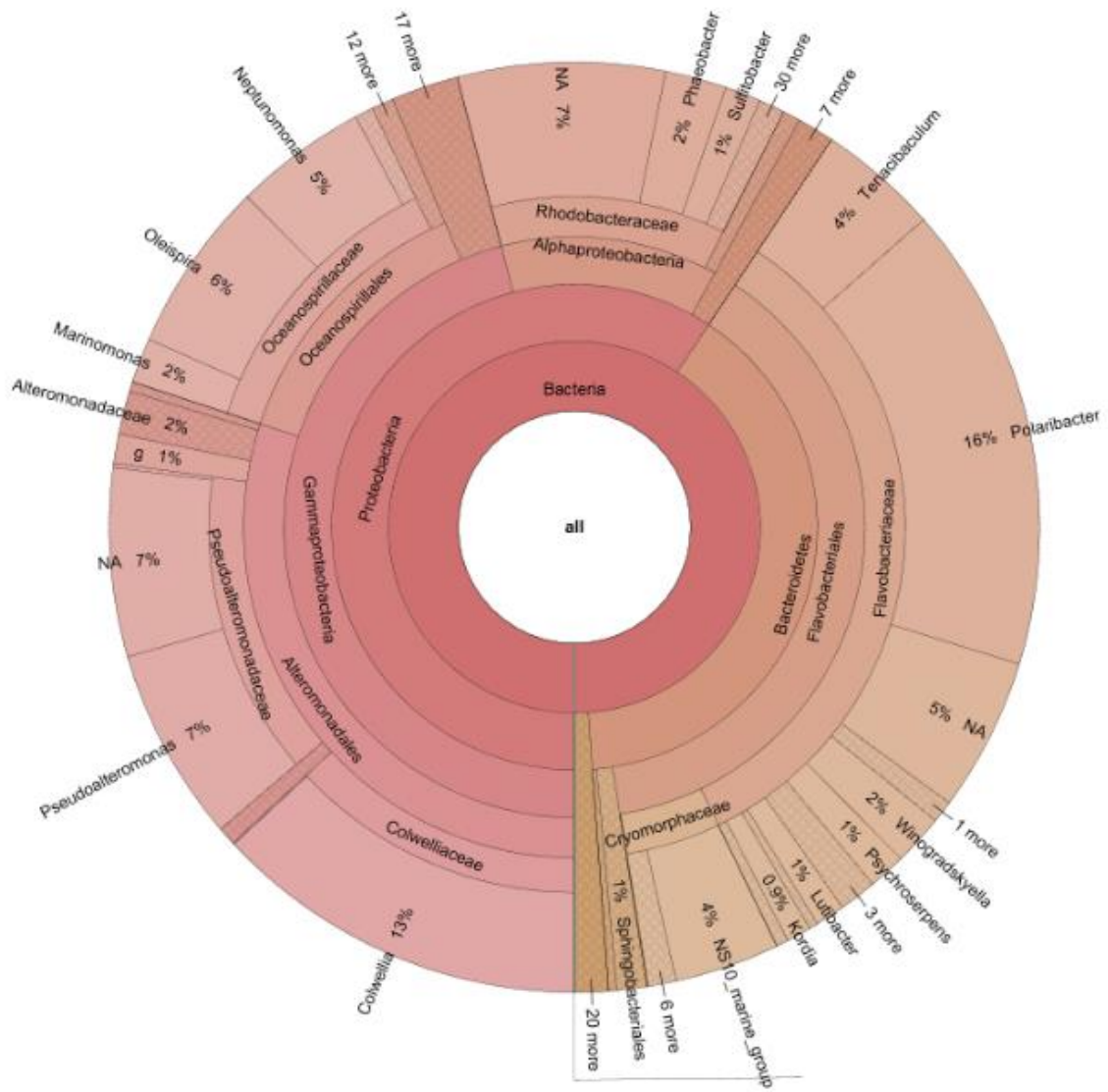
Figur J: Bakteriesammensetning på artsnivå i vann dag 13 i tank 17 med tørrfôr.



Figur L: Bakteriesammensetning på artsnivå i biofilm dag 13 i tørrförbehandlingen.



Figur M: Bakteriesammensetning på artsnivå i biofilm dag 9 i tørrførbehandlingen.



Figur N: Bakteriesammensetning på artsnivå i biofilm dag 2 før fôring.



Teknologi for et bedre samfunn

www.sintef.no