

Identifikation og forebyggelse af sygdom ved produktion af yngel af europæisk østers

Projektrapport

Marts 2008

DTU-AQUA
Dansk Skaldyrcenter
Venø Fish Farm

Finansieret af Den Europæiske Unions Fiskerisektorprogram FIUF og Fødevareministeriet

INDHOLDSFORTEGNELSE

FORMÅL	3
BAGGRUNDEN FOR PROJEKTET	3
PROJEKTETS STRUKTUR.....	3
ARBEJDSPAKKE 1 - SAMMENLIGNING AF MIKROFLORA (BAKTERIER OG VIRUS) I HHV. INTENSIVT OG EKSTENSIVT OPDRÆT	4
ARBEJDSPAKKE 2 – EFFEKT AF MODIFICEREDE DRIFTSRUTINER	5
FORSØGSANLÆGGET	5
RESUMÉ OG DISKUSSION AF PROJEKTETS RESULTATER.....	6
SAMMENLIGNING AF DE EKSTENSIVE OG DE INTENSIVE OPDRÆTSMETODER	9
FODERINTENSITETFORSØGENE.....	11
VANDSKIFTEFREKVENSFORSØGENE.....	12
VANDTYPEFORSØGET	14
KEMOSTATFORSØGET	14
SALINITETFORSØGET	15
STERILITETFORSØGET	16
BAKTERIOLOGISK UNDERSØGELSE AF LARVER FRA FORSØG MED STOR FORSKEL I DØDELIGHED	17
DE VIRULOGISKE UNDERSØGELSER.....	18
KONKLUSION.....	19
REFERENCER.....	20
APPENDIX 2 (SAMMENLIGNING AF EKSTENSIVE OG INTENSIVE OPDRÆTSMETODER).....	32
APPENDIX 3 (FODERINTENSITET).....	37
APPENDIX 4 (VANDSKIFTE).....	39
FORSØG 1.....	39
FORSØG 2.....	41
FORSØG 3.....	42
FORSØG 4.....	43
APPENDIX 5 (FORSØG MED FORSKELLIG VANDBEHANDLING).....	44
APPENDIX 6 (KEMOSTATFORSØG)	46
APPENDIX 7 (SALINITETFORSØG)	48
APPENDIX 8 (STERILITETFORSØG).....	51

FORMÅL

Projektets mål var følgende:

- At fastslå hvorvidt den høje observerede dødelighed ved opdræt af østersyngel i Danmark skyldes sygdom forårsaget af hhv. bakterier eller virus
- I givet fald at identificere de sygdomsfremkaldende organismer og -
- At udvikle tiltag til løsning af problemet

BAGGRUNDEN FOR PROJEKTET

Den nationale satsning på skaldyr, manifesteret ved gennemførelse af projekt Skaldyropdræt i Limfjorden (1999-2001), og den efterfølgende etablering af Dansk Skaldyrcenter (DSC) i 2002, har virkelig formået at sætte skaldyr på dagsordenen i Danmark.

Der er siden 1999 givet tilladelse til opdræt af skaldyr i et stort antal områder i Limfjorden, og der er i dag et tocifret antal aktive opdrættere. Der er i over halvdelen af områderne søgt om tilladelse til opdræt af østers. Siden 1999 er der herudover etableret 3 østers-renserier omkring Limfjorden, hvor der før kun var ét mindre nationalt renseri lokaliseret på Fyn.

Det nuværende intensive østersfiskeri med historisk maksimale landinger på 872 tons i 2003 har medført stor efterspørgsel efter østers fra opdræt – et opdræt som i sagens natur må starte med produktion af østersyngel. Denne produktion har fra begyndelsen været et kerneområde for Dansk Skaldyrcenter og der er bevidst satset på produktion af østersyngel vha. en intensiv produktionsform, hvor der i høj grad er kontrol med alle centrale parametre. Den observerede overlevelse har dog været meget lav (under 0,5 %) og udbyttet derfor helt utilstrækkeligt.

Et af de nyopførte østersrenserier er beliggende ved Venø Fish Farm A/S (VFF). Eksport af fiskede østers fra Limfjorden var et betydeligt aktiv for VFF, hvis kerneområde var opdræt af fiskeyngel ved ekstensive metoder. I 2004 lykkedes det Venø Fish Farm at producere 2-5 millioner stk. østersyngel efter ekstensive principper. På trods af det tilfredsstillende udbytte, er der dog også her tale om en lav overlevelse af østerslarver (2 %). Produktionsanlæggene er blot så store, at det er muligt at kompensere for den lave overlevelse ved at tilføre tilstrækkelige mængder larver til systemet.

Udenlandske studier af yngel af europæisk østers opgiver typiske overlevelser på 40% og nævner i enkelte tilfælde endnu højere overlevelser (Helm 2004). Årsagen til de lave danske overlevelser kendes endnu ikke, men der blev i forbindelse med østersprojekt fase 2 ved DSC gennemført en omfattende analyse af ernæringsmæssige forhold med fokus på lipider. Der blev ikke fundet tegn på ernæringsmæssige problemer i produktionen. Det er derfor sandsynligt at årsagen til problemet er sygdom (Tørring & Steinfeldt, 2005).

PROJEKTETS STRUKTUR

Projektet blev opdelt i 2 elementer; kaldet arbejdsplaner. Arbejdsplan 1 havde titlen ”Sammenligning af mikroflora (bakterier og virus) i intensivt og ekstensivt opdræt” og arbejdsplan 2 havde titlen ”Effekt af modificerede driftsrutiner”

Arbejdsplan 1 havde til formål at drage nytte af den produktionssucces der blev konstateret på Venø Fish Farm året i 2005. Eksperimenterne skulle gennemføres ved at et hold nyklækkede larver med samme ophav og baggrund; blev opdelt i 2 portioner. Den ene portion skulle opdrættes på Venø Fish Farm vha. deres ekstensive opdrætsmetode, og den anden portion skulle opdrættes ved Dansk Skaldyrcenter vha. deres intensive opdrætsmetode.

En forskel i overlevelsen mellem de to portioner larver måtte være forårsaget af produktionsmetoderne og ikke yngelens baggrund, som jo var identisk. Bakteriologiske og virulogiske analyser af larverne skulle gennemføres og eventuelt kaste lys over de konstaterede forskelle. Efterfølgende kunne disse danne grundlag for en identifikation af sygdomsfremkaldende bakterier eller vira.

Arbejdsplan 2 havde til formål at kaste lys over mekanismerne bag den høje dødelighed i det intensive opdræt. Dette skulle i praksis gennemføres ved at en række produktionsforløb blev gennemført, hvor kun enkelte veldefinerede parametre blev varieret. For at dette kunne gennemføres var det nødvendigt at gennemføre forsøgene i en eksperimentel forsøgsfacilitet med mange ens produktionsenheder (tanke). Det egentlige produktionsanlæg ved DSC blev derfor fravalgt, idet der ikke ville være mulighed for gennemførelse af forsøg med tilstrækkeligt antal replikater til sikre at resultaterne blev valide.

Forsøgene blev gennemført i en eksperimentel facilitet bestående af 12 stk. 5 liters lukkede enheder (flasker).

Enhederne blev beluftet gennem 0,2 µm sterilfiltre, og der var derfor ikke kontakt mellem forsøgsflaskerne og omgivelserne. Kun når der blev skiftet vand, blev lågene fjernet og kulturvandet indeholdende larverne blev hældt gennem et filter for at tilbageholde larverne, før disse blev ført tilbage til rent kulturvand.

ARBEJDSPLAN 1 - SAMMENLIGNING AF MIKROFLORA (BAKTERIER OG VIRUS) I HHV. INTENSIVT OG EKSTENSIVT OPDRÆT

Der blev gennemført opdræt ved hhv. den ekstensive (VFF) og den intensive (DSC) metode af østerslarver fra samme batch. Der gennemføres prøvetagningsprogram under larvefasen for identifikation samt kvantificering af hhv. patogene bakterier og virus på de to lokaliteter.

Forsøgene blev indledt ved at 150 stk. moder østers blev fisket i Nissum Bredning og overført til en klækkefacilitet ved VFF.

Larver blev opsamlet dagligt. Der blev gennemført daglig tælling af antal larver.

En portion bestående af ca. 10.000 larver blev overført til DSC's opdrætsfaciliteter, og de resterende ca. 50.000.000 larver blev bibeholdt i VFF's produktionsfaciliteter efter det traditionelle VFF-system.

Under larvefasen blev der gennemført prøvetagninger for virus og bakterier.

Forsøget blev påbegyndt d. 14. juni 2005. Der blev dog først overført larver til DSC d. 15. juni.

Ved VFF gennemførtes produktionsforløbet ved at en dam gradvist blev fyldt med havvand. Der tilstræbtes en høj planteplanktonproduktion samt en høj planteplanktonbiomasse. Etablering af et græsningstryk fra zooplankton sikrede regenerering af næringsstoffer, således at

biomassefluktuationer mindskedes. Produktionsforløbet gennemførtes uden mulighed for betydelig justering af konditionerne.

Ved DSC anvendtes tanke á 400 liter. Det anvendte havvand blev filtreret til 0,45 my og der anvendtes mikroalger af arterne *Chaetoceros*, *Isochrysis* og *Tetraselmis* i forholdet 83:33:3,3 baseret på antal. Algesammensætningen opnåedes ved at opblande alger fra den intensive algeproduktion efter kvantificering på partikeltæller.

I begge systemer blev der taget prøver med henblik på estimering af vækst og overlevelse. Yderligere blev der indsamlet prøver til diagnosticering af årsager til mortalitet forårsaget af virus eller bakterier.

ARBEJDSPAKKE 2 – EFFEKT AF MODIFICEREDE DRIFTSRUTINER

En række simple tiltag afprøvedes i eksperimentel skala med henblik på at belyse mulige smitteveje og teste potentielle tiltag til løsning af problemerne.

Det var hensigten at analysere nedenstående faktorerens betydning for overlevelsen med fokus på sygdomsfremmende årsager:

1. Anvendelse af antibiotika
2. Koncentrationen af larver i kulturen
3. Fødetæthed
4. Flowrate ved kontinuerligt vandskifte
5. Frekvens af vandskifte ved batchkulturteknik
6. Gennemførelse af challengetests med de i arbejdsplanen 1 identificerede potentielle sygdomsfremkaldende bakterier

Punkterne 1, 2 og 6 blev efterfølgende ikke eksperimentelt gennemført til fordel for en mere intensiveret pøvetagning i forbindelse med gennemførelse af punkterne 3, 4 og 5.

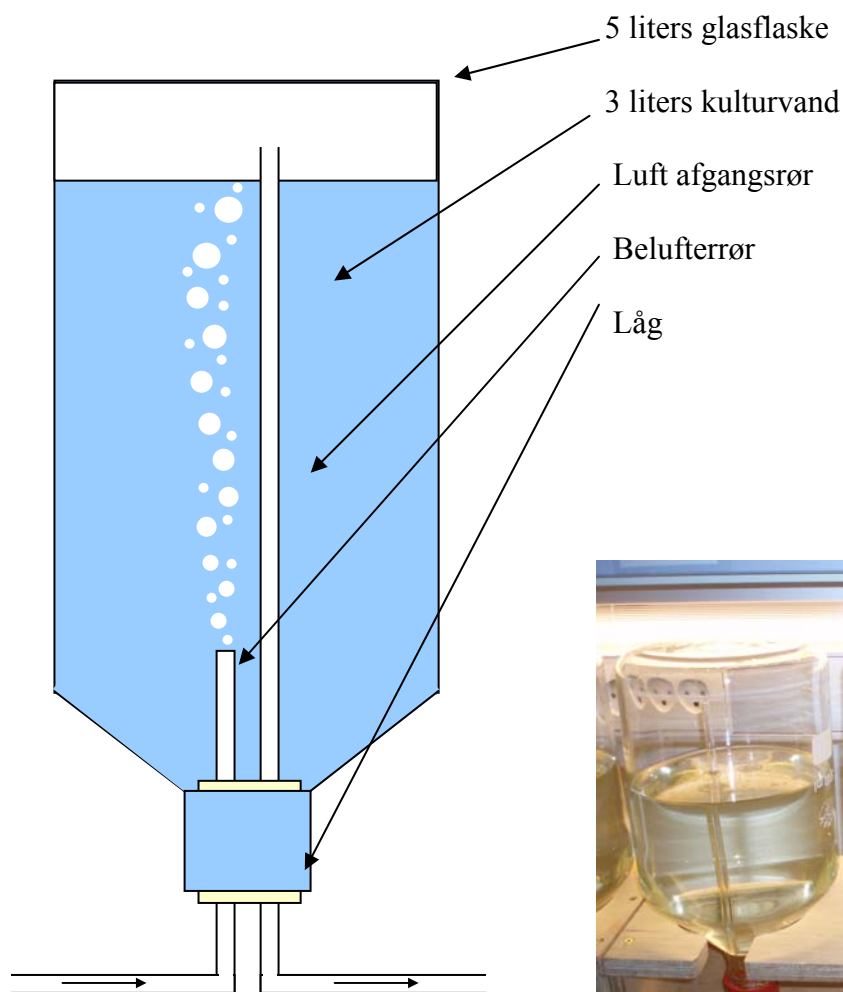
En smittevej formodedes at være østerslarvers fødeindtagsmekanisme. Østerslarver filtrerede uselektivt partikler inden for et givet størrelsesspektrum fra vandet. Østerslarver vil derfor kunne æde fækalier fra andre larver, hvilket udgør en oplagt smittevej. Tætheden af larver ville være afgørende for mængden af dette optag og netop den intensive metodes anvendelse af meget høje tætheder af larver maksimerer risikoen for en sådan smitte fra larve til larve.

Der blev gennemført en række forsøg hvor effekten af vandskiftfrekvens blev undersøgt.

Forsøgsanlægget

Den overordnede hensigt med arbejdsplanen var at identificere effekter af ændringer i driftsrutinerne. For at kunne kvantificere disse effekter blev det besluttet at gennemføre forsøgene i mindre skala og i stedet øge antallet af replikater for at sikre opnåelse af valide konklusioner.

Forsøgsanlægget bestod af 12 stk. 5 liters glasflasker. Disse blev stillet med åbningen nedad, således at de fungerede som cylindrisk koniske kar. Lågene til flaskerne blev perforeret, således at der kunne føres 2 glasrør gennem disse. Det ene glasrør blev ført op over vandoverfladen i flasken og det andet blev kun lige ført gennem proppen således at beluftningspunktet i beholderen blev så lavt som muligt (Figur 1).



Figur 1a. Illustration af de forseglede dyrkningsenheder, som blev anvendt i arbejdsplanen to. 1b 3 dyrkningsenheder som de blev anvendt under forsøgene

RESUMÉ OG DISKUSSION AF PROJEKTETS RESULTATER

Det er velkendt at opdræt af skaldyr kan være forbundet med betydelige tab i form af mortalitet forårsaget af sygdom. Det er derfor af central betydning for et sådant opdræt, at der tages de fornødne skridt til at reducere introduktionen af patogener til opdrætssystemerne, samt at der under opdrættet kontinuerligt sikres at mulige patogeneres mulighed for opformering minimeres. Pathogenerne findes i havmiljøet og er derfor vanskelige helt at undgå. Introduktionen af patogener til systemet kan ske på mange måder (Elston 1999). (Figur 2). Havvandet som tilføres forsøgsanlægget (400 liter tankene) er en oplagt kilde til introduktion af patogener. På DSC anvendes havvand som pumpes fra en vandindtagsledning placeret øst for

anlægget. Vandet passerer et sandfilter for frafiltrering af større partikler. Et sådant filter tilbageholder ikke fritsvømmende bakterier og kan fungere som medie for bakterievækst, og er derfor på ingen måde en garanti for pathogenfrit vand. Vandet passerer efterfølgende en dybdefilterstation med en sekvens af mikrofiltre afsluttende med 0,2 µm. Dette forhindrer at der kan overføres patogener via opdrætsvandet.

Bakteriers reproduktionsrate er så høj at der ikke kan kompenseres for deres tilvækst ved hjælp af vandudskiftning. Bakterier har typiske fordoblingshastigheder på halve timer og en kompensation for dette ville kræve udskiftning af kulturvandvolumet omkring 3 gange i timen. Dette vil være forbundet med betydelige praktiske problemer, idet østerslarverne ved så høje flowhastigheder vil blive fanget på udløbsfilteret uden mulighed for at komme derfra igen. Et andet betydeligt problem vil blive den høje udvaskningsrate af mikroalger ved så højt vandskifte. Østerslarvekulturer fodres typisk med under 5 volumenprocent alger. Hæves vandudskiftningen til eksempelvis 50 gange i døgnet vil volumenprocenten stige til 250%, hvilket vil påføre produktionen en betydelig økonomisk byrde. Opretholdelse af en konstant temperatur i kultursystemet vil ligeledes blive fordyret.

I praksis tjener vandudskiftningen som bakteriehæmmende mekanisme derfor et andet formål.

Bakteriernes vækst er begrænset af de næringsstoffer der er til rådighed i dyrkningstankene.

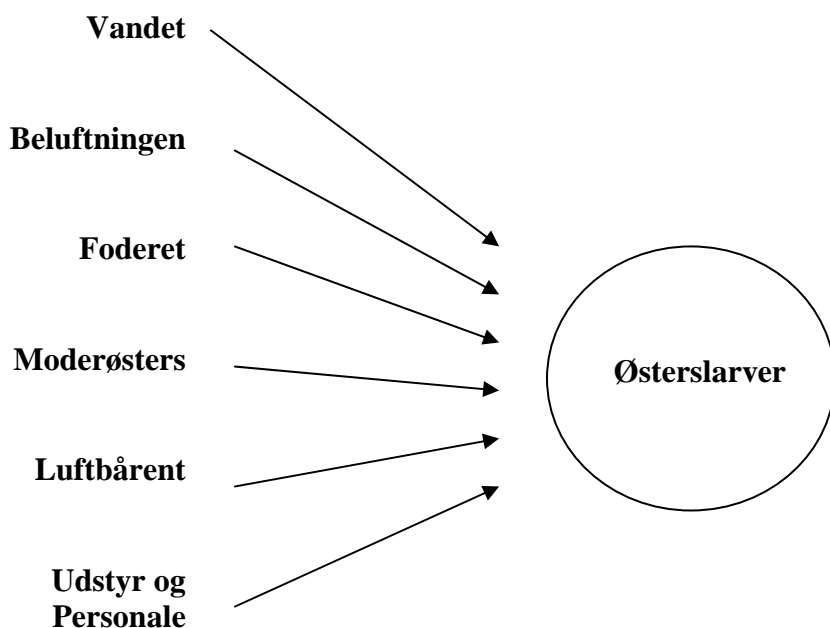
Næringsstofferne i kulturvandet kommer fra østerslarvernes metabolisme samt som lækgede affaldsstoffer fra nedbrydning af overskydende mikroalger. Disse affaldsstoffer kan reduceres mærkbart vha. opretholdelse af et vandskifte på bare 1 kulturvolumen pr. dag.

Vandudskiftningen kan enten foregå kontinuerligt og vil herved reducere timeforbruget forbundet med opdrættet. Alternative og mere traditionelle metoder indebærer at kulturtankene tømmes og østerslarverne tilbageholdes på filtre. Larvernes skaller hindrer at de påføres fysiske skader ved denne behandling. Metoden er fordyrende mht. tidsforbrug, men indebærer at kulturtankene kan rengøres og desinficeres før larverne atter føres tilbage i tankene i 100% friskt vand. Det er desuden muligt at størrelsessortere larverne på planktonduge og herved frasortere de dårligst voksende larver.

Beluftningen, som anvendes i tankene er en lignende oplagt smittekilde. Luften filtreres gennem 0,2 µm i de små 5 liter forsøgsenheder, alternativt gennem 0,45 µm filtre i 400 liter tankene.

Filtreringen af luften udelukker således smitte ad denne vej.

Foderet som østerslarverne fodres med er mikroalger af slægterne Isochrysis, Tetraselmis og Chatoceros. Algeproduktionsanlægget kan fungere som bakterielle opformeringsenheder og patogener kan derved overføres til larveanlægget når larverne fodres. Mikroalger har dog også en antibakteriel virkning. Denne virkning er dels indirekte og fungerer ved at algerne optager næring fra vandet og oplagrer det bag cellemembranen og derved gør det uanvendeligt for bakterier i systemet. Udskillelse af antibakterielle stoffer til vandet kan være en anden mekanisme som reducerer bakterievæksten i miljøet omkring algerne.



Figur 2.

Illustration af mulige smitteveje for pathogene organismer i et intensivt larveproduktionsanlæg

Der blev ikke gennemført analyser af bakterie-kimtallene i algekulturerne. Det blev skønnet nødvendigt først at identificere de pathogene bakterier og derefter identificere deres vej ind i systemet.

Luftbårne smitteveje kan ikke undgås i åbne systemer. Intensive produktionssystemer som det ved DSC er lokaliseret indendørs og vil derfor til en vis grad være skærmet af fra omgivelserne. Forsøgene i arbejdsplanen to blev gennemført i forseglede 10 liters enheder. Der var således ikke adgang til omgivelserne under dyrkningen og luftbåren smitte var således udelukket. Under vandskifte blev forseglingen ikke opretholdt og der kan være blevet introduceret smitte i forbindelse hermed.

Overførelse af patogener fra moderøsters er en oplagt mulighed. Østers reproducerer sig ved at æggene frigives af hunnen til det ekshalante siphoneringskammer. Herfra passerer æggene gennem gællerne over i det inhalante kammer hvor de befrugtes. Efterfølgende klækker larverne og de forbliver i moderøstersens inhalante kammer ovenpå gællerne i 6 til 7 dage, hvorefter de frigives til vandet som veligerlarver. Opholdet på gællerne giver eventuelle østersassocierede bakterier mulighed for at kontaminere veligerlarverne. Efter frigivelse af larverne kan bakterierne opformeres på larven og forårsage mortalitet.

I det oprindelige ansøgte projekt var inkluderet en arbejdsplan som havde til formål at søge at udvikle en mulighed for desinfektion af æggene før klækning vha. metoder som anvendes til desinfektion af fiskeæg i opdræt. Anvendelse af f.eks. glutaraldehyd eller ozon har vist sig effektive til eliminering af overfladeassocierede bakterier på fiskeæg.

Metoden kræver at æggene fjernes fra moderøstersene før de klækker. Dette indebærer at æggene skal fjernes fra moderøsters inden for få timer efter at de er frigivet. Da det ikke er muligt at se på en moderøsters om den har frigivet æg er det vanskeligt at få fat på æggene på det rigtige tidspunkt. Det har derfor i nærværende projekt ikke været forsøgt at desinficere æg af østers.

Der er ikke gennemført studier af anvendelse af hjælpestoffer til bekæmpelse af bakterier i larvekulturerne. Når tankene tømmes for vand og larverne tilbageholdes på en planktondug ville det være hurtigt og effektivt at desinficere skallerne på ydersiden. Det har dog vist sig at selv få sekunders immersion i ferskvand dræber larverne. Derfor har yderligere anvendelse af hjælpestoffer ikke været forsøgt. Under afrapporteringen er en beskrivelse af en desinfektionsprocedure blevet kendt. Walne (1979) beskriver en desinfektionsprocedure hvor larver neddyppes i en hypokloritopløsning på 3 ppm. klor i 5 minutter. Dette viser, at det er muligt for larverne at lukke skallerne tæt nok til at desinfektion af skallernes yderside er muligt. Desinfektion ved bad i hjælpestoffer er ikke senere beskrevet i produktionsbeskrivelser som Utting & Spencer (1991); Helm & Bourne (2004), og Elston (1999).

Sådanne metoder til desinfektion burde have været undersøgt systematisk i projektet, men er desværre først blevet kendt på et tidspunkt hvor det eksperimentelle arbejde var afsluttet.

Anvendelser af antibiotika i kulturvandet kunne have bibragt projektet viden om tilstedeværelse af pathogene bakterier, men dette blev af projektgruppen skønnet som værende en u hensigtsmæssig fremgangsmåde.

Sammenligning af de ekstensive og de intensive opdrætsmetoder

I arbejdsplanen blev der gennemført et sammenlignende studie af produktionen af østerslarver på 2 lokaliteter. Larverne blev gydt på VFF og en pulje overført til DSC. De resterende larver blev udsat i en lagune ved VFF og opdrættet efter de dér praktiserede metoder.

Larverne blev gydt d. 14-17. juni 2006. Der blev overført larver til DSC den 16. juni. Larver blev udsat i Lagunen ved VFF allerede den 14. juni.

Det viste sig at prøvetagningen i lagunerne ved VFF var forbundet med betydelig usikkerhed idet antallet af larver der blev bestemt varierede stærkt fra dag til dag (Tabel 1). Herudover måtte det konstateres at overlevelsen af larverne var meget lav. Der kunne således efter den 28/7 (dag 14) ikke længere findes østerslarver i prøverne. Produktionen repræsenterede derfor ikke de succesrige produktioner af østersyngel, som har været gennemført ved VFF. Temperaturen i lagunen lå den første dag på 20,7 °C, men steg gennem forløbet til omkring 25 °C med højeste registrerede temperatur på 26.0 °C.

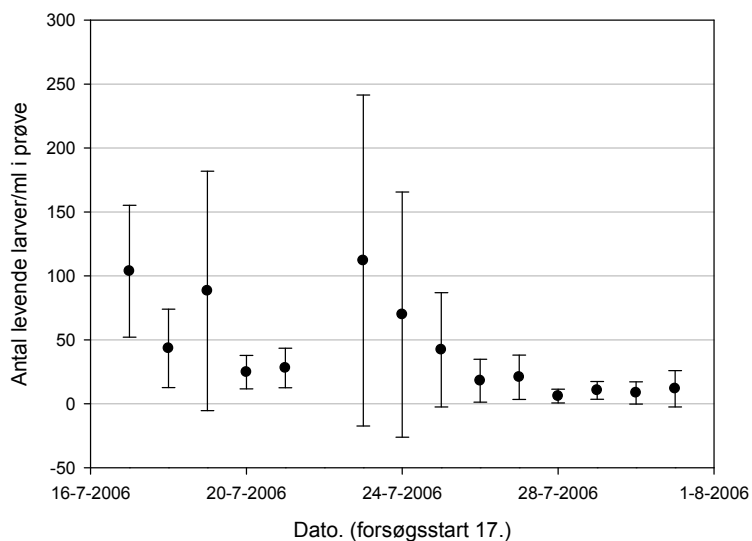
Tabel 1. Oversigt over produktionsforløbet ved Venø Fish Farm juli 2006.

Dato	Dag	Temp. °C	O ² %	pH	Mill. Larver
10/07/2006	-4	20.3	99		
11/07/2006	-3	19.6	91		
12/07/2006	-2	20.0	95		
13/07/2006	-1	19.9	93		
14/07/2006	0	20.7	115	8.01	6
15/07/2006	1	21.3	113	8.03	4
16/07/2006	2	23.7	113	8.03	
17/07/2006	3	24.1	111	8.05	6
18/07/2006	4	24.3	110	8.07	
19/07/2006	5	25.0	109	8.08	12
20/07/2006	6	26.0	112	8.23	
21/07/2006	7	25.3	104	8.26	
22/07/2006	8	23.8	101	8.30	7
23/07/2006	9	23.0	105	8.36	5
24/07/2006	10	23.0	107	8.38	12
25/07/2006	11	24.5	111	8.37	

26/07/2006	12	25.0	112	8.33	14
27/07/2006	13	25.7	118	8.35	
28/07/2006	14	25.7	117	8.20	5
29/07/2006	15	25.1	125	8.38	
30/07/2006	16	24.9	129	8.43	0
31/07/2006	17	25.1	130	8.43	0
01/08/2006	18	23.0	119	8.40	0
02/08/2006	19	22.8	117	8.38	0

Larverne ved DSC blev overført til 6 tanke, hver med et volumen på 400 liter, og dyrket ved den intensive metode. Der blev anvendt et lavt kontinuerligt vandskifte på 400 liter pr dag pr tank. Tankene blev hver anden eller tredje dag tømt og larverne tilbageholdt på planktonnet før de blev tilbageført i rengjorte tanke med friskt vand.

Resultaterne viste at produktionen repræsenterede et typisk forløb hvor der efter 2 uger kun var meget få larver tilbage. Der blev ikke registreret settling i tankene.



Figur 3. Larveoverlevelsen i arbejdsplanke 1 forsøget ved DSC. Datapunkterne er gennemsnit af antallet af larver i de 6 produktionstanke.

Der blev udtaget prøver af larver under larvefasen (larverne stammede fra samme batch men blev opdrættet hhv. ekstensivt (Venø) og intensivt (DSC)) for at identificere evt. patogene bakterier og virus på de to lokaliteter. Prøvetagningen blev foretaget to gange om ugen, de samme dage på de to lokaliteter.

Tabel 2. Eksempel på kimtalsbestemmelser ved hhv DSC (Hold 1-4) og VFF (Venø).

PRØVE 2 (060720-1)		Larveaktivitet	BA kimtal (x 10 ³ /ml)	MA kimtal (x 10 ³ /ml)	Optagne isolater	Vibrio arter
HOLD 3	2.V2		forurenset	5	MA:2	Vang
	2.2	bev.	1,7	8	BA:2 MA:2	Vang
HOLD 4	3.V2		0,57	6,3	BA:1 MA:2	Vang

	3.2	bev.	1,8	34	BA:1 MA:3	Vs
HOLD 2	4.V2		1	23	BA:1 MA:1	Vang
	4.2	bev.	0,47	10	BA:2 MA:1	Vang
HOLD 1	5.V2		4,5	21		
	5.2	færre bev.	1,8	18	BA:1 MA:3	Vang
VENØ	V.V2		14	54	BA:3 MA:2	
	V.2	Kun få larver	16	260	BA:3 MA:2	Valg

I undersøgelsen blev der observeret svingninger i kimtallene. Der var en tendens til at kimtallet lå omkring 10^3 /ml, når der var mange levende yngel i prøven. I modsætning hertil sås en kraftig stigning i kimtallene til 10^6 /ml, når hovedparten af ynglen var døde.

Forskellige *Vibrio* arter blev fundet i alle prøver, og der sås ingen tydelig dominant art igennem prøvetagningsperioden. Størstedelen af isolaterne kunne inddeles i tre grupper. *V. anguillarum*-lignende bakterier (Vang) og *V. splendidus*-lignende bakterier (Vs) blev isoleret gennem hele prøvetagningsperioden, mens *V. alginolyticus*-lignende bakterier (Valg) ikke blev isoleret den første uge men herefter gennem den resterende periode.

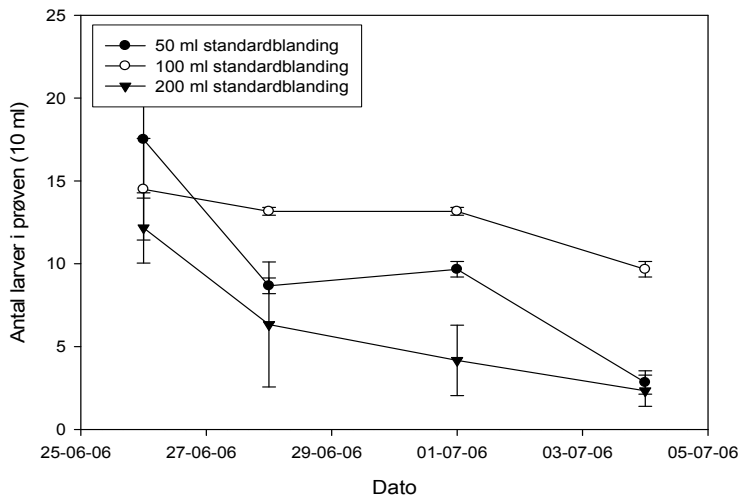
Foderintensitetsforsøgene

Foderintensiteten er afgørende for larvernes overlevelse. I intensivt opdræt af østerslarver opereres der med foderkoncentrationer som ligger flere størrelsesordener over de i naturen observerede. Anvendes der for lave foderintensiteter vil larvernes ingestion falde og deres energibehov vil ikke opfyldes. Dette indvirker negativt på væksten og medfører øget mortalitet. Da larverne dyrkes i batchkultur og derfor kun fodres hver tredje dag, er det ikke en konstant foderkoncentration der opretholdes i kulturenhederne. Er der mange larver til stede vil de græsse foderalgerne ned og efterfølgende sulte. Er der derimod for mange foderalger i vandet vil larverne ikke kunne ingestere de alger dens filterapparat fører hen til munden. Larven vil kompensere for dette ved udskillelse af pseudofaeces. Dette er ikke en optimal situation for larvens energiregnskab og megen pseudofaeces i vandet kan også meget vel tænkes at have en negativ indflydelse på vandkvaliteten.

Det er vist at østerslarver har en maksimal ingestion ved omkring 120.000 Isochrysis celler / ml. (Tørring 2001). Den standardfoderblanding som der refereres til i figur 4, er den foderblanding som anbefales af Utting 1991 til opdræt af østerslarver. Blandingen er i forsøget anvendt i 3 forskellige koncentrationer.

Resultaterne indikerer en bedre overlevelse af larverne som modtager den midterste mængde af foderblandingen. Denne effekt er kun markant for perioden mellem første og anden prøvetagning og bør verificeres i efterfølgende forsøg, med henblik på at fastslå om der er tale om en reproducerbar effekt af anvendelse af en specifik foderblanding. Der er i en svensk undersøgelse vist tilsvarende høje overlevelser for østerslarver som sulter i 7 dage. Foderintensiteten kan derfor næppe være den primære årsag til de observerede forskelle i overlevelse.

Forsøgets resultat er relativt entydigt, idet der i de to flasker som fik den midterste koncentration af mikroalger i vandet var de eneste to flasker hvor der efterfølgende blev observeret settlede larver i flasken. Det blev noteret at der var settlet omkring 150 larver på låget af disse 2 flasker og ingen i de andre flasker. Settlingen på låget kan finde sted fordi flaskerne står på hovedet og låget således er neddykket.

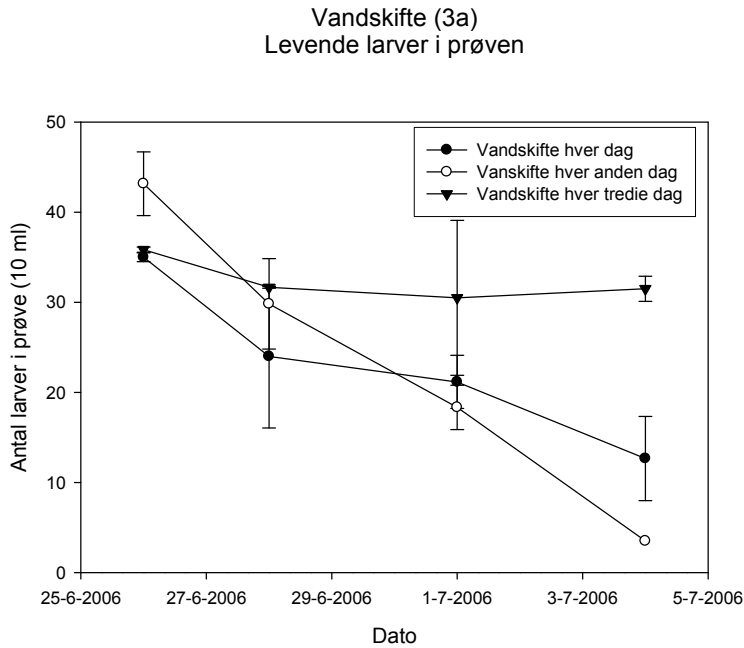


Figur 4. Antal larver i prøven fra forsøgets begyndelse og til og med dag 9 som funktion af fodring med 3 forskellige foderintensiteter.

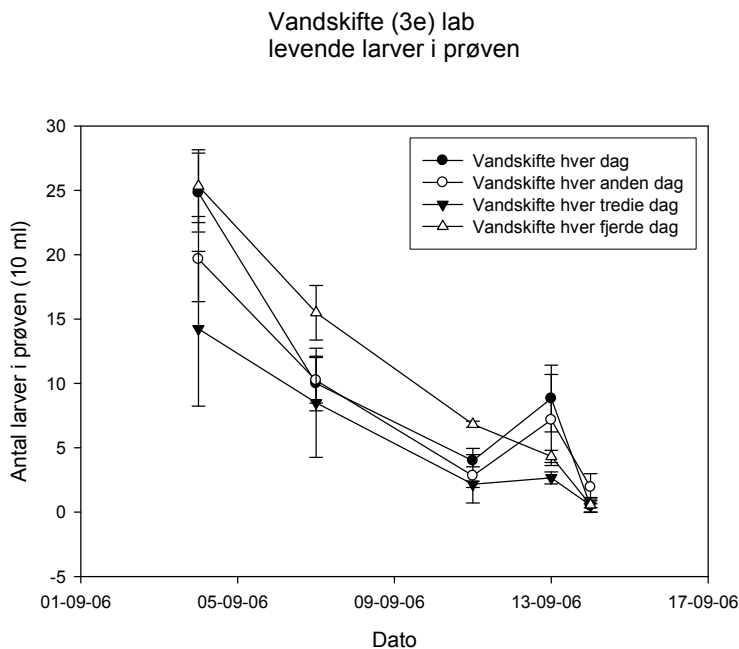
Vandskiftefrekvensforsøgene

Der blev gennemført i alt 4 forsøg til belysning af effekter af vandudskiftning. Vandudskiftning nødvendiggøres af de frigivne affaldsstoffer fra østerslarverne. Næringsstofferne fungerer som næringsgrundlag for bakterier, som med deres hurtige generationstid kan opformere sig i løbet af kort tid. Vandudskiftningen i forsøgstankene blev foretaget efter den traditionelle metode hvor vandet blev hældt gennem planktondug som opsamlede larverne. Disse kunne efterfølgende overføres til forsøgshederne efter at disse var rengjort og fyldt med friskt vand. Det må forventes at en sådan oprensningprocedure påfører larverne fysiske skader og stress. Larvernes skaller beskytter bløddelene og kan lukkes således at larverne overlever filtreringen. Den negative effekt af håndteringen vil afhænge af skånsomheden af denne.

I forsøgene var de tydeligste effekter af vandskiftefrekvenserne en højere overlevelse af larver som blev filtreret hver tredje dag sammenlignet med larver som blev filtreret hver anden eller hver dag (Figur 5). Der sås ligeledes en tendens til højere overlevelse i kulturer som blev filtreret hver fjerde dag sammenlignet med kulturer som blev filtreret hver tredje, anden eller hver dag (Figur 5). Det ser derfor ud til at der er en generel negativ effekt af vandskiftet. Dette kan skyldes påførte skader på larverne ved vandskifte, eller kan skyldes de abrupte skift i vandkvalitet som en periodisk fuldstændig vandudskiftning medfører. Der er dog ikke foretaget sammenligning med vandudskiftning foretaget kontinuerligt. Og det er derfor ikke muligt yderligere at indsnævre årsagen til den tilsyneladende negative effekt ved vandudskiftning.



Figur 5. Larveoverlevelsen som funktion af tid ved 3 forskellige vandskiftesfrekvenser, hhv. vandskifte hver dag, hver anden dag eller hver tredje dag.

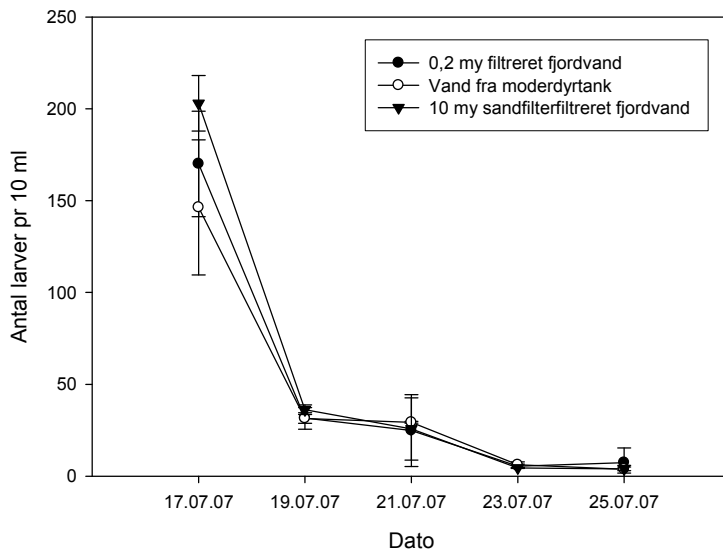


Figur 6. Larveoverlevelsen som funktion af tid ved 3 forskellige vandskiftesfrekvenser, hhv. vandskifte hver dag, hver anden dag, hver tredje dag eller hver fjerde dag.

Vandtypeforsøget

Tre forskellige typer vand blev sammenlignet, hhv. 0,2 μ filtreret vand som under normale omstændigheder anvendes til opdrættet i forsøgsanlægget, vand fra moderdyrsanlægget og vand fra vandindtaget lige efter sandfilteret. Det sidste er filtreret til 10 μ m. Vandet fra moderdyrstanken blev anvendt for at give en eventuel indikation af højere smittepres via moderdyrene.

Overlevelsen viste sig at være meget lav og uafhængig af typen af vand som blev anvendt (Figur 7). Det ser derfor ikke ud til at der i vandforsyningen er en klar smittevej idet overlevelsen var lige så lav i de kulturer som fik 0,2 μ m filtreret vand.



Figur 7. Larveoverlevelsen som funktion af 3 typer vand, hhv. sterilfiltreret vand, vand fra moderdyrtankene og vand fra vandindtaget umiddelbart efter sandfilteret.

Kemostatforsøget

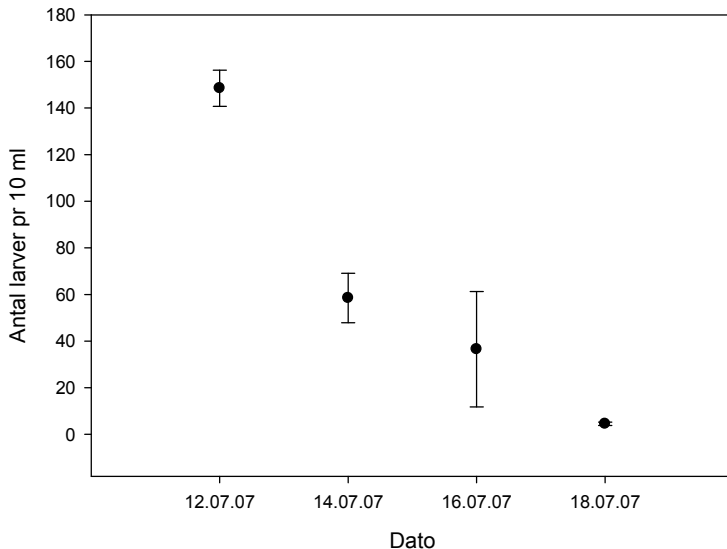
Kemostatforsøget blev gennemført uden en kontrolgruppe. Det er dog gennemført så mange studier af østerslarver at en forventet overlevelse af et godt hold østerslarver er kendt. Ved DSC vil dette være at op imod 20 % af larverne når til det stadie hvor de er settlingsklare. Der er i litteraturen beskrevet overlevelser på 40 % til setting og private opdrættere har postuleret overlevelse på op imod 80%.

Kemostatprincippet blev anvendt for at gennemføre udskiftning af vandet i kulturen uden samtidig at påføre larverne de fysiske påvirkninger og den stress, som er forbundet med filtreringen af vandet over en filterdug. Alt dyrkningsudstyr blev autoklaveret inden brug.

To 10 liters flasker med 6 liter 0,2 μ m filtreret vand fra slangen i algerummet blev sat op med ca. 15 larver per ml, dvs. en startpopulation på ca. 90.000 larver.

Der blev monteret en maskinel udskiftning af ca. 6 liter vand i døgnet. Vandet var 0,2 μ m filtreret vand fra algerummet. Vandet blev på daglig basis overført til autoklaverede forseglede 10 liter flasker. Føden var en blanding af 1400 ml Chatoceros., 600 ml Isochrysis og lidt Tetraselmis. Der blev tilsat 700 ml af denne blanding til hver vandudskiftningsflaske. Der blev dagligt sat rene flasker op med udskiftningsvand indeholdende mikroalger.

Overlevelsen i det pågældende forsøg var meget lav (Figur 8). Der blev allerede efter 2 dage konstateret dårlig lugt i flaskerne. Det må konstateres at vandudskiftningen har været for lav til at hindre vandkvaliteten i at forringes. Kontinuerlig udskiftning af vandet har en række fordele som rettelig fortjener at blive fremhævet. Tidsforbruget reduceres betragteligt hvis en kultur kan gennemføres uden manuel tømning af tanke, frafiltrering af larver og genopfyldning med rent vand. Opdrætsforholdene i tankene bliver mere homogene, hvis der anvendes kontinuerlig vandskifte. Ulemperne er som tidligere fremhævet at kontinuerlig vandudskiftning med høje udskiftningsgrader medfører øget forbrug til mikroalger og varme.



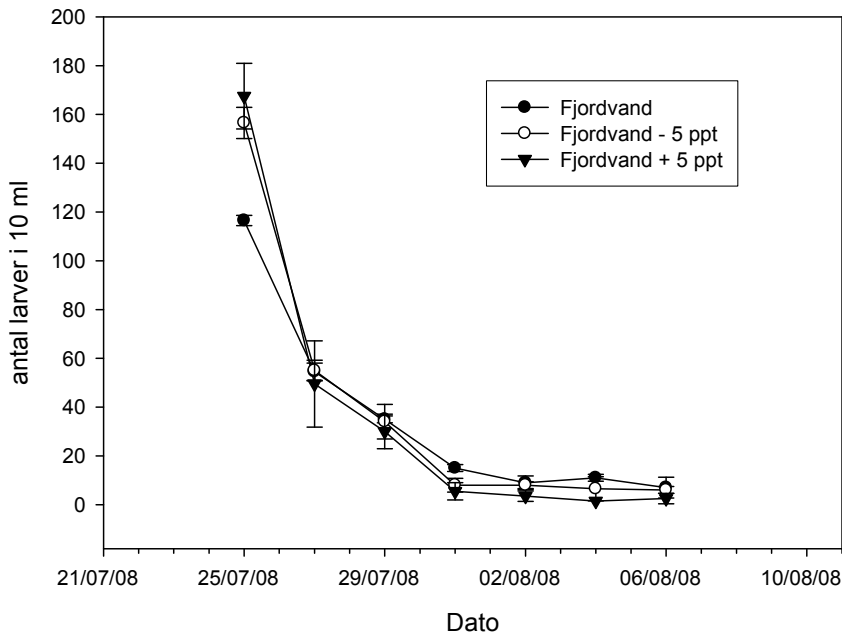
Figur 8. Larveoverlevelsen som funktion af tiden. Punkterne repræsenterer gennemsnittet af 2 tanke.

Salinitetsforsøget

Saliniteten kan have indflydelse på østerslarvernes overlevelse. Europæisk østers er typisk udbredt i områder med fuld salinitet. En lavere overlevelse i Limfjorden kunne skyldes den reducerede salinitet som forekommer her. I Limfjorden ses de største forekomster af østers i de vestlige dele af fjorden hvor saliniteten også er højst. Der er ikke østers i den østlige del af Limfjorden hvor saliniteten generelt er lavere. Saliniteten i Limfjorden svinger og afhænger af vindforholdene, idet vandmasser med høj salinitet presses ind i Kattegat og Limfjorden ved vestenvind. I stille perioder og i perioder med østenvind vil vand med lav salinitet fra Østersøen bevæge sig opad gennem Kattegat. Saliniteten har stor betydning for fiskelarvers placering i vandsøjlen. Østerslarver har dog så høj vægtfylde på grund af deres skaller, at de ikke er i stand til at holde sig oppe i vandsøjlen uden aktivt at kompensere for tyngdekraften ved svømmeaktivitet.

Saliniteten kan også have indflydelse på fysiologiske processer i østerslarverne.

Forsøgene viste ingen forskel på østerslarvernes overlevelse ved hhv. de naturligt forekommende saliniteter på omkring 30 ppt og hhv. en 5 ppt. højere eller lavere salinitet (Figur 9). Der er derfor ikke tegn på at der er behov for at gennemføre en aktiv indsats for at opretholde en specifik salinitet i anlægget.



Figur 9. Larveoverlevelsen som funktion af tid ved 3 saliniteter, hhv. den naturligt forekommende salinitet ved DSCs vandindtag, en 5 ppt højere og en 5 ppt. lavere salinitet.

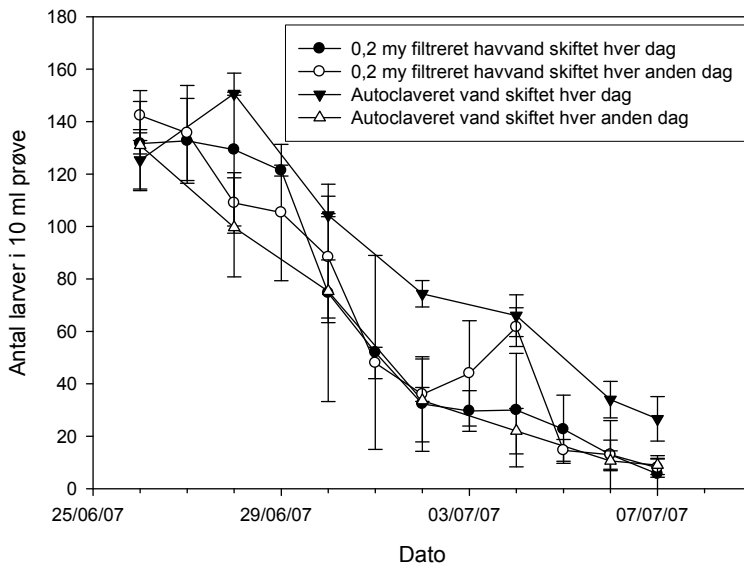
Sterilitetsforsøget

Forsøget blev sat op med 6 flasker alm. fjordvand fra slangen i algerummet, hvor 3 af flaskerne havde vandskifte hver dag og de 3 andre havde vandskifte hver anden dag. Seks andre flasker blev anvendt efter at flasker, slanger, låg og vand var blevet autoklaveret. Her var der ligeledes 3 flasker med vandskifte hver dag og 3 flasker med vandskift hver anden dag.

Resultaterne viste ingen forskel i overlevelse mellem de forskellige behandlinger (Figur 10).

Den øgede overlevelse af larver i behandlingen med autoklaveret vand som blev skiftet hver dag er næppe et udtryk for at denne behandling fungerede bedre. Det er værd at bemærke at kurvernes hældning er ens for alle behandlinger. Det faktum at behandlingen med autoklaveret vand som blev filtreret hver dag ligger højere, ser snarere ud til at være en effekt forårsaget af et højere antal larver initialt, idet der tilsyneladende er sket en positiv udvikling i antallet af larver mellem første og anden prøvetagning.

Forsøget må derfor konkluderes ikke at have vist en forskel i overlevelsen af larver ved de forskellige vandbehandlinger eller vandskiftfrekvenser. Det sidste bekræftes også af tidligere gennemførte forsøg med vandskiftfrekvens i nærværende rapport.



Figur 10. Larveoverlevelsen som funktion af tid ved hhv. to typer vandbehandling og to vandskiftefrekvenser.

Bakteriologisk undersøgelse af larver fra forsøg med stor forskel i dødelighed.

De bakteriologiske undersøgelser er meget ressourcekrævende. Allerede tidligt i projektet blev der gennemført et forsøg med et alternativt fodersupplement som gav nogle meget store forskelle i mortalitet. Mortaliteten havde ingen sammenhæng med behandlingerne (Tabel 3). Der blev taget prøver af hhv. opdrætsvandet og larverne og disse prøver gennemløb en bakteriologisk undersøgelse. Det ses af resultaterne at der ikke er sammenhæng mellem den observerede mortalitet og hhv. kimtallene for vandet i kulturen eller larverne. Det kan derfor konstateres at den evt. sygdomsfremkaldende organisme ikke har været dominerende i prøverne med høj observeret mortalitet. Det ser ud som om andre bakterier lægger et kvantitativt ”filter” hen over tallene og derved hindrer en kausativ konklusion.

Tabel 3. Bakteriekimtal for 12 forsøgsflasker som viste høj forskellighed i mortalitet.

Forsøgsenhed (Diæt)	Observeret mortalitet	Vand fra kulturen		Larver	
		BA kimtal (x 10 ³ /ml)	TCBS kimtal (x 10 ³ /ml)	BA kimtal (x 10 ³ /ml)	TCBS kimtal (x 10 ³ /ml)
1 (A)	Meget høj	19,0	0,7	18,0	0,0
2 (A)	Meget høj	3,8	0,2	42,0	0,3
3 (A)	Meget lav	420,0	>3	8,0	>3
4 (B)	Meget lav	4,9	2,8	20,0	0,3
5 (B)	Middel	9,4	0,9	4,4	0,1
6 (B)	Middel	1,5	0,0	80,0	3,0
7 (C)	Meget høj	2,1	0,0	4,1	0,1
8 (C)	Meget høj	1,9	0,1	12,0	0,0
9 (C)	Meget høj	30,0	202,0	4,5	0,3

10 (D)	Meget høj	0,5	0,0	76,0	0,3
11 (D)	Meget høj	0,9	0,0	6,6	0,2
12 (D)	Meget høj	0,6	0,0	2,0	0,2

De virulogiske undersøgelser

Prøver fra følgende prøvetagninger og hold blev sendt til CRL for PCR-undersøgelse for virus

Arbejdspakke 1:

Alle 4 prøver fra VENØ (nummereret prøve 1 til 4)

Alle 5 prøver fra HOLD 1 (nummereret 1 til 5)

Alle 6 prøver fra HOLD 3 (nummereret 1 til 6)

Arbejdspakke 2:

I alt 3 prøver: prøve 2, 4 og 6

Resultatet viste, at prøve 3, 4 og 5 fra HOLD 1 var inficeret med en variant af østers herpesvirus type 1 (OsHV-1). Lignende resultater er set før hos larver af forskellige bivalve species (*Crassostrea gigas*, *Ruditapes philippinarum* og *Pecten maximus*) (Arzul *et al.* 2001a; Arzul *et al.* 2001b). Iflg. CRL er det ikke første gang at europæisk flad østers er fundet til at være inficeret med OsHV-1, og det er ikke første gang at denne variant er fundet (Renault & Arzul 2001). Normalt detekteres OsHV-1 i forbindelse med dødelighed hos larver og spat. Disse dødeligheder optræder efter at ynglen er blevet stresset (håndtering, temperaturforøgelse osv.). En forklaring på at virus findes hos HOLD 1 men ikke HOLD 3 kunne være at HOLD 1 er blevet overført ved højere temperaturer end HOLD 3, eller måske har håndteringen været anderledes. PCR metoden er sensitiv, men meget lavgradige infektioner kan dog blive overset. Så det er muligt at OsHV-1 er til stede hos HOLD 3, men at infektionsniveauet er meget lavt. Det samme kan være tilfældet med prøverne fra VENØ.

KONKLUSION

Arbejdspakke 1 viste ikke en entydig forskel på overlevelsen af larver ved hhv. DSC og VFF. Larverne overlevede nogle få dage længere ved DSC end ved VFF, men der blev ikke observeret settling på nogen af lokaliteterne. Der var tydeligvis højere bakteriekimtal i de første prøver fra VFF hvor der var flere størrelsesordener (dekader) flere bakterier i prøverne fra VFF. Dette kan ikke sammenholdes med dødelighed, idet det ikke er kendt om de pågældende bakterier er pathogener. Der er dog isoleret stammer af vibrioslægten fra størstedelen af prøverne fra både VFF og DSC.

I arbejdsopgave 2 blev en række dyrkningsbetingelser afprøvet i lille skala, med henblik på identifikation af mulige årsager til den observerede høje dødelighed. Fødekoncentrationsforsøget viser at fødekoncentrationen ser ud til at kunne have en effekt på overlevelsen af larverne. Dette bør undersøges nærmere. Det vurderes dog næppe at kunne forklare den generelt lave overlevelse af østerslarver i opdræt.

Vandudskiftningsforsøgene hvor tankene blev tømt og larverne overført til friskt vand viste, at der var en negativ effekt af at øge frekvensen af vandudskiftning. Dette kan skyldes påførte skader på larverne i forbindelse med vandudskiftningen eller de abrupte skift i vandkvalitet som følger af den batchvise udskiftning af al vandet i kulturerne.

Vandtypeforsøgene hvor sterilfiltreret, vand fra moderdyrstanke og vand fra vandindtaget blev sammenlignet, indikerede at vandforsyningen tilsyneladende ikke er den primære årsag til mortaliteten idet der var samme lave overlevelse ved anvendelse af alle tre typer vand.

Desinfektion af systemet og kulturvandet ved autoclavering havde ingen positiv effekt på overlevelsen.

Anvendelse af kontinuerlig udskiftning af vandet med en udskiftningsrate på 1 kulturvolumen dagligt gav en ringe overlevelse og der blev konstateret forringet vandkvalitet registreret som ildelugtende vand allerede 2 dage efter forsøgets begyndelse. Kontinuerlig vandudskiftning med lave udskiftningsrater bør derfor anvendes med forsigtighed.

De bakteriologiske undersøgelser var ikke i stand til at vise en kausativ sammenhæng mellem observeret mortalitet og bakteriekimtal. Det blev dog fundet en række *Vibrio* arter, hvoraf størstedelen kunne henføres til to grupper hhv. *V. anguillarum*-lignende bakterier og *V. splendidus*-lignende bakterier.

Virologiske undersøgelser viste at larverne var inficeret med herpesvirus type L. Dette har ikke kunnet hverken be- eller afkræfte muligheden for, at østers herpesvirus type 1 kan være skyld i den observerede dødelighed hos østersyngel.

REFERENCER

Elston, R. A. 1999. Health management, Development and Histology of Seed Oysters. The World aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA

Helm, M. M. & Bourne, N. 2004. Hatchery culture of bivalves. A practical manual. FAO Fisheries technical paper No. 471. FAO, Rome.

Tørring, D. og Steinfeldt, S. 2005. Østersopdræt i Limfjorden Fase 2 rapport. Tilgængelig som PDF fil via www.skaldyrcenter.dk.

Tørring, Ditte. 2001. Effects of size and concentration of food particles on the functional feeding response of larvae of the European oyster (*Ostrea edulis* L.) Specialrapport. Afdeling for Marin Økolog; Aarhus Universitet.

Utting, S.D. and Spencer, B.E. 1991. The hatchery culture of bivalve mollusc larvae and juveniles. Laboratory leaflet Number 68. Directorate of Fisheries Research, Lowestoft 1991.

Walne, P. R. 1979. Culture of Bivalve Molluscs. 50 years experience at Conwy. Fishing News Books Ltd. England.

Appendix 1 (Bakterier og virus som årsag til dødelighed hos østersyngel)

Østersopdræt Fase 3:

Identifikation og forebyggelse af sygdom ved produktion af yngel af europæisk østers

Projektrapport, februar 2008: Afsnit vedr. bakteriologiske og virologiske undersøgelser
Lone Madsen og Inger Dalsgaard, Fiskepatologisk Laboratorium, DTU Aqua

Bakterier og virus som årsag til dødelighed hos østersyngel

I forbindelse med opdræt af den europæiske flade østers (*Ostrea edulis*) i Limfjordsområdet har man observeret en noget højere dødelighed blandt yngel opdrættet ved brug af intensive metoder i forhold til yngel opdrættet ved brug af ekstensive metoder. Årsagen til den observerede dødelighed antages at skyldes sygdomme forårsaget af bakterier eller virus.

Bakterier, hovedsageligt *Vibrio*-bakterier, associeres med yngeldødelighed hos muslinger og østers. *Vibrio*-bakterier findes som en del af den normale mikroflora i vandmiljøet, hvor opdræt af østers foregår. Mange forskellige *Vibrio*-arter er blevet isoleret i forbindelse med dødelighed hos østersyngel, herunder *Vibrio splendidus*, *V. anguillarum*, *V. tubiashi*, *V. alginolyticus* og *V. tapetis* (Brown 1973, Brown 1981, Gay et al. 2004a, Gay et al. 2004b, Hovgaard et al 2001, Paillard et al. 2004). Ofte bliver mere end en art isoleret, og præcis hvilken art der er den sygdomsfremkaldende i de enkelte tilfælde diskuteres. Nogle undersøgelser har tydet på, at samspillet mellem forskellige *Vibrio* bakterier havde en forøgende effekt på dødeligheden blandt yngel (Gay et al. 2004a).

I østersopdrætsprojektet fase 3 blev det derfor antaget, at en eventuel sygdoms-fremkaldende bakterie i forbindelse med østersyngel-dødeligheden skulle findes indenfor *Vibrio*-slægten.

Virus har også vist sig at kunne give problemer i forbindelse med opdræt af muslingearter, herunder herpesvirus.

I forbindelse med afprøvning af forskellige østersopdrætsmetoder blev der udtaget prøver til både virologisk og bakteriologisk undersøgelse.

Undersøgelser af østersyngel

Bakterier

En del af et batch østersyngel på det ekstensive opdrætssted Venø blev flyttet til det intensive opdrætssted DSC, og der blev udtaget prøver regelmæssigt fra begge steder (to gange om ugen, de samme dage på de to lokaliteter) for at identificere eventuelle patogene bakterier og virus.

Det bemærkes, at de fire hold på DSC ikke er overført på samme tidspunkt (fra Venø til DSC), men derimod med flere dages mellemrum (først HOLD 1, dernæst HOLD 2 osv.).

De udtagne prøver blev sendt med posten, dvs. de var undervejs en dag (bortset fra Prøve 4 fra Venø der var to dage undervejs), og blev på Fiskepatologisk Laboratorium undersøgt på modtagelsesdagen (bortset fra Prøve 1 der blev undersøgt dagen efter modtagelsen).

Udover de bakteriologiske undersøgelser der blev foretaget på prøver udtaget i forbindelse med sammenligning af mikroflora i intensivt og ekstensivt opdræt (Arbejdspakke 1), blev der også foretaget undersøgelser i forbindelse med et forsøg med diverse fodertilsætninger til små grupper af yngel i intensivt opdræt (Arbejdspakke 2). Endvidere blev der foretaget nogle indledende undersøgelser, hvor metoder blev afprøvet.

Metoder til de indledende undersøgelser:

Kimtalsbestemmelse på blodagar tilsat 5 % kalveblod (BA) og TCBS (selektivt medium til påvisning af *Vibrio* arter) vha. følgende metoder:

- 1: Direkte på larver og vand efter grundig oprystning
- 2: Frafiltrerede larver (100 µm-filter), opslemmet i 1,5 ml fysiologisk saltvand (FK), hvorefter der foretages en grundig oprystning
- 3: Frafiltreret vand uden larver

Metoder til Arbejdspakke 1 undersøgelser:

Ovenstående metoder 2 og 3 blev anvendt, mens marin agar tilsat 5 % kalveblod (MA) erstattede TCBS. Endvidere blev foretaget en ekstra undersøgelse af larver fra HOLD 3 i forbindelse med Prøve 4. En del af larverne blev knust og herefter opslemmet i FK. Disse er i resultattabellen for Prøve 4 benævnt 3.4K.

Metoder til Arbejdspakke 2 undersøgelser:

Metoderne 2 og 3, samt TCBS.

Traditionelle metoder til at isolere og karakterisere *Vibrio*-bakterier blev anvendt. Alle prøver blev undersøgt på BA samt enten MA eller TCBS. Fra de anvendte medier blev de dominerende *Vibrio*-lignende bakterier rendyrket, og disse blev nærmere karakteriseret vha. biokemiske metoder, herunder nedbrydning af aminosyrer og vækst i forskellige saltprocenter samt bevægelighed og hæmolyse på BA. Efter identifikation af bakterierne til artsniveau, blev bakteriernes DNA isoleret og skåret med et enzym HindIII vha. "ribotypning", og disse ribotypningsprofiler blev anvendt til at sammenligne de forskellige isolater inden for en art med henblik på at få et indtryk af hvor tæt beslægtede bakterierne var. I undersøgelsen indgik følgende velkarakteriserede bakterier (typekulturer):

V. anguillarum (Vang): ATCC 43305, NCIMB 6, NCIMB 407 og 820723-2/8 (O2b)

V. splendidus (Vs): NCIMB 1 og NCIMB 2251

V. alginolyticus (Valg): NCIMB 1903 og ATCC 33838

Virus

Der blev udtaget prøver til virus-undersøgelse samtidig med prøverne til bakterieundersøgelserne, og udvalgte af disse prøver blev videresendt til EU referencelaboratoriet for sygdomme hos to-

skallede bløddyr (CRL) (Ifremer, La Tremblade, Frankrig), hvor prøverne blev undersøgt for tilstedeværelsen af herpesvirus vha. en PCR metode.

Resultater og diskussion

Bakteriologiske undersøgelser 2005, indledende undersøgelser, østers fra DSC

Østerslarver modtaget 3/8 2005 (J. nr. 050803-1) (kaldet HOLD X, prøve 1)

Levende kultur i det vand de gik i på DSC

Levende kultur, skyllet og tilsat 0,2 µm-filtreret havvand

Død/døende kultur, i det vand de gik i på DSC

Kimtalsbestemmelse:

Levende kulturer:	BA: 1–10 x 10 ³ per ml
	TCBS: 0,1-1 x 10 ³ per ml
Død kultur:	BA: 1.000 x 10 ³ per ml
	TCBS: 100 x 10 ³ per ml

I alt blev der rendyrket 14 kolonier, heraf tilhørte de 13 Vibrio-slægten. Disse 13 isolater kunne inddeles i 6 grupper efter en kort biokemisk undersøgelse. Ét isolat kunne karakteriseres som *V. anguillarum*-lignende.

Østerslarver modtaget 24/8 2005 (J. nr. 050824-1) (kaldet HOLD X, prøve 6)

4 prøverør, alle med døde larver

Kimtalsbestemmelse:

1 (Larver):	BA: 1.000 x 10 ³ per ml
	TCBS: 10 x 10 ³ per ml
2 (Larver i FK):	BA: 1.000 x 10 ³ per ml
	TCBS: 100 x 10 ³ per ml
3 (Vand):	BA: 10 x 10 ³ per ml
	TCBS: 1 x 10 ³ per ml

I alt blev der rendyrket 20 kolonier, heraf tilhørte de 17 Vibrio-slægten. De 17 isolater kunne inddeles i flere grupper (heraf 3 af de samme som undersøgelsen i starten af august). Seks isolater kunne karakteriseres som *V. anguillarum*-lignende.

Bakteriologiske undersøgelser 2006

Arbejdsmappe 1:

Østersopdræt – sammenligning af østerslarver på DSC og Venø

Der blev udtaget prøver af larver under larvefasen (larverne stammede fra samme batch men blev opdrættet hhv. ekstensivt (Venø) og intensivt (DSC)) for at identificere evt. patogene bakterier og

virus på de to lokaliteter. Prøvetagningen blev foretaget to gange om ugen, de samme dage på de to lokaliteter.

I det følgende er resultaterne fra hver prøvetagning indskrevet i 6 skemaer, Prøve 1 til Prøve 6. Bogstavet V indgår i nummereringen af vandprøver. Når D indgår i nummereringen henviser det til, at alle larver i den pågældende prøve var døde. K henviser til at larverne i den pågældende prøve var blevet knust, inden de blev opslemmet i FK.

PRØVE 1 (060718-1)		Larveaktivitet	BA kimtal (x 10 ³ /ml)	MA kimtal (x 10 ³ /ml)	Optagne isolater	Vibrio arter
HOLD 3						
	3.1	8/10 lev. 2/10 svøm.	0,02	1,2	MA:3	Vs
HOLD 1						
	4.1	5/10 lev. 0/10 svøm.	0,01	0,65	MA:3	
HOLD 2						
	6.1	4/10 lev. 1/10 svøm.	0,14	1,7	BA:1 MA:3	Vang
VENØ	V.V1		3,6	500	BA:1 MA:2	Vang
	V.1	7/10 lev. 5/10 svøm.	4,7	500	BA:1 MA:2	

Prøve 1 blev udtaget inden HOLD 4 var flyttet til DSC. Allerede ved udtagning af Prøve 1 sås der en lavere aktivitet i prøven af HOLD 1 i forhold til de andre to prøver. Dette er også tilfældet i den følgende prøveudtagning.

PRØVE 2 (060720-1)		Larveaktivitet	BA kimtal (x 10 ³ /ml)	MA kimtal (x 10 ³ /ml)	Optagne isolater	Vibrio arter
HOLD 3	2.V2		forurenat	5	MA:2	Vang
	2.2	bev.	1,7	8	BA:2 MA:2	Vang
HOLD 4	3.V2		0,57	6,3	BA:1 MA:2	Vang
	3.2	bev.	1,8	34	BA:1 MA:3	Vs
HOLD 2	4.V2		1	23	BA:1 MA:1	Vang
	4.2	bev.	0,47	10	BA:2 MA:1	Vang
HOLD 1	5.V2		4,5	21		
	5.2	færre bev.	1,8	18	BA:1 MA:3	Vang
VENØ	V.V2		14	54	BA:3 MA:2	
	V.2	Kun få larver	16	260	BA:3 MA:2	Valg

PRØVE 3 (060724-1)		Larveaktivitet	BA kimtal (x 10 ³ /ml)	MA kimtal (x 10 ³ /ml)	Optagne isolater	Vibrio arter
HOLD 1	2.V3		100	550		
	2.3	2/10 lev. få bev.	24	700	MA:4	
HOLD 2	3.V3		680	2000		
	3.3	Kun få lev.	280	2400	BA:2 MA:3	Valg Vang
	3.D3		500	2100	BA:1 MA:4	Vang Vs

HOLD 3	4.V3		142	520		
	4.3	5/10 lev.	70	500	BA:2 MA:2	Valg Vang
HOLD 4	6.V3		650	1800		
	6.3	fleste lev. mange bev.	160	1400	BA:2 MA:3	Valg Vs
VENØ	V.V3		14	1400	BA:1	
	V.3	meget få larver mange encellede organismer	700	2400	BA:4 MA:2	Valg Vang

Det bemærkes, at jo senere et hold er flyttet til DSC fra Venø, jo flere levende ses i prøven.

PRØVE 4 (060727-1)		Larveaktivitet	BA kimtal (x 10 ³ /ml)	MA kimtal (x 10 ³ /ml)	Optagne isolater	<i>Vibrio</i> arter
HOLD 3	3.V4		3	74	BA:2	
	3.4	bev.	2,7	250	BA:3 MA:2	Vang Valg
	3.4K		19	230	BA:2 MA:2	Valg
HOLD 2	4.V4		0,54	10	BA:1	Valg
	4.4	bev.	1,24	8,8	BA:2 MA:2	Valg Vang
HOLD 4	5.V4		2,8	156	BA:1	
	5.4	10/10 lev. flere bev.	9	800	BA:2 MA:1	Valg
HOLD 1	6.V4		2,1	88	BA:1	
	6.4	fleste døde ingen svøm.	23	400	BA:4 MA:1	Valg
VENØ	V.V4		10	1080	BA:1 MA:4	Vang
	V.4	alt dødt (2 dage undervejs)	1200	5800	BA:3 MA:3	Vang

PRØVE 5 (060731-1)		Larveaktivitet	BA kimtal (x 10 ³ /ml)	MA kimtal (x 10 ³ /ml)	Optagne isolater	<i>Vibrio</i> arter
HOLD 1	1.V5		3,2	58	BA:1 MA:1	Valg
	1.5		3,9	43	BA:2 MA:2	Valg
HOLD 2	2.V5		6,9	82	BA:1	
	2.5		1,38	18	BA:2 MA:1	Valg
HOLD 3	3.V5		2,7	64		
	3.5		0,57	15	BA:2 MA:1	Valg
HOLD 4	4.V5		0,82	14,6		
	4.5		1,3	27	BA:2 MA:1	Valg

Der var ingen aktivitet i vandfasen hos nogle af prøverne ved den femte prøvetagning. Fra og med prøve 5 var det ikke muligt at udtage prøver på Venø – dvs. på trods af filtrering af øget mængde vand sås ingen østerslarver (koncentration var meget lille) men en meget stor forekomst af encellede organismer.

PRØVE 6		Larveaktivitet	BA kimtal	MA kimtal	Optagne	<i>Vibrio</i>
----------------	--	----------------	-----------	-----------	---------	---------------

(060803-1)		(x 10 ³)	(x 10 ³)	isolater	arter
HOLD 1	1.V6	1,4	33		
	1.D6	600	6000		
HOLD 2	3.V6	0,51	10	BA:1	
	3.D6	14	208	BA:2 MA:2	
HOLD 3	5.V6	0,68	10,5		
	5.6	30	250	BA:2 MA:1	Vang
	5.D6	26	1900	BA:1 MA:2	
HOLD 4	6.V6	1,8	27	BA:1 MA:1	
	6.6	30	380	BA:1 MA:2	Vs
	6.D6	160	3200	BA:2	Valg

De fleste larver var døde ved den sjette prøvetagning.

Det var kun muligt at udtage prøver fra det ekstensive opdrætssted i to uger, da larvetætheden var meget lav. På det intensive opdrætssted ”crashede” larveproduktionen efter 3 uger, da næsten alle larverne døde.

I undersøgelsen blev der observeret svingninger i kimtallene. Der var en tendens til at kimtallet lå omkring 103 /ml, når der var mange levende yngel i prøven. I modsætning hertil sås en kraftig stigning i kimtallene til 106 /ml, når hovedparten af ynglen var døde. Prøve 5 og 6 skiller sig ud fra dette. Her skal man dog være opmærksom på, at der i disse prøver var en noget mindre tæthed af larverne. Tidspunktet for vandskift i forhold til prøvetagningen kan også have påvirket kimtallene. Kimtallene kan have influeret på sammensætningen af de fundne Vibrio-bakterier igennem forsøgsforløbet.

Forskellige Vibrio arter blev fundet i alle prøver, og der sås ingen tydelig dominant art igennem prøvetagningsperioden. Størstedelen af isolaterne kunne inddeles i tre grupper. *V. anguillarum*-lignende bakterier (Vang) og *V. splendidus*-lignende bakterier (Vs) blev isoleret gennem hele prøvetagningsperioden, mens *V. alginolyticus*-lignende bakterier (Valg) ikke blev isoleret den første uge men herefter gennem den resterende periode.

Arbejdsopgave 2: Effekt af modificerede driftsrutiner

Ændringer i diverse opdrætsparametre blev afprøvet i lille skala, herunder afprøvning af forskellige fodertilsætninger. I sidstnævnte forsøg blev der udtaget prøver til bakteriologisk undersøgelse, da der i forbindelse med forsøget sås varierende dødeligheder i grupperne uafhængigt af fodertilsætningen. I alt var der 12 små enheder, hvor i alt 4 forskellige fodertilsætninger blev afprøvet.

Østerslarver modtaget 14/6 2006 (J. nr. 060614-1) (HOLD Y, prøve 1)

Østerslarver i havvand mærket 1 til 12 – undersøgt 15/6

Frafiltreret vand mærket A

Larver (opslemmes i 1,5 ml FK, grundig oprystning) mærket B

Kimtalsbestemmelse på BA og TCBS

I alt blev der optaget 32 isolater, heraf kunne 8 isolater ikke vokse i hverken KB/salt eller marin bouillon – ud af de resterende 24 isolater var de 23 *Vibrio* isolater, som ud fra en kort biokemisk undersøgelse kunne inddeles i 6 grupper

060614-1	Mortalitet (opgivet af DSC)	Larveaktivitet i prøven	BA kimtal ($\times 10^3$ /ml)	TCBS kimtal ($\times 10^3$ /ml)	Optagne isolater	<i>Vibrio</i> arter
1A			19	0,73	BA:2 TCBS:2	Vang Vang
1B	99 %	2/20 lev.	18	0		
2A			3,8	0,22	BA:3	Vang
2B	99 %	Ingen lev.	42	0,27		
3A			420	>3	BA:1 TCBS:1	Vang Vs
3B	Næsten ingen	Lidt bev. 8/40 lev	8	>3	TCBS:1	Vang
4A			4,9	2,8	BA:1	
4B	Næsten ingen	Lidt bev. 20/40 lev.	20	0,32	TCBS:1	Vs
5A			9,4	0,9	BA:2 TCBS:2	Vang Vs
5B	70 %	Min. bev. 20/40 lev.	4,4	0,09	TCBS:2	Vs
6A			1,5	0,01		
6B	70 %	Lidt bev. 20/40 lev.	80	3	BA:1 TCBS:1	Vang
7A			2,1	0,04	BA:1 TCBS:1	
7B	99 %	Ingen lev.	4,1	0,08	TCBS:1	
8A			1,9	0,06		
8B	99 %	3/50 lev.	12	0,03		
9A			30	2,2	BA:1 TCBS:1	Vang
9B	99 %	2/70 lev.	4,5	0,26		
10A			0,54	0,01		
10B	99 %	2/100 lev.	76	0,32	BA:2	Vang
11A			0,92	0,01		
11B	99 %	2/80 lev.	6,6	0,17	BA:2 TCBS:2	Vang Vang Vs
12A			0,56	0		
12B	99 %	2/80 lev.	2	0,22	TCBS:1	Vang

Forskellige *Vibrio* arter blev fundet i alle prøver i forbindelse med foderforsøget, og der sås ingen tydelig dominant art i de forskellige prøver. Størstedelen af isolaterne kunne inddeles i to grupper. *V. anguillarum*-lignende bakterier (Vang) og *V. splendidus*-lignende bakterier (Vs) blev isoleret, hvor førstnævnte kunne isoleres fra de fleste prøver.

Karakterisering af *Vibrio*-bakterier ved ribotypning

Ribotypningsresultater ses i nedenstående tabel, hvor alle prøvetagninger er medtaget. (billeder af ribotypninger af de tre grupper?)

HOLD		Prøvenr					
		1	2	3	4	5	6
X	Vang	L	Nd	Nd	nd	Nd	BMNNOP
	Vs						
	Valg						
Y	Vang	I(10)JJK	Nd	Nd	nd	Nd	Nd
	Vs	6 7 8 8 9 10					
	Valg						
1	Vang		B				
	Vs						
	Valg				β λ	α α α	
2	Vang	A B	B D	B E	G		
	Vs			3			
	Valg			α	α α α	α	
3	Vang		B B C	F	B		B B
	Vs	1					
	Valg			α	α α	α α	
4	Vang	Nd	B				
	Vs		2	4		5	
	Valg			α α	α α	α α	
Venø	Vang	C		C	E E E H H	Nd	nd
	Vs						
	Valg		M	α			

Prøveudtagning for HOLD X foretaget i 2005, mens prøveudtagning for HOLD Y, 1-4 samt VENØ er foretaget i 2006

HOLD 1-4, X, Y: intensiv produktion VENØ: ekstensiv produktion

Vang: *V. anguillarum*-lignende; Vs: *V. splendidus*-lignende; Valg: *V. alginolyticus*-lignende

Gruppen med *V. anguillarum*-lignende bakterier (Vang) indeholdt 43 isolater, som kunne inddeles i 16 ribotype grupper (kaldt A til P). Elleve isolater havde ribotypen B. Disse isolater kom fra 5 forskellige hold, fra hhv. HOLD X: Prøve 6; HOLD 1: Prøve 2; HOLD 2: Prøve 1, 2 og 3; HOLD 3: Prøve 2, 4 og 6; HOLD 4: Prøve 2. Tre isolater fra 3 prøveudtagninger og 2 grupper havde ribotypen C. Fire isolater (fra to grupper og to prøveudtagninger) havde ribotypen E. Ti isolater havde ribotypen I (alle isolater stammede fra den samme prøveudtagning og fra samme hold). Hver af ribotyperne H, J og N fandtes hos to isolater, mens de resterende ribotyper hver inkluderede 1 isolat.

De 11 *Vibrio splendidus*-lignende (Vs) isolater kunne inddeles i 10 ribotype-grupper.

Gruppen af *Vibrio alginolyticus*-lignende bakterier (Valg) bestod af 24 isolater, der kunne inddeles i 4 ribotype-grupper, hvor 21 isolater havde den samme ribotype. Denne ribotype var meget lig ribotypen for typestammen ATCC 33838. Isolater med denne ribotype kunne først isoleres efter første prøvetagningsuge men herefter ved hver prøvetagning og er fundet i hvert af de 4 hold fra intensive opdrætssted samt i holdet fra det ekstensive opdrætssted. Effekten af *Vibrio alginolyticus* på muslingeoverlevelse er undersøgt for blåmuslinger (*Mytilus galloprovincialis*) i Mexico (Anguiano-Beltrán et al. 2004). Her blev det ud fra et 2 dages eksperiment vist, at der ikke var den store forskel på larveoverlevelse i grupper med forskellige *V. alginolyticus*-tætheder, mens der var stor forskel på normaliteten. Graden af larver med normal udvikling var lavere, jo højere den bakterielle koncentration var. Havde eksperimentet strakt sig over en længere periode, må man formode, at dette havde influeret på overlevelsen. Man kan forestille sig, at vi i vores

undersøgelse ser en højere og højere koncentration af *V. alginolyticus* i forhold til andre bakterier igennem prøvetagningsperioden, og når ligevægten mellem forskellige arter forskubbes, kan det føre til øget yngeldødelighed.

Virologiske undersøgelser 2006

Prøver fra følgende prøvetagninger og hold blev sendt til CRL for PCR-undersøgelse for virus

Arbejdspakke 1:

Alle 4 prøver fra VENØ (nummereret prøve 1 til 4)

Alle 5 prøver fra HOLD 1 (nummereret 1 til 5)

Alle 6 prøver fra HOLD 3 (nummereret 1 til 6)

Arbejdspakke 2:

I alt 3 prøver: prøve 2, 4 og 6

Resultatet viste, at prøve 3, 4 og 5 fra HOLD 1 var inficeret med en variant af østers herpesvirus type 1 (OsHV-1). Lignende resultater er set før hos larver af forskellige bivalve species (*Crassostrea gigas*, *Ruditapes philippinarum* og *Pecten maximus*) (Arzul et al. 2001a; Arzul et al. 2001b). Iflg. CRL er det ikke første gang at europæisk flad østers er fundet til at være inficeret med OsHV-1, og det er ikke første gang at denne variant er fundet (Renault & Arzul 2001). Normalt detekteres OsHV-1 i forbindelse med dødelighed hos larver og spat. Disse dødeligheder optræder efter at ynglen er blevet stresset (håndtering, temperaturforøgelse osv.). En forklaring på at virus findes hos HOLD 1 men ikke HOLD 3 kunne være at HOLD 1 er blevet overført ved højere temperaturer end HOLD 3, eller måske har håndteringen været anderledes. PCR metoden er sensitiv, men meget lavgradige infektioner kan dog blive overset. Så det er muligt at OsHV-1 er til stede hos HOLD 3, men at infektionsniveauet er meget lavt. Det samme kan være tilfældet med prøverne fra VENØ.

Konklusion

V. anguillarum-lignende bakterier og *V. splendidus*-lignende bakterier blev fundet i hele prøvetagningsperioden, mens *V. alginolyticus*-lignende bakterier først blev fundet efter første uges prøvetagning og derefter i den resterende del af perioden. Ingen klar sammenhæng mellem isoleringen af *Vibrio* species og yngeldødelighed såvel som opdrætsmetode blev fundet. *Vibrio*-arten *V. alginolyticus* regnes normalt ikke for at være patogen, og den blotte tilstedeværelse af bakterien vil ikke resultere i dødelighed. Dog kan muligheden for at den observerede dødelighed skyldes en gradvis øgning i procentdelen af *V. alginolyticus* blandt bakteriefloraen i miljøet samt at denne art når op på en tilpas høj koncentration ikke afvises.

Ribotypningskarakteriseringen viser, at gruppen med *V. alginolyticus*-lignende bakterier er noget mere ensartet end de to andre bakteriegrupper.

Virologiske undersøgelser har ikke kunnet hverken be- eller afkræfte muligheden for, at østers herpesvirus type 1 kan være skyld i den observerede dødelighed hos østersyngel.

Det er nødvendigt at få afklaret, om de isolerede bakterier er patogene bakterier eller miljøbakterier. Det kan ikke afvises, at den stigende *V. alginolyticus* forekomst gennem prøvetagningsforløbet dækker over, at mere patogene bakterier får adgang til ynglen og dermed fører til en øget dødelighed. Undersøgelse har vist, at der er brug for andre metoder end de anvendte til identifikation af *Vibrio*-arterne.

Ved bakteriologisk undersøgelse af vandfiltrerende organismer som østers vil den normale bakterielle vandflora også blive påvist. Det vil derfor være relevant at udføre nogle eksperimentelle forsøg med de isolerede bakterier for at afklare eventuelle sygdomsfremkaldende egenskaber hos de pågældende bakterier. Sådanne eksperimenter kræver dog at man har nogle levedygtige østerslarver der kan indgå i forsøget.

Referencer

- Anguiano-Béltran C, Lizárraga-Partida ML & Searcy-Bernal R (2004). Effect of *Vibrio alginolyticus* on larval survival of the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 59, 119-123
- Arzul I, Renault T, Lipart C & Davison A (2001a). Evidence for interspecies transmission of oyster herpesvirus in marine bivalves. *Journal of General Virology* 82, 865-870
- Arzul I, Nicolas JL, Davison AJ & Renault T (2001b). French scallops: a new host for ostreid herpesvirus 1. *Virology* 290, 342-349
- Brown C (1973). The effects of some selected bacteria on embryos and larvae of the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Journal of Invertebrate Pathology* 21, 215-223
- Brown C (1981). A study of two shellfish-pathogenic *Vibrio* strains isolated from a Long Island hatchery during a recent outbreak of disease. *Journal of Shellfish Research* 1, 83-87.
- Gay M, Renault T, Pons A-M & Le Roux F (2004b). Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. *Diseases of Aquatic Organisms* 62, 65-74
- Gay M, Berthe F & Le Roux F (2004a). Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms* 59, 49-56
- Hovgaard P, Mortensen S & Strand Ø (2001). Skjell – biologi og dyrkning. Kystnæringen Forlag og Bokklubb, Bergen. Kap. 2: Biologi: Skjellsykdommer ss. 72-91
- Paillard C, Le Roux F & Borrego JJ (2004). Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. *Aquatic Living Resources* 17, 477-498
- Renault T & Arzul I (2001). Herpes-like virus infections in hatchery-reared bivalve larvae in Europe: specific viral DNA detection by PCR. *Journal of Fish Diseases* 24, 161-167

Appendix 2 (Sammenligning af ekstensive og intensive opdrætsmetoder)

Forsøgsforløbet. DSC VFF forsøget

Forsøget blev gennemført i juni 2006.

Der blev gennemført opdræt ved hhv. den ekstensive (VFF) og den intensive (DSC) metode. Østers som indgik i forsøget var fra samme batch. Der gennemføres prøvetagningsprogram under larvefasen for identifikation samt kvantificering af hhv. patogene bakterier og virus på de to lokaliteter.

Forsøgene blev indledt ved at 150 stk. moder østers blev fisket i Nissum Bredning og overført til en klækkefacilitet ved VFF.

Larver blev opsamlet dagligt. Der blev gennemført daglig tælling af antal larver.

En portion bestående af ca. 10.000 larver blev overført til DSC's opdrætsfaciliteter d. 15. juni, og de resterende ca. 50.000.000 larver blev bibeholdt i VFF's produktionsfaciliteter efter det traditionelle VFF-system.

Under larvefasen blev der gennemført et prøvetagningsprogram med jævnlige prøvetagninger for virus- og bakterier indtil larvebestanden dør ud eller settling finder sted.

Forsøget blev påbegyndt d. 14. juni 2005. Det blev dog først overført larver til DSC d. 15. juni.

Venø fishfarms produktionsmetode er baseret på et mesokosmossystem hvor biosuccessionen manipuleres ved manipulation af næringsindhold samt græsningstryk. Vand pumpes direkte fra Limfjorden indeholdende mikroalger. Det filtreres gennem en 60 my dug som hindrer fiskeæg og større mængder zooplankton i at påvirke systemet. Systemet består af 6 stk. jorddamme forsynet med plastliner. Dammene er koblet sammen med et rør- og filtersystem som gør det muligt at pumpe vand mellem dammene samt filtrere dette vand. Herved er det muligt at føre eksempelvis næringsrigt vand fra en dam til en dam med underskud af næring, eller zooplankton fra nogle damme til andre. Grundideen i biomanipulationen er at vandsøjlen grundet den begrænsede vanddybde holdes i den fotiske zone og derved omsætter vandets næringindhold til planteplankton. Dette udnyttes af zooplankton som opformerer ganske som i forårsopblomstringen i vore farvande. Biomanipulationen skal efterfølgende sikre at systemet bibeholdes stabilt ved styring af det kvantitative forhold mellem de trofiske niveauer.

Ved VFF gennemførtes produktionsforløbet ved at en dam gradvist blev fyldt med havvand. Der tilstræbtes en høj planteplanktonproduktion samt en høj planteplanktonbiomasse. Etablering af et græsningstryk fra zooplankton sikrede regenerering af næringsstoffer således at biomassefluktuationer mindskedes. Produktionsforløbet gennemførtes uden mulighed for betydelig justering af konditionerne.

Ved DSC anvendtes 6 tanke á 400 liter. Det anvendte havvand blev filtreret til 0,45 my og der anvendtes mikroalger af arterne Chaetoceros, Isochrysis og Tetraselmis i forholdet 83:33:3,3

baseret på antal. Det blev tilstræbt en algetæthed på 100.000 mikroalger pr ml. Algesammensætningen opnåedes ved at opblende alger fra den intensive algeproduktion efter antals-estimation på partikeltæller.

I begge systemer blev der taget prøver med henblik på estimering af vækst og overlevelse. Yderligere blev der indsamlet prøver til diagnosticering af årsager til mortalitet forårsaget af virus eller bakterier.

Prøvetagningen fulgte nedenstående procedure

Vandkemiske prøve

- Temperatur måles på samme sted og samme tid dagligt
- Ilt måles på samme sted og samme tid dagligt
- pH måles på samme sted og samme tid dagligt
- Chlorophyl prøver tages ved at filtrere 2x50 ml vand fra tank/dam igennem et GF/C filter. Filteret overføres med pincet til reagensglas og der tilsættes 10 ml ethanol. Der laves duplikat prøver. Prøverne sættes i køleskab og dagen efter fryses de ved -20°C til de kan overføres til DSC eller Hirtshals. Ethanolen fryser som bekendt ikke ved -20°C, og glassene skal derfor stå oprejst under opbevaringen.

Prøvetagning af larver til vækstmålinger

- Der indsamles minimum 10 larver pr dam/tank pr dag (gerne 100)
- Larverne skylles med saltvand over i et reagensglas (10 ml)
- Der tilsættes en dråbe lugol.
- Der sættes låg på reagensglasset
- Der skrives sted (Venø/DSC) samt dato på glasset
- Prøverne behøver ikke at blive opbevaret på køl.
- Prøverne skal senere til DSC eller Hirtshals

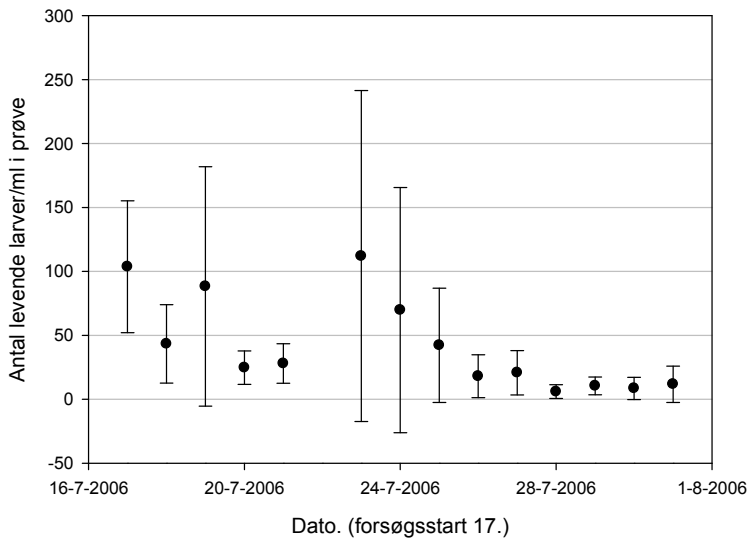
Prøver til bakteriologiske samt virulogiske undersøgelser

- Der indsamles minimum 100 larver pr dam/tank pr prøvetagning (gerne 1000)
- Larverne skylles med 0,2µ filtreret saltvand over i et reagensglas (10 ml)
- Der skrives sted (Venø/DSC) samt dato på glasset
- Prøverne opbevares i køleskab til de samme dag kan sendes til KVL (Inger Dalsgaard)
- Prøverne pakkes i isoleret materiale og kølelegeme lægges ved
- I det tilfælde hvor der skal tages prøver af gydebeholderen (dag 0), sendes blot 10 ml vand fra beholderen sammen med reagensglasset med larver til KVL.

Resultaterne af forsøgene ved DSC viste meget høj variation mellem de 6 tanke som forsøgene blev gennemført i. Prøvetagningens store usikkerhed illustreres af den tilsyneladende pludselige øgning i antal larver fra den 21. juli til den 23. juli. I denne periode øgedes antallet af larver tilsyneladende fra omkring 25 larve/ml prøve til over 100 larver pr. ml prøve. Dette er selvsagt ikke muligt i det der ikke blev tilført larver til systemet i denne periode. Det generelle billede er dog en reduktion af

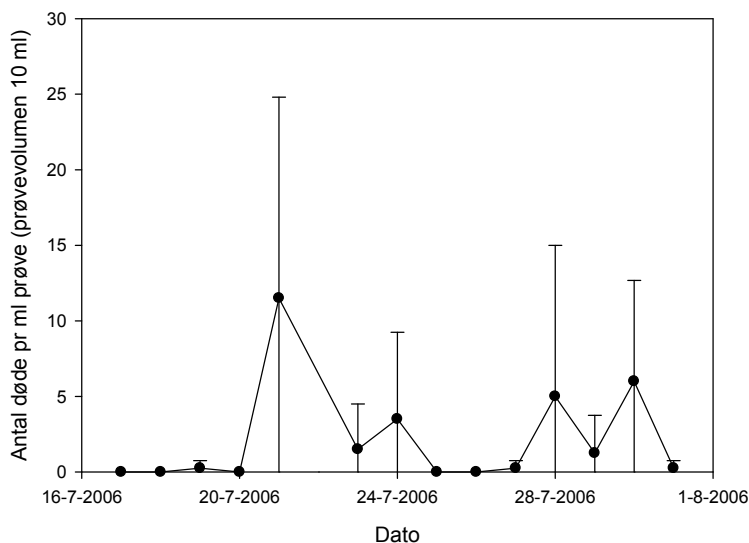
larver fra de initiale omkring 100 pr. prøve til omkring 107 prøve i løbet af forsøgsperioden som strakte sig fra d. 16. juli til d. 29. juli.

Gennemsnit af antal levende larver i kar nr. 1-6 DSC



Antallet af døde larver blev ligeledes estimeret i prøverne. Dette blev forsøgt idet larvernes skaller ikke nedbrydes så hurtigt som bløddelene, og derfor burde være synlige i prøvetagningsmaterialet som løse skaller. Der blev også fundet talrige tomme skaller, men det viste sig ikke at være muligt at anvende disse antal i som udtryk for totalt antal larver som var døde i perioden. Dette skyldes dels at et stort antal skaller blev ført tilbage i kulturtankene med larverne og derved ville tælle med i de efterfølgende prøvetagninger og dels at der tilsyneladende forsvandt skaller fra vandet. Det må konkluderes at antal døde larver kun kan tjene som indikation på perioder med særlig høj dødelighed i kulturerne.

Venø-DSC forsøg
Data fra DSC
Antal døde pr ml prøve (prøvevolumen 10 ml)



Prøvetagning på Venø fish farm bestod af nedenstående:

Standard prøvetagning

1. Prøvetagning af larver til vækstmålinger
2. Prøvetagning af larver til bakteriologiske samt virulogiske undersøgelser
3. Temperatur
4. Ilt
5. pH
6. Prøvetagning samt filtrering til chlorophylanalyser

Prøvetagningen i lagunerne var vanskelig at gennemføre således at den udtrykte antallet af larver i lagunen. Prøvetagningen blev gennemført ved at nedsænke en dykpumpe i vandet og lade den pumpe et på forhånd kendt volumen vand op igennem et filter. Under prøvetagningen blev pumpen gradvis trukket nede fra bunden og op mod vandoverfladen for at vandprøven skulle repræsentere hele vandsøjlen. Prøvetagningen blev gennemført på 3 lokaliteter, med henblik på at kompensere for eventuelle patchdannelser af østerslarver i lagunen.

Oversigten over produktionsforløbet ved Venø Fish Farm

Dato	Dag	Temp. °C	O ² %	pH	Mill. Larver
10/07/2006	-4	20.3	99		
11/07/2006	-3	19.6	91		
12/07/2006	-2	20.0	95		
13/07/2006	-1	19.9	93		
14/07/2006	0	20.7	115	8.01	6
15/07/2006	1	21.3	113	8.03	4
16/07/2006	2	23.7	113	8.03	
17/07/2006	3	24.1	111	8.05	6
18/07/2006	4	24.3	110	8.07	
19/07/2006	5	25.0	109	8.08	12
20/07/2006	6	26.0	112	8.23	
21/07/2006	7	25.3	104	8.26	
22/07/2006	8	23.8	101	8.30	7
23/07/2006	9	23.0	105	8.36	5
24/07/2006	10	23.0	107	8.38	12
25/07/2006	11	24.5	111	8.37	
26/07/2006	12	25.0	112	8.33	14
27/07/2006	13	25.7	118	8.35	
28/07/2006	14	25.7	117	8.20	5
29/07/2006	15	25.1	125	8.38	
30/07/2006	16	24.9	129	8.43	0
31/07/2006	17	25.1	130	8.43	0
01/08/2006	18	23.0	119	8.40	0
02/08/2006	19	22.8	117	8.38	0

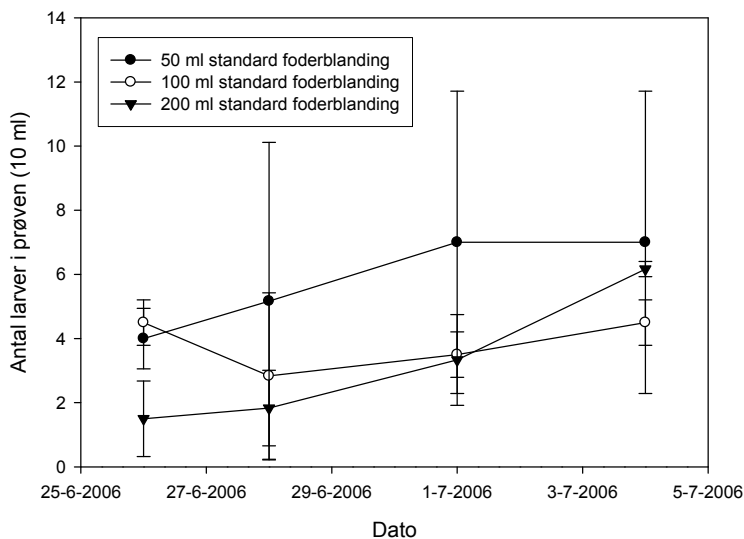
Appendix 3 (Foderintensitet)

Forsøget blev gennemført i forsøgsanlægget på DSC (Figur 1).

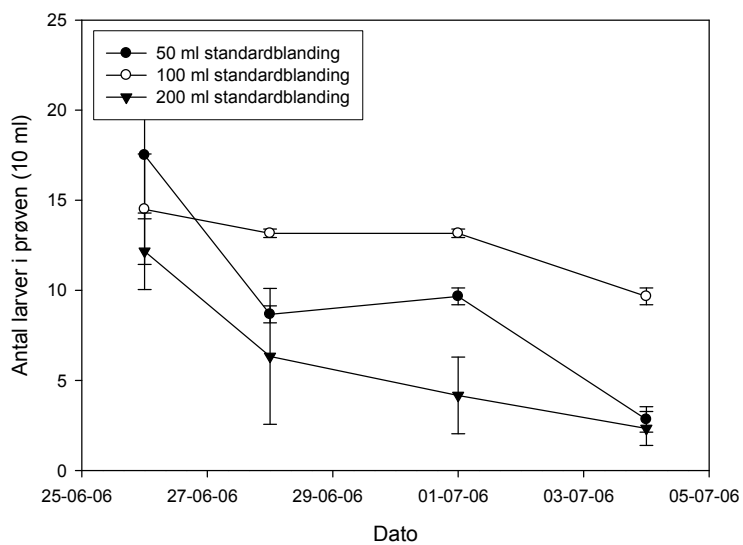
Der blev afprøvet 3 foderintensiteter bestående af et standardiseret forhold mellem de 3 anvendte mikroalgeslægter hhv. Isochrysis, Tetrasalmis og Chatoceros. Resultaterne er karakteriseret ved store standardafvigelser og det er derfor vanskeligt at konkludere om foderintensiteterne havde en betydning. Der blev konstateret settling i de 2 flasker med den midterste foderkoncentration og dette kan derfor indikere at denne koncentration har haft bedst indflydelse på larvernes vækst og overlevelse

Forsøg 2. Foderintensitet

Fodermængde (2a)
Døde østers i prøven



Fodermængde (2a)
 Levende larver i prøven

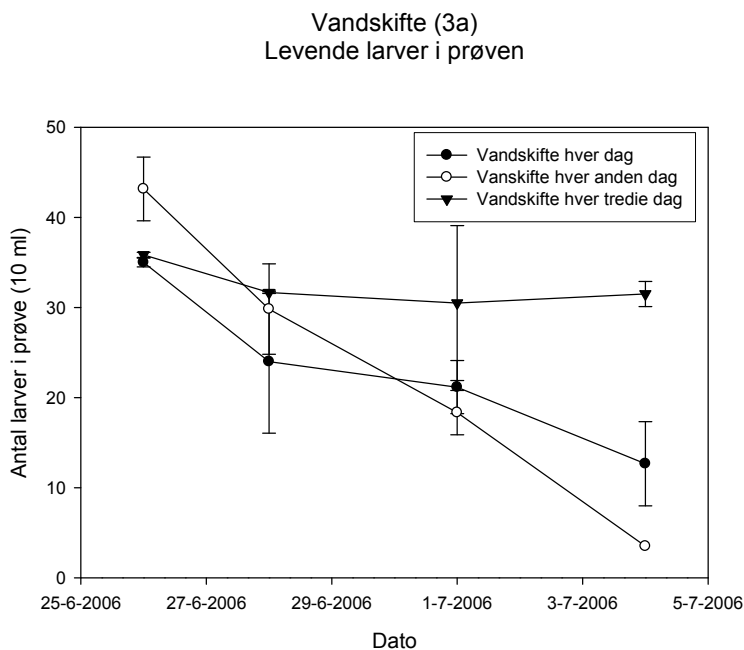


Appendix 4 (Vandskifte)

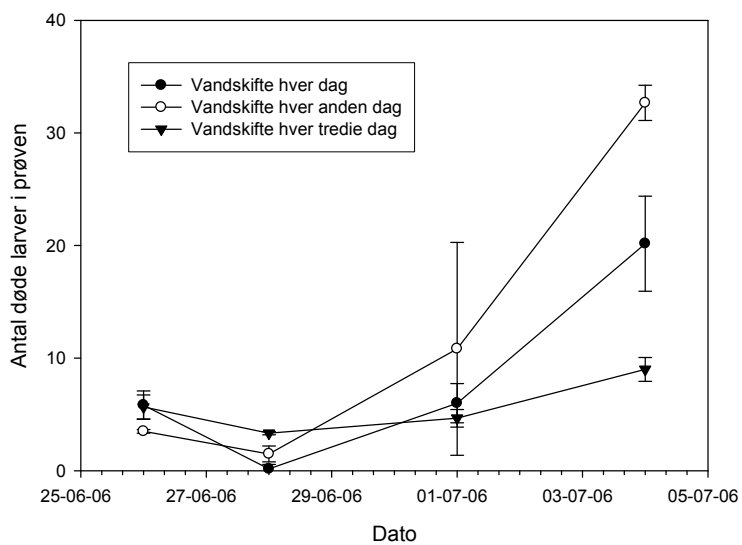
Der blev gennemført 4 forsøg til belysning af effekten af vandskifte. Forsøgene blev gennemført i det lille forsøgsanlæg med de forseglede flasker og havde til formål at vise hvilken vandskiftesfrekvens der fungerede bedst. Vandskiftet er en helt nødvendig procedure for at hindre bakterieopblomstring. Fjernelse af affaldsstoffer fra vandet reducerer bakteriernes næringsgrundlag. Vandskiftet foregår ved at lade vandet fra kulturen passere et filter som tilbageholder larverne. De fysiske påvirkninger af larverne kan reducere larvernes efterfølgende vækst og overlevelse. Dette blev belyst i 4 på hinanden følgende eksperimenter.

Forsøg 1

Forsøgene herunder viser at der er en tilsyneladende negativ effekt af filtreringen idet larverne som kun bliver filtreret hver 3 dag har den laveste mortalitet, efterfulgt af larverne som filtreres hver anden dag. Larverne med den højeste mortalitet er dem som filtreres hver dag.



Forsøg 3a. Vandskifte

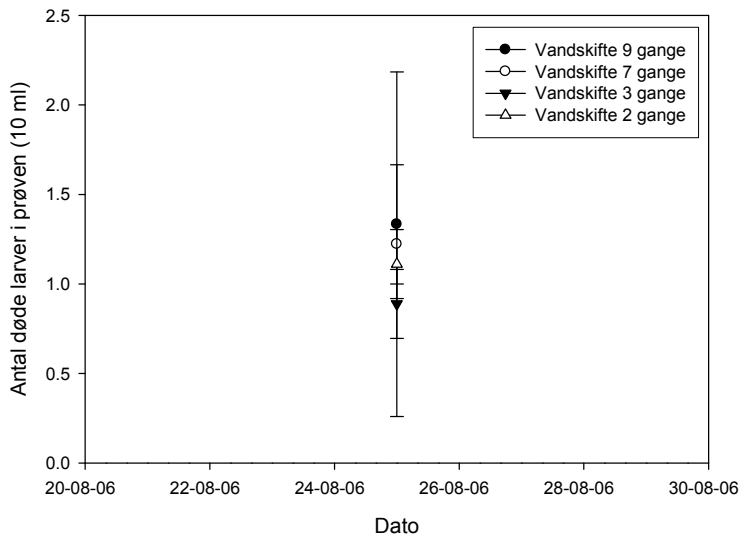


Forsøg 2

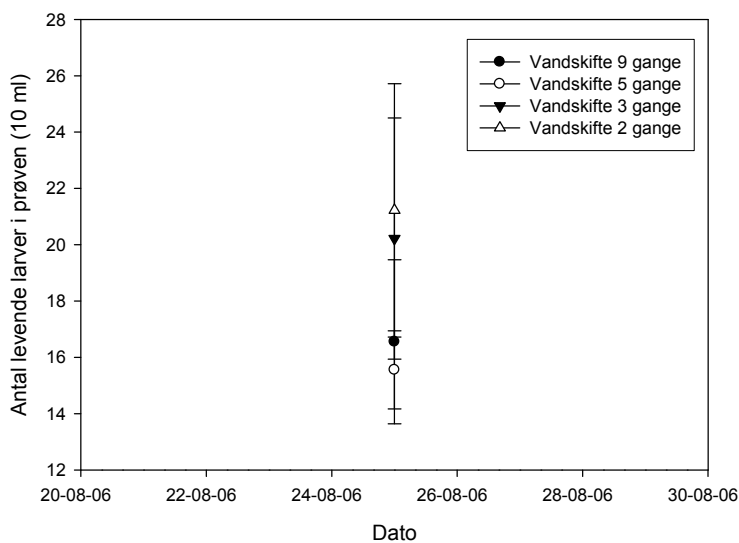
Forsøget med larvernes overlevelse som funktion af antallet af gange de var blevet filtreret gennem larvefasen viste at der var en tendens til at kulturer som var blevet filtreret mange gange (7 og 9) også havde den højeste mortalitet sammenlignet med kulturer som var blevet filtreret færre gange (2 og 3 gange). Der var dog kun tale om tendenser og forsøget blev kun fulgt op af en enkelt prøvetagning.

Forsøg 3c. Vandskifte

Vandskifte (3c)
Døde larver i prøven



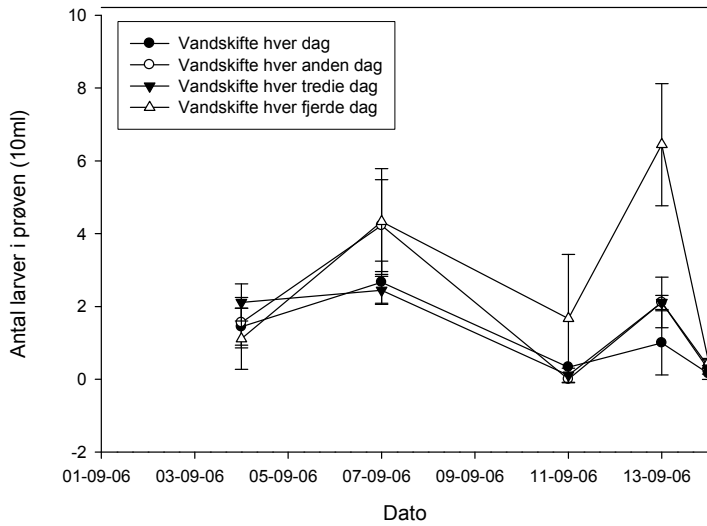
Vandskifte (3a)
Levende larver i prøven



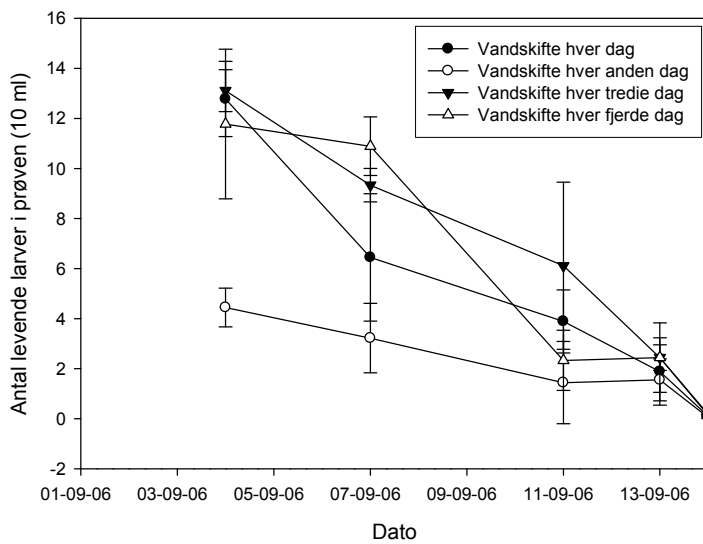
Forsøg 3

Nedenstående forsøg må betragtes som mislykket idet der var forskel på antallet af larver ved forsøgets begyndelse og alle larverne døde

Vandskifte (3d)
Døde larver i prøven



Vandskifte (3d)
Levende larver i prøven

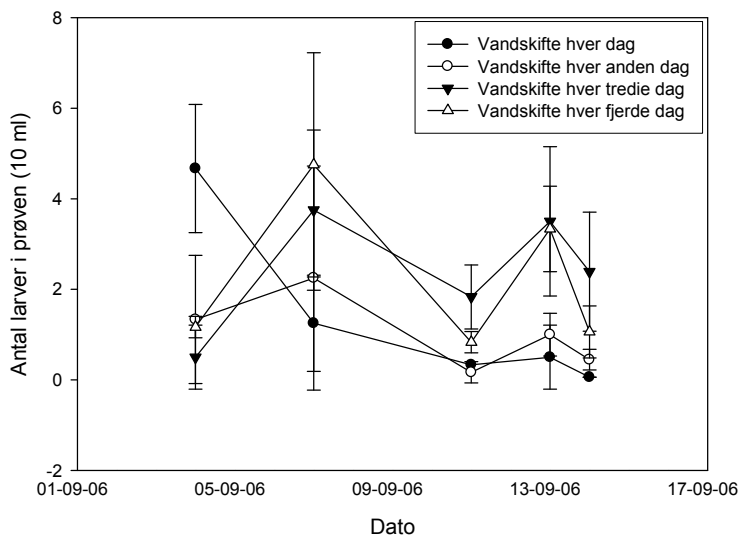


Forsøg 4

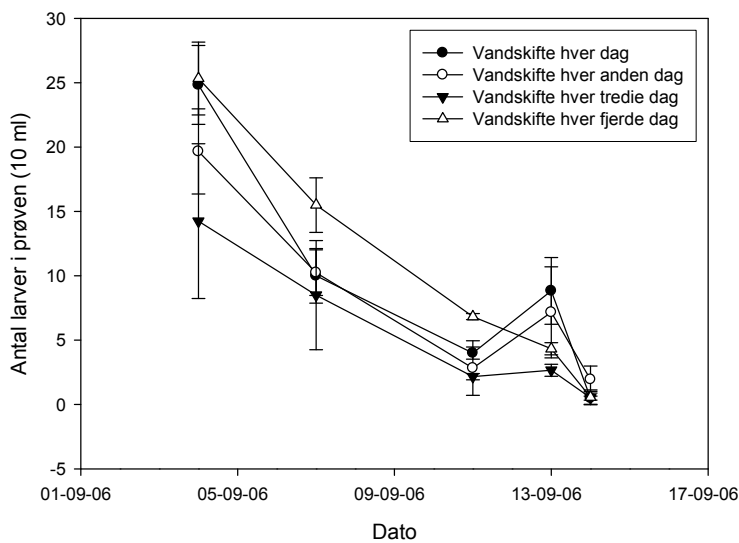
Forsøget viser ikke et entydigt resultat idet der tilsyneladende er samme mortalitet i alle flasker på tværs af behandlingsmetoden. Konklusionen må derfor være at der ikke er en forskel på effekten af vandskiftet hhv. hver dag, hver anden dag, hver tredje dag eller hver fjerde dag.

Forsøg 3e. Vandskifte

Vandskifte (3e)
Døde larver i prøven



Vandskifte (3e) lab
levende larver i prøven



Appendix 5 (Forsøg med forskellig vandbehandling)

Forsøg med forskellig vandbehandling

I alt blev der opsat 6 flasker med larver i dette forsøg. To flasker med vand fra en moderdyrstank, to flasker med vand fra slangen i algerummet (alm. fjordvand) og to flasker med 0,2 µm filtreret vand (se nedenstående tabel).

Flaske	Behandling
1	Vand fra moderdyrtank
2	Vand fra moderdyrtank
3	alm fjordvand
4	alm fjordvand
5	Filtreret fjordvand (0,2 µm)
6	Filtreret fjordvand (0,2 µm)

Forsøget er sat op med ca. 15 larver per ml dvs. en startpopulation på ca. 45.000 individer i 5 liters flasker fyldt med 3 liter vand. Vandet fra moderdyrstanken er filtreret gennem et 80 µm filter for at undgå de største partikler og eventuelle larver i vandet.

Der blev udtaget prøver (3x 10 ml) ved opsætning af forsøget og ved vandskiftet hver anden dag.

Fodermixet bestod af Isochrysis og lidt Tetraselmis da Chaetoceros'en stadig ikke var kommet op at køre. Der blev fodret med 150 ml hver dag.

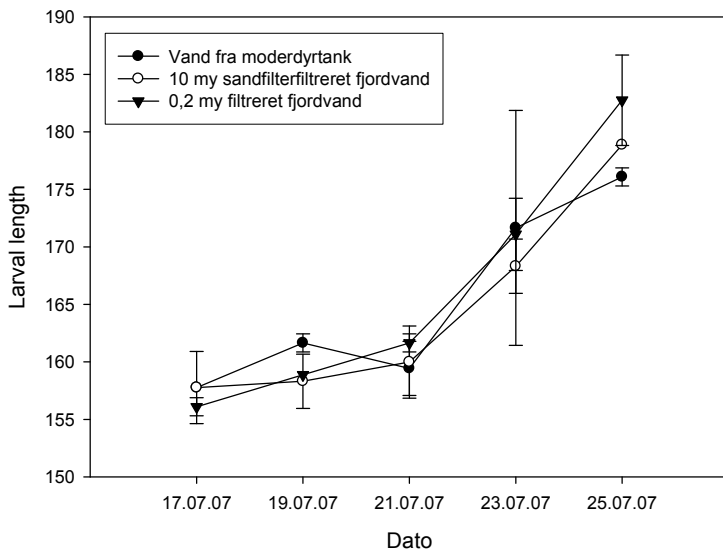
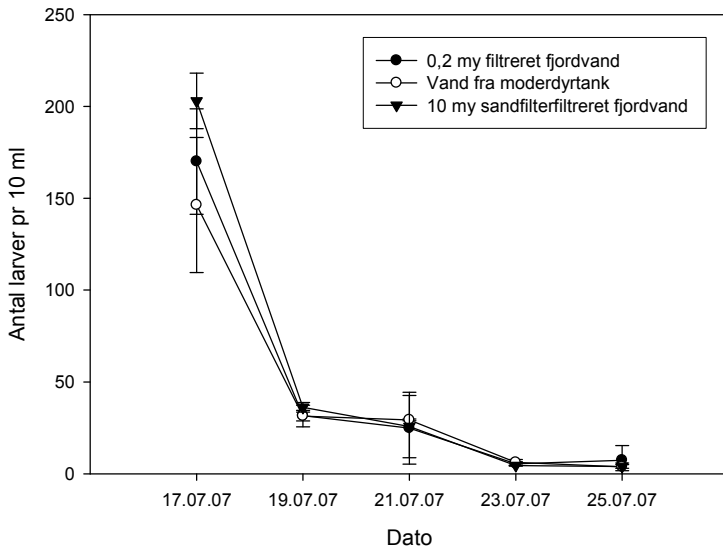
Noter

17/7-07: Ved opsætning af forsøget svinger det gennemsnitlige antal af larver per ml noget. Men larverne ser aktive og mørke ud.

19/7-07: Allerede efter 2 dage er antallet af larver per ml faldet drastisk helt ned til mellem 16 og 50 per 10 ml. og der er rigtigt mange tomme skaller.

25/7-07: Antallet af larver per 10 ml er meget lavt i alle flasker og langt under det succesestimat på 5 % overlevelse som vi har sat. Derudover er larverne kun vokset et par streger i løbet af 8 dage, vi har derfor valgt at afslutte forsøget.

Konklusion: Højest sandsynligt ikke nok eller for dårlig føde.



Standardafvigelseerne er mellem tankene og ikke mellem individerne

Appendix 6 (Kemostatforsøg)

Kemostatforsøg

Formålet med forsøget var at holde larverne i ”samme flaske med samme vand” for bl.a. at håndtere dem mindst muligt og samtidig undgå forureningskilder i nye flasker. Desuden at holde dem i deres ”eget” miljø.

Alt blev autoklaveret inden brug.

To 10 liters flasker med 6 liter 0,2 µm filtreret vand fra slangen i algerummet blev sat op med ca. 15 larver per ml dvs. en startpopulation på ca. 90.000 larver.

Der blev monteret en maskinel udskiftning af ca. 6 liter vand i døgnet. Vandet var 0,2 µm filtreret vand fra slangen i algerummet. Føden var en blanding af 1400 ml cha., 600 ml iso og lidt tet. Og der blev til hver vandudskiftningsflaske tilsat 700 ml af denne blanding. Der blev sat rene flasker op med udskiftningsvand inklusiv føde hver dag.

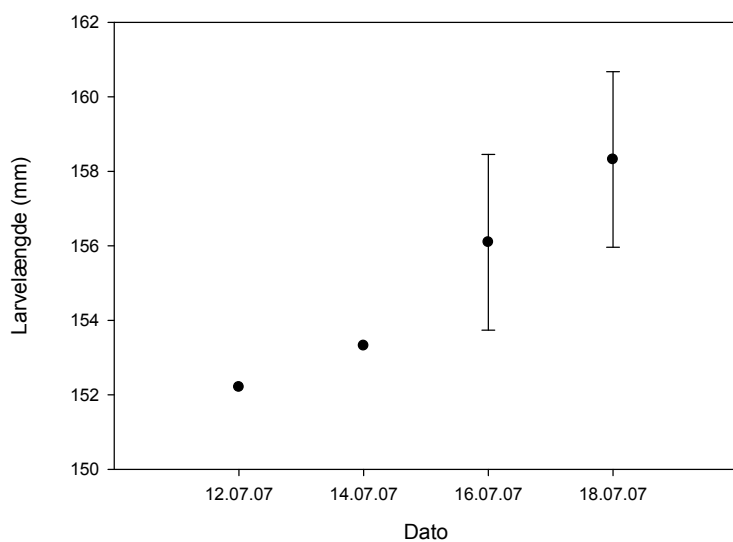
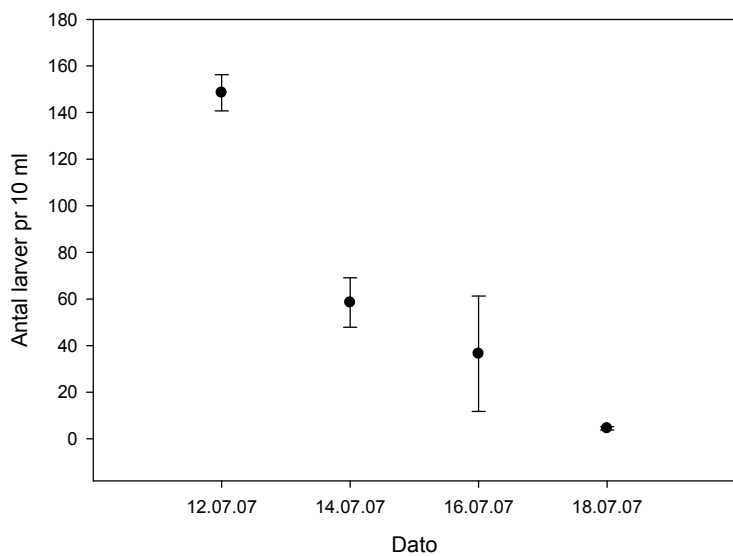
Prøvetagning foregik på selv dagen hvor kemostatforsøget blev sat op og herefter hver anden dag.

Noter:

12/7-07: antallet af larver i flaskerne passer meget fint med gennemsnitligt 15 larver per ml.

14/7-07: antallet af larver falder drastisk og der er mange tomme skaller. Desuden lugtede vandet grimt i flaskerne.

18/7-07: Mængden af larver i flaskerne er nede på 0,5 og 0,4 larve per ml. Da larverne ikke vokser og mængden er under grænsen for succeskravet på 5 % så har vi valgt at afslutte forsøget.



Appendix 7 (Salinitetsforsøg)

Salinitetsforsøg

Der blev lavet duplikater af tre behandlinger: 5 ppt lavere end fjordvand, fjordvand, 5 ppt højere end fjordvand. I alt 6 flasker.

Alm. fjordvand var på basis af vand fra slangen i algerummet. Der blev benyttet demineraliseret vand til at sænke saliniteten og alm. Kogsalt til at øge saliniteten.

Der blev fremstillet en 150 ppt NaCl-stamopløsning ved at tilsætte 150 gram NaCl til en liter vand. For at fremstille flasker til larverne med en 5 ppt højere salinitet blev der afmålt 200 ml af stamopløsningen til 5,8 L vand. Hvorefter saliniteten blev målt. Hvis denne svarede til en 5 ppt højere salinitet end alm. fjordvand blev opløsningen hældt på 2 flasker med hver 3 L. Hvis saliniteten ikke stemte overens – blev den justeret enten med saltopløsningen eller ved hjælp af demineraliseret vand.

For at fremstille vand med en salinitet på 5 ppt mindre end alm. fjordvand blev der tilsat 1 liter demineraliseret vand til 5 liter fjordvand. Saliniteten blev herefter målt og justeret hvis nødvendigt.

Der blev skiftet vand hver anden dag og der blev hver dag fodret med 2 gange 300 ml af udelukkende iso og tet da cha var gået ned.

Forsøgene blev sat op med ca. 15 larver per ml dvs. 45.000 larver per flaske.

Prøvetagningen foregik ved opstart og herefter hver anden dag. Der blev udtaget 3 gange 10 ml med den gængse prøvetagningsmetode (beskrevet andet sted). Larverne blev talt og der blev målt størrelse på 10 larver.

I dette forsøg blev der yderligere sat en 7. flaske op. Formålet med denne flaske var at se om selve larveudtagningen ved opstart af forsøget samt håndtering gennem forsøget har en fatal effekt på larverne.

Flasken blev sat op med almindeligt fjordvand og larverne blev overført straks efter udtagningen fra moderdyrenes tank uden at blive talt. Der blev udtaget en prøve ved opstart af forsøg og herefter blev de kun håndteret, når det var nødvendigt at skifte flaske.

Noter

25/7-07: antallet af larver per 10 ml ved opstart svinger utroligt meget (meget mere end ved foregående forsøg) både indenfor den enkelte flaske men også mellem flaskerne.

27/7-07: der er allerede en stor dødelighed i alle flaskerne.

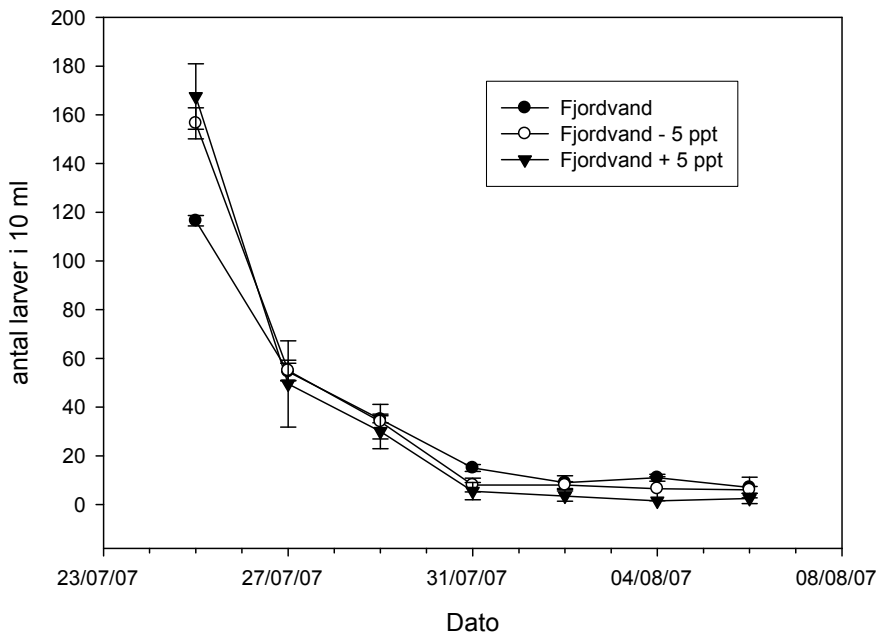
29/7-07: igen en stor dødelighed i flaskerne men larverne begynder at vokse.

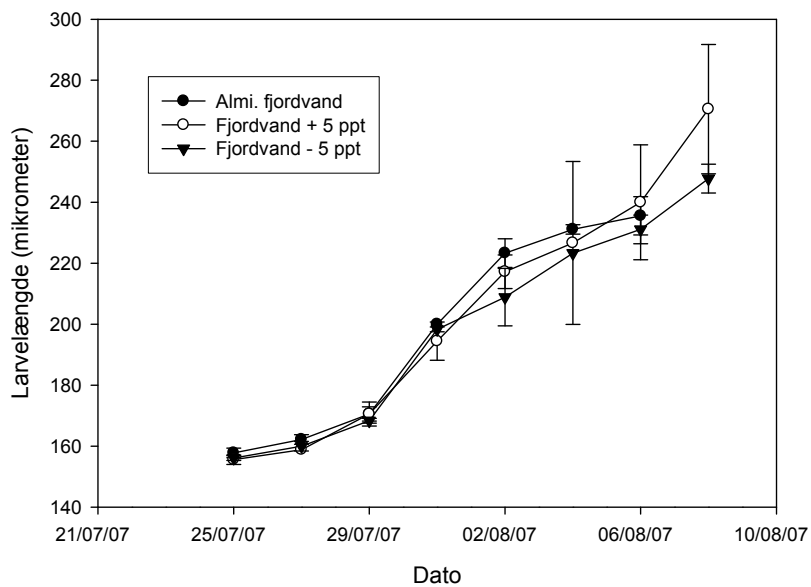
31/7-07: Meget få larver tilbage i prøverne mellem 0,1 og 2 larver per ml. Vi vælger dog at lade forsøget køre, da de larver der er, vokser meget fint og er store, mørke og aktive.

8/8-07: Der er ikke flere larver tilbage i flaskerne, så forsøget bliver afsluttet. Det ser dog ud til at larverne lige er døde, da man stadig kan se øjeplet og de er forholdsvis mørke.

Tabel med saliniteten målt i ‰ gennem forsøget. Saliniteten er målt i de nyskiftede flasker.

Dato	Alm. Fjordvand	Lav salinitet	Høj salinitet
25.07.07	31	25	35
27.07.07	30	24	35
29.07.07	32	27	36
31.07.07	32	27	38
02.08.07	31	25	36
04.08.07	33	28	38
06.08.07	31	26	35





Appendix 8 (Sterilitetsforsøg)

Sterilitetsforsøg

Forsøget blev sat op med 6 flasker alm. fjordvand fra slangen i algerummet, hvor 3 af flaskerne havde vandskifte hver dag og de 3 andre havde vandskifte hver anden dag. Seks andre flasker blev sat op hvor alt, både flasker, slanger, låg, vand osv. blev autoklaveret. Her var der ligeledes 3 flasker med vandskifte hver dag og 3 flasker med vandskift hver anden dag (se nedenstående tabel).

Flaske	Behandling
1	alm vand - vandskifte hver dag
2	alm vand - vandskifte hver dag
3	alm vand - vandskifte hver dag
4	alm vand - vandskifte hver anden dag
5	alm vand - vandskifte hver anden dag
6	alm vand - vandskifte hver anden dag
7	Sterilt vand - vandskifte hver dag
8	Sterilt vand - vandskifte hver dag
9	Sterilt vand - vandskifte hver dag
10	Sterilt vand - vandskifte hver anden dag
11	Sterilt vand - vandskifte hver anden dag
12	Sterilt vand - vandskifte hver anden dag

Forsøget blev sat op med 15 larver per ml, dvs. der var en startpopulation på ca. 45.000 larver i flaskerne.

Der blev udtaget prøver ved forsøgets start og herefter ved hvert vandskifte. Der blev udtaget 3 x 10 ml med den gængse metode (beskrevet andet sted) og i hver af de 3 prøver blev antallet af larver talt og størrelsen af 10 larver blev målt.

Ved vandskifte af flaskerne med sterilt vand blev der skiftet låg på flaskerne. Yderligere var det vand der var i sprøjteflaskerne sterilt.

Der blev fodret med den normale foderblanding (chatoceros var allerede her begyndt at køre dårligt, så det var isochrysis der var den primære foderalge). Mængden af foder blev sat til 150 ml per dag.

Noter:

26/6-07: Alle larverne fra forsøget er fra d. 23/6-07. Larverne ser fine og delvist mørke ud.

28/6-07: Vandet fra flaskerne med sterilt vand "lugter" (af fisk).

29/6-07: Flaske 7, 8 og 9 vandet lugter og larverne ser ikke for godt ud.

30/6-07: god aktivitet i vandfasen. Flotte, ensartede, mørke larver.

2/7-07: Generelt ser flaske 7 -12 ringe ud. En del døende/nydøde.

3/7-07: Alle flasker med klart vand = alger spist op(?).

6/7-07: Larveantallet i flaskerne er faldet meget og de er ikke vokset ret meget.

7/7-07: Det er blevet besluttet at afslutte forsøget da larverne i løbet af 12 – 13 dage ikke er vokset mere end et par streger. Larverne skulle i løbet af 12 dage være så store, at de ville være klar til at settle, men der er ingen larver med fod eller øjeplet.

En evt. konklusion kunne være at mængden af mad er for lille.

