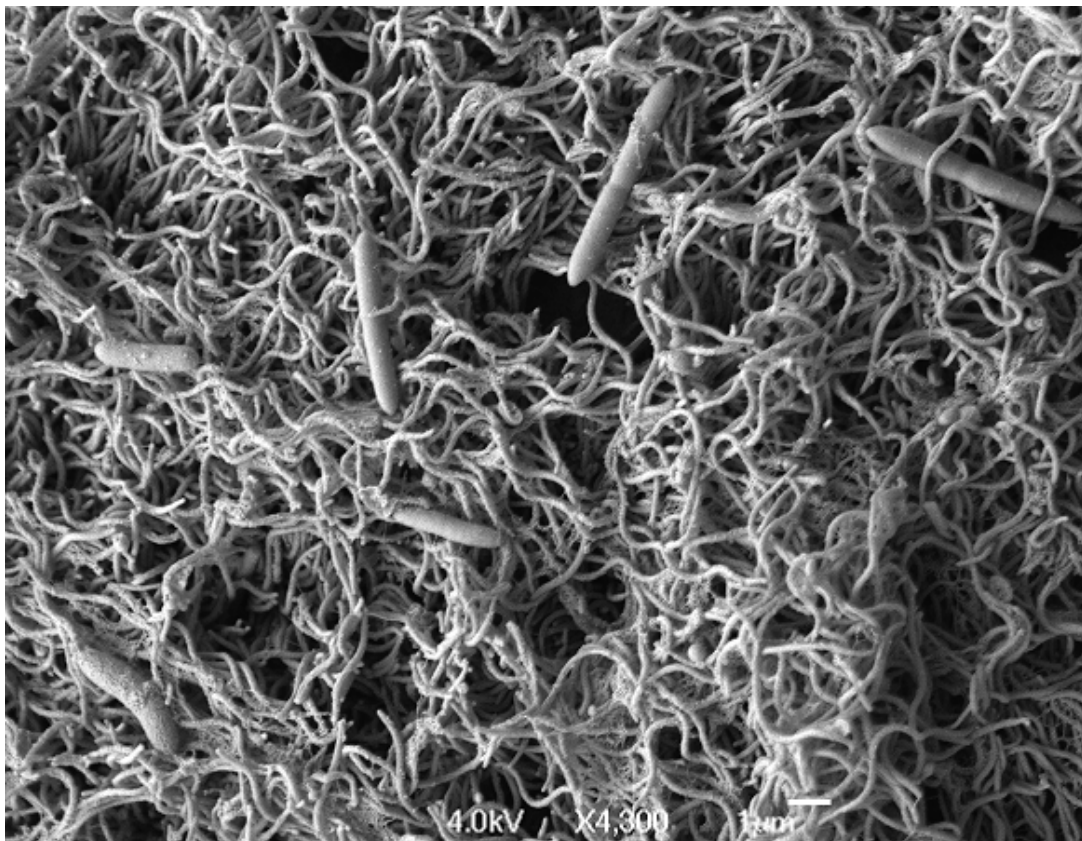


**Mastergradsoppgave i fiskehelse
30 stp.**

In vitro eksponering av torsketaarm

**Histologiske og bakteriologiske forandringer som følge av eksponering av
Carnobacterium maltaromaticum og *Vibrio anguillarum***



av
Lisbeth Løvmo



Institutt for marin bioteknologi

Norges fiskerihøgskole

Universitetet i Tromsø

November 2007

Forsidefoto: SEM bilde fra fermenteringskammer hos torsk. Viser bakterier mellom mikrovillier, tatt av Lisbeth Løvmo

Forord

Denne mastergradsoppgaven i fiskehelse markerer slutten på min studietilværelse. Det har vært lærerike og betydningsfulle år for meg. Det er litt vemodig men samtidig godt å være ferdig. Et stort personlig mål er nådd, og jeg ser frem til å ta fatt på nye utfordringer.

Prosjektet er utført ved institutt for marin bioteknologi (IMAB), Norges fiskerihøgskole, Universitetet i Tromsø. Videre er oppgaven utført i samarbeid med instituttet for anatomi og cellebiologi, det medisinske fakultetet ved Universitetet i Bergen. Oppgaven ble påbegynt i januar 2007 og avsluttet i november 2007.

I forbindelse med arbeidet til denne oppgaven vil jeg spesielt takke min hovedveileder, professor Einar Ringø for utmerket veiledning. Han har vært til stor støtte i denne prosessen, og bidratt med mange gode råd og innspill. Videre vil jeg takke professor Reidar Myklebust som har vært en stor støtte og hjelp for å få et innblikk i den elektronmikroskopiske verden. Deres engasjement inspirerer!

Laboratoriearbeidet er delvis utført ved IMAB, Norges fiskerhøgskole, og her vil jeg spesielt takke Sigmund Sperstad for all teoretisk og praktisk hjelp. I tillegg har en del av laboratoriearbeidet ble utført ved laboratoriet for elektronmikroskopi ved Universitetet i Tromsø. Takk til Randi og Helga Marie der for all hjelp. Vil også takke personalet (Anne, Helene og Trygve) ved Institutt for anatomi og cellebiologi, det medisinske fakultetet ved Universitetet i Bergen for trivelig og lærerike opphold. Forsøket ble kjørt ved Havbruksstasjon i Kårvika, takk til både personalet både ved Fiskehelselaboratoriet og Landanlegget.

Men viktigst av alt TUSEN TAKK Joakim, hadde det ikke vært for deg hadde jeg ikke kommet så langt som jeg har i dag. Tusen takk for all støtte, og for at du har vært så tålmodig det siste året.

Lisbeth Løvmo

Tromsø, november 2007

Sammendrag

Formålet med denne oppgaven er å undersøke om baktarm og fermenteringskammer hos torsk kan være infeksjonsvei for *Vibrio anguillarum*. Videre skal en forsøke å påvise om en probiotisk bakterie, *Carnobacterium maltaromaticum* kan begrense eventuelle skader som *V. anguillarum* påfører tarmen.

Det er kjørt 5. ulike behandlingsregimer med tre fisk i hver gruppe. For å redusere antall forsøksdyr er det bruket en *in vitro* metode. ”The intestinal sack” metoden har tidligere vist å være hensiktsmessig når en ønsker å studere tarmskader forårsaket av patogene bakterier samt interaksjoner mellom patogene agens og melkesyrebakterier. Oppgaven har en mikrobiologisk del hvor en ser på sammensetningen av bakterier i tarmsegmentene etter tre av behandlingene, med tre fisk i hver av gruppene.

Histologiske endringene som følge av de ulike behandlingene ble visualisert ved hjelp av lysmikroskopi (LM), transmisjon elektron mikroskopi (TEM) og scanning elektron mikroskopi (SEM).

Resultatene fra den mikrobiologiske delen av forsøket viser at bakteriene (*V. anguillarum* og *C. maltaromaticum*) som tarmsegmentene er eksponert for har evne til å feste seg til tarmen. Dette kan være med på å påvirke sammensetningen av bakterier i tarmen.

Fra mikroskopi delen ser en resultater som er noe ulikt fra det man har påvist hos laks. Blant annet finner man ikke igjen de store ødeleggelsene av epitelcellene hos torsk. Resultatene kan tyde på at *V. anguillarum* ikke har tarm som hovedinfeksjonsrute. Ut fra resultatene er det vanskelig å entydig kunne si noe om den probiotiske bakterien har effekt eller ikke. Siden den patogene bakterien ikke viser å ha forårsaket entydige skader.

Det som imidlertid er påfallende for baktarmen hos torsk, er den store mengdene med goblet celler som en observerer. Fermenteringskammeret hos torsk har vist seg å være noe annerledes oppbygd enn resten av tarmen, med lengre mikrovilli og mindre avgrenset terminal web.

Nøkkelord: Torskens fordøyelsesorgan, elektron mikroskopi, *Vibrio anguillarum*, probiotika, *Carnobacterium maltaromaticum*.

Innholdsfortegnelse

FORORD	I
SAMMENDRAG	II
1. INNLEDNING	1
1.1. BAKGRUNN FOR VALG AV OPPGAVEN.....	1
1.2. ATLANTISK TORSK.....	2
1.3. <i>VIBRIO ANGUILLARUM</i>	3
1.4. <i>CARNOBACTERIUM MALTAROMATICUM</i>	4
1.5. FORDØYELSESSYSTEMET.....	5
1.5.1. Tarmstrukturen.....	6
1.6. FISKENS BESKYTTELSE MOT BAKTERIE INFEKSJONER.....	8
1.7. PROBLEMSTILLING OG AVGRENSNING AV OPPGAVEN.....	9
2. MATERIAL OG METODER	10
2.1. FISK.....	10
2.2. BAKTERIER.....	10
2.3. DYRKING OG VEKSTSTUDIER.....	10
2.3.1. Dyrking og vekststudier av bakterier.....	10
2.4. <i>IN VITRO</i> EKSPONERING AV BAKTERIER.....	11
2.5. BAKTERIOLOGI.....	13
2.6. MIKROSKOPERING.....	13
2.6.1. Lysmikroskopi (LM).....	13
2.6.2. Transmisjon elektronmikroskopi (TEM).....	14
2.6.3. Scanning elektronmikroskopi (SEM).....	14
3. RESULTATER	15
3.1. VEKSTFORSØK MED <i>VIBRIO ANGUILLARUM</i> OG <i>CARNOBACTERIUM MALTAROMATICUM</i>	15
3.2. <i>IN VITRO</i> EKSPONERING AV TORSKETARM.....	16
3.3. BAKTERIOLOGI.....	16
3.3.1. Utstryk av microbiota fra torskentarm.....	16
3.3.2. Resultater av sekvensering av ren kulturer dyrket fra de ulike behandlingsgruppene.....	17
3.4. MIKROSKOPI DEL.....	24
3.4.1. Lysmikroskopi.....	24
3.4.2. Morfologiske forandringer observert i transmisjons elektronmikroskopi (TEM).....	28
3.4.3. Strukturelle forandringer observert ved hjelp av skanning elektron mikroskopi (SEM)....	32
4. DISKUSJON	36
4.1. BAKTERIOLOGI.....	36
4.2. LYS- OG ELEKTRON MIKROSKOPI.....	38
5. KONKLUSJON	43
6. REFERANSER	45
7. APPENDIKS	51
7.1. REAGENSER BRUKT I FORSØKET.....	51
7.2. PRIMERE.....	52
7.3. UTSTYR.....	52
7.4. LØSNINGER.....	52
7.5. PROTOKOLLER FOR DNA- ISOLERING, PCR- KJØRING OG SEKVENSERING.....	54
7.6. PROTOKOLLER TIL MIKROSKOPIDELEN.....	55

1. Innledning

1.1. Bakgrunn for valg av oppgaven

Oppdrett av Atlantisk torsk (*Gadus morhua* L.) har i løpet av de senere år fått fornyet interesse i Norge (Karlsen & Adoff 2003; Kjørnhaug 2006) og omfanget vil trolig vokse i tiden fremover (Karlsen & Adoff 2003; Kjørnhaug 2006). Oppdretterne i Norge har lang erfaring med oppdrett av laks, men fordi torsk er både fysiologisk, økologisk (Pethon 1998) og ikke minst immunologisk (Schröder et al. 1998; 2006; Solem & Stensvik 2006) svært ulik laks, kan en ikke uten videre overføre kunnskap om teknologi og fiskehelse fra lakseoppdrett til torekeoppdrett.

Torsk som lever hele livet i saltvann vil kunne bli eksponert for ulike patogene bakterier, for eksempel *Vibrio anguillarum*, helt fra den blir klekket. De vaksinene som benyttes i dag er uten adjuvans og synes imidlertid ikke å gi fullgod effekt (Lillehaug & Skrudland 2006).

Forsøk med oljeholdig injeksjonsvaksiner har gitt lovende resultater men disse er ikke aktuelle til så små fisk (Lillehaug & Skrudland 2006).

V. anguillarum forårsaker klassisk vibriose og har i tillegg til deformiteter skapt de største helseproblemene hos torsk i oppdrett de siste årene. Det er registrert flere utbrudd av klassisk vibriose forårsaket av *V. anguillarum* serotype O2b (Hellberg & Colquhoun 2005).

Utbruddene er oftest registrert i de sørlige delene av Norge, noe som trolig skyldes de relativt høye sjøvannstemperaturer sammenlignet med sjøvannstemperaturen lengre nord i landet (Hellberg 2006). I Norge er vibriose den viktigste bakterieinfeksjonen ved produksjon av torskeyngel, og de fleste reseptene som forskriver antibiotika til oppdrettsfisk er rettet mot slike sykdommer. Symptomene er ofte sår og hudblødninger, særlig i hoderegionen, samt ved finnebasis. I kroniske tilfeller kan man også se blodige utstående øyne (Larsen & Pedersen 1999; Hellberg 2006). I histologiske snitt fra torsk kan *V. anguillarum*, betennelsesceller og nekroser påvises i vev fra finner, hud, muskel og tarm mukosa, og indreorganer som milt, hjerte, nyre og i pylorusblindsekkene (Jones et al. 2000).

Helt siden Plehn i 1911 antydte at tarmen kunne være en infeksjonsvei for *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* (furunkulose bakterien) hos fisk har det vært diskutert forskjellige infeksjonsruter for de ulike patogene bakteriene. Det er i dag allment akseptert at både skinn, gjeller og tarm kan være infeksjonsveier for patogene bakterier (for oversikt se, Birkbeck & Ringø 2005; Ringø et al. 2007a).

”*In vitro*” forsøk med laksetarm er tidligere utført for å påvise histologiske forandringer ved eksponering av patogene bakterier (Ringø et al. 2004; 2007b; Salinas et al. 2007). Ringø et al.

(2004) viste at det er forskjell mellom fram- og baktarm hos laks, der framtarm hadde kraftigere ødeleggelse av entrocyttene (tarmceller) enn baktarm når segmentene ble eksponert for *A. salmonicida* ssp. *salmonicida*. I et senere arbeid viste Ringø et al. (2007b) at den probiotiske bakterien, *Carnobacterium divergens*, opprinnelig isolert fra fremtarm til Arktisk røye (*Salvelinus alpinus* L.) kan være med på å begrense skadene i fremtarmen hos Atlantisk laks etter eksponering av *A. salmonicida* ssp. *salmonicida*.

Salinas et al. (2007) viser at melkesyrebakteirene *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* er i stand til å feste seg i tarmen, og at bakterien er delvis i stand til å begrense skadene av *A. salmonicida* ssp. *salmonicida*.

Begrepet probiotika ”growth promoting factors produced by microorganisms” ble første gang beskrevet av Lilly & Stillwell (1965). Ordet stammet fra å kombinere det latinske ordet *pro* (for) med det greske ordet *bios* (for live) (Zivkovic 1999). I perioden fra 1970 og frem til i dag har det vært fremsatt forskjellige definisjoner på probiotika, men få av disse har vært rettet mot fisk. I en nylig publisert review artikkel av Gram & Ringø (2005) definerer probiotika som levende mikrobielt preparat som det som gis til fisk, skalldyr eller mollusker (larver, yngel, ung eller gamle dyr) som har en positiv virkning på helsen til verten.

1.2. Atlantisk torsk

Atlantisk torsk tilhører torskefamilien (*Gadidae*). Torskens kjennetegn er skjeggråden, bukfinnene plassert foran brystfinnene, og den langstrakte tykkmagete kroppen. Den er utbredt i hele den nordlige delen av Atlanterhavet, fra Barentshavet til Biscaya på østsiden, på begge sider av det sørlige Grønland, og langs østkysten av Nord- Amerika til ”North-Carolina”. Torsk er inndelt i flere stammer, og i norske farvann er det to stammer som er mest betydningsfull, den stasjonære kysttorsken, og den pelagiske norsk-arktiske stammen som har gytevandring fra Barentshavet til norskekysten, fra Finmark til Stadt (Pethon 1998; Moen & Svensen 2000).

Oppdrett av torsk har en lang historie og startet tidlig i 1880-årene da en rekke forsøk ble utført ved Forskningsstasjonen Flødevigen i Arendal, men det var først på slutten av 1970-tallet og begynnelsen av 1980-tallet at torskeoppdrett ble videreutviklet. På 1980-tallet var det en del selskaper som drev med kommersiell torskeoppdrett, men inntressen for oppdrett av torsk sank i begynnelsen av 1990-tallet for så å ta seg opp igjen på slutten av 1990-årene (Kvenseth & Bothen 2002).

For noen år tilbake var etablering av en stabil yngelproduksjon i storskala med høy overlevelses prosent den største flaskehalsen. Denne utfordringen er nå overvunnet, og i 2005 ble det produsert totalt ca 7,5- 8 millioner yngel mot totalt 1,6 millioner i 2002 (Karlsen 2004; Kjønshaug 2006). I fremtiden vil de største utfordringene knyttet til torskeoppdrett være å styre kjønnsmodningen, forbedre føret og få en tidligere tørrförtilvenning, bedre fiskehelse, og økt forståelse for kommende å nåværende sykdomsproblemer (Johansen 2004; Mortensen & Fjalestad 2004; Kristoffersen et al. 2006).

1.3. *Vibrio anguillarum*

Vibriose er trolig de vanligste systemiske bakterieinfeksjonene hos oppdrettsfisk på verdensbasis (Lillehaug & Skrudland 2006). *Vibrio anguillarum* er som andre bakterier innen genus *Vibrio*, karakterisert ved at de er Gram negative, rette eller bøyde staver med en tykkelse på 0,3- 1,3 μm og en lengde på 1,4 – 5 μm . Bevegelsen skjer ved hjelp av en eller flere polare flageller som er innkapslet i en kjede (Larsen & Pedersen 1999). *Vibrio* er fakultativ anaerobe og kjemoorganotrofe bakterier med både oksidativ og fermentativ metabolisme, mens de fleste er oksidase positiv og er følsom for *Vibrio* statikumet 0/129 (Holt et al. 1994). *Vibrio* har G + C forhold av DNA på 38-51 % (Larsen & Pedersen 1999). Det kreves 1- 3 % Na^+ for å stimulere til optimal vekst. Temperaturpreferansene varierer fra 0- 37 °C, de humanpatogene *Vibrio* bakteriene krever 37 °C for optimal vekst, mens marine arter vokser best fra 25 °C og lavere. pH ligger optimalt på 6-8 (Larsen 1984). På bakgrunn av sammenligning av DNA (RNA) sekvensanalyse av 5S rRNA har MacDonell og Colwell (1985) foreslått at *V. anguillarum* flyttes til slekten *Listonella*, oppkalt etter mikrobiologen John Liston. 16S rRNA studier har derimot vist at *Listonella* er en heterogen slekt, og dermed kan det være korrekt at blant annet *V. anguillarum* blir i slekten *Vibrio* (Katia- Tsukamoto et al. 1993). Begge navnene blir brukt i litaturen, men i denne oppgaven vil bakterien bli referert til som *V. anguillarum*.

V. anguillarum er i dag delt inn i 23 serotyper, basert på strukturforskjeller i O-antigenet. O-antigenet er en repeterende enhet i lipopolysakkarid (LPS) som er en del av yttermembranen hos Gram negative bakterier. Det var Sørensen og Larsen som i 1986 fremla et nytt system for serotyping basert på O-antigenet, og *V. anguillarum* ble fordelt i seks grupper, O1-O6. I tillegg ble det nye systemet koordinert i forhold til allerede eksisterende systemer både i Japan og Amerika. I 1995 ble systemet utvidet med seks serotyper (Grisez & Ollevier 1995).

Pedersen og med forfattere presenterte i 1999 dagens omfattende system som omfatter O1-O23. I tillegg blir det isolert stammer av *V. anguillarum* som serologisk ikke tilhører noen av disse serotypene, men de fleste av disse er miljøisolater (Pedersen et al. 1999). Ut i fra dagens situasjon er det tilstrekkelig med 23 serotyper, men i fremtiden kan det bli utvidelse dersom det blir økning av isolater fra fisk som ikke kan types i forhold til det eksisterende systemet (Pedersen et al. 1999).

Ved vibriose på torsk i Norge isoleres utelukkende *V. anguillarum* serotype O2 α og O2 β og den sistnevnte dominerer (Lillehaug & Skrudland 2006). I Norge er vibriose den viktigste bakterieinfeksjonen ved produksjon av torskeyngel, og de fleste reseptene som forskriver antibiotika til oppdrettsfisk, er rettet mot slike sykdomstilfeller.

1.4. *Carnobacterium maltaromaticum*

Genus *Carnobacterium* ble første gang beskrevet av Collins et al. (1987), og carnobakteriene er rette spinkle staver 0,5-0,7 x 1,0 -2,0 μm , forekommer enkeltvis og i par, enkelte ganger i korte kjeder. Cellene er Gram positive og de fleste er ikke bevegelige, med et unntak *Carnobacterium mobile*. De er ikke sporedannende kjemoorganotrofe, hetrofermentative og produserer i hovedsak L(+)- melkesyre fra glukose. De vokser ved 10 °C men ikke over 45 °C, og optimum er 30 °C. *Carnobacterium* er katalase- og oksidase negativ og reduserer ikke nitrat. Carnobakterie er påvist i matprodukter og i magetarmsystemet hos fisk (Holt et al. 1994; Ringø & Gatesoupe 1998; Ringø et al. 2004).

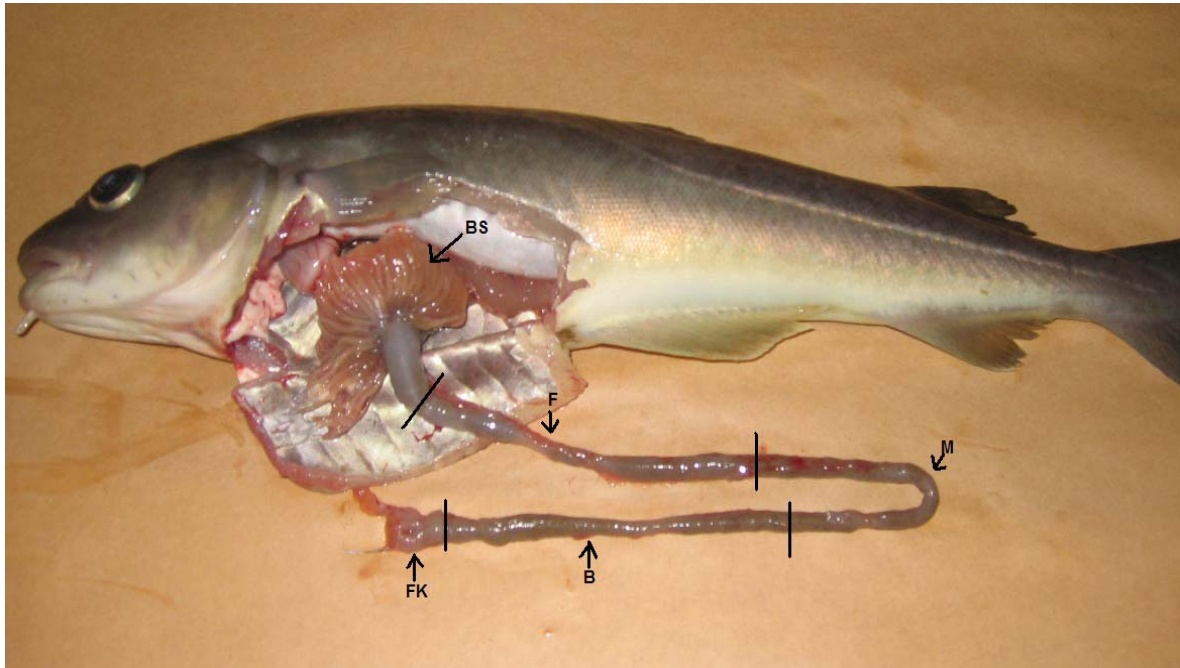
Bakterien som er brukt i denne oppgaven er omtalt som torskeisolat 1 av Seppola et al. (2006). Denne bakterien er isolert fra fermeteringskammer hos torsk fra Austervoll, føret med et kommersielt fôr. Isolatet hemmer vekst av *Listeria monocytogenes* isolert fra både mennesker og farseprodukter og *Enterococcus faecalis* (Ringø, personlig meddelelse). 16S rRNA analyse basert på 613 nukleotider har vist at torskeisolat 1 er 100 % lik *Carnobacterium maltaromaticum* (GenBank accession no. EF204311). Denne bakterien ble første gang beskrevet av Zacharov & Halpern (upublisert data, National Center for Biotechnology Information (NCBI), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), og da isolert fra råmelk. Imidlertid skal man ut fra en 16S rRNA sekvensering være forsiktig med å si noe sikkert med hensyn til hvilken art de forskjellige isolatene hører til.

I denne oppgaven vil torskeisolat 1 også omtales som *Carnobacterium maltaromaticum*.

1.5. Fordøyelsessystemet

Fordøyelsessystemet hos torsk kan naturlig deles inn i flere regioner og starter med munnhule og gjellehule. Neste avsnitt inkluderer oesophagus (spiserøret) og ventrikkelen (magesekken) (Kryvi 1992). Ventrikkelen ender i et snevert parti, pylorus, som er starten på fremtarmen.

Det siste avsnittet er baktarmen, som ganske uskarpt er skilt fra fremtarmen. Baktarmen ender i fermenteringskammeret rett før analåpningen.



Figur 1.1. Venstre bukklapp er fjernet og tarmsystemet er dratt utover, viser at torsken har en ganske lang tarm i forhold til relativ kroppslengde. BS- blindsekker; F- fremtarm; M- midttarm; B- baktarm; FK- fermenteringskammer.

Tarmen er et komplekst organ med mange funksjoner. I tillegg til å fordøye og absorbere maten er tarmen kritisk for vann og elektrolytt balansen, endokrin regulering av fordøyelse og metabolisme og immunitet (Ringø et al. 2003). Tarmen har også store variasjon i lengde og form (Suyehiro 1942; Fänge & Grove 1978) og det er store strukturelle forandringer i fisk i forhold til det som er funnet i andre vertebrater.

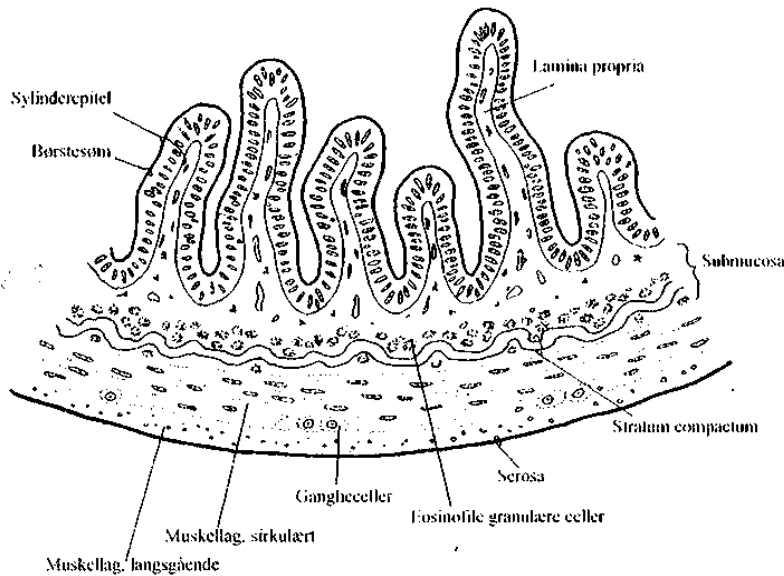
Fremtarmen kan være ganske rett (for eksempel hos laksefisk), men hos mange andre fiskearter er utformingen mer komplisert. Relativ lengde (tarmens lengde/ kroppslengde) og antall slynger varierer fra art til art. Fremtarmen er lengst hos detritusspisere (for eksempel multe og enkelte karpe arter) og andre arter som har spist mye tungt fordøyelig plantemateriale, for eksempel enkelte tilapia arter. Hos disse artene er det ikke unaturlig at tarmen kan bli opp til 20 ganger kroppslengden (Kryvi & Totland 1997; Olsen & Ringø 1997). Tarmen er som regel kortest hos karnivore fisk. Grovt sett er forholdet mellom tarmens lengde og kroppslengde

mer enn 2 hos herbivore fisk, mellom 0,8 og 5 hos omnivore og mindre enn 2,5 hos karnivore fisk (Olsen & Ringø 1997). Torsk er i hovedsak karnivor, men de er ikke spesialister på en type mat/fôr, og vil varierer med sesong, størrelse og individ (Bishop & Odense 1966). Den fremre delen av fremtarmen kan ha pylorusblindsekker (pylorus, gr.= dørvokter). Disse munner ut ved begynnelsen av fremtarmen, og det er ikke klaffer eller spesielle ringmuskler ved innmunningsstedet. Blindsekkene er relativt tykkvegget og er i prinsippet bygd opp på samme måte som tarmen. Antall blindsekker varierer fra en til flere tusen (Suyehiro 1942). Flyndrefisk har en eller noen få blindsekker, laks har ca. 70 og enkelte torskfisk har flere hundre (Kryvi & Totland 1997; Olsen & Ringø 1997). Det store antallet blindsekker oppstår ved rike forgreininger, og er vanligvis bare noen få åpninger inn i tarmen. I regnbueørret og torsk har man beregnet at den totale overflaten i blindsekkene utgjør 70 % av arealet av tarmen (Bergot et al. 1975; Buddington & Diamon 1987).

1.5.1. Tarmstrukturen

Allerede i 1890 beskrev Thesen torsketaarmens struktur. Tarmveggen er bygd opp av flere lag. Slimhinnen, mucosa, som vender inn mot hulrommet, lumen som består av et enlaget epitel med sylindereformede celler, og et løst underliggende bindevev, lamina propria (lamina, lat.= lag; proprius, lat. = nærmest) (Kryvi & Totland 1997). Cellelaget inneholder mange typer celler, epitelceller/ enteroцитter, slimceller (goblet celler), og flere ulike typer av endokrine celler (Kryvi & Totland 1997; Krogdahl 2001). Cellene i mucosa bindes sammen til et kontinuerlig lag av såkalte "tight junctions". "Tight junctions" binder enteroцитtene til hverandre for å hindre bakterier og toksiner å komme til (Krogdahl 2001).

Mucosa og lamina propria danner folder som gir tarmen en stor overflate. Enteroцитtene er sylindereformet. Den delen av cellemembranen som vender ut mot tarmlumen kalles apicalmembranen, mens den membranen som alle epitelcellene hviler på og skiller de fra lamina propria kalles basalmembranen. Sidene i de sylindriske cellene kalles lateralmembranen (Krogdahl 2001). Apicalmembranen er bygget opp med mikrovilli, også kalt børstesøm, som gir cellene en meget stor overflate. Mikrovilli er normalt dekket av et slimlag, ofte kalt "*unstirred water layer*". Mucosa i fisketaarmen danner store folder som kan ha forgreininger, sekundærfolder. Dette til forskjell fra pattedyr der mucosa danner totter (Krogdahl 2001).



Figur 1.2. Skjematisk tegning av en del av tarmveggen, som deles inn i fire lag: mucosa, som består av sylinderepitel og lamina propria; submucosa, muscularis og serosa (etter Kryvi & Totland 1997).

Mucosa (lamina propria + epitel) er et dynamisk vev, og komponenter i fôr og tarmsekreter har stor innvirkning på vekst og egenskaper i mucosa. Epitelcellene fornyes meget raskt, raskere enn andre vev i et dyr, men cellefornyningen skjer langsommere hos fisk enn hos pattedyr (Krogdahl 2001). Celledeling av stamceller skjer langsommere i fisk sammenlignet med pattedyr, selv om temperaturen blir tatt i betraktning. Dette kan være et resultat av en saktere DNA- syntese (Danguy et al. 1988). Som et resultat vil celleutskiftningen være mye langsommere og enterocttene kan bli værende på villiene i uker. Dette er i kontrast til enterocttene hos pattedyr som har en levetid på bare noen få dager (Mayhew 1990).

Under mucosa ligger submucosa (sub, lat. =under), som er løst bindevev. Så ligger stratum compactum (stratum, gr.= lag), et kompaktbindevevslag i form av collagene fiber. På begge sider ligger det rikelig med granulære celler som blant annet inneholder lysozymer, og som sannsynligvis er viktig for tarmens forsvar mot bakterier og parasitter. Selve muskulaturen (muscularis) består av glatt muskulatur i to lag, et indre sirkulært og et ytre langsgående lag. Mellom de to muskellagene ligger ganglioceller fra det autonome nervesystemet (postganglionære cellelegemer fra n.vagus).

Slimhinnen i fremtarmen har flere strukturelle tilpasninger som øker overflatearealet. Den danner tversgående folder som kan strekke seg over halvparten av tarmens omkrets. I tillegg danner slimhinnen småfingerlignende utbuktninger. Cellene i epitelet er ènlaget sylindrisk med velutviklet børstesøm. Dette vil si at cellene ut mot lumen har tynne, sylindformede

utposninger som ender blindt (mikrovilli). Denne spesialiseringen øker overflaten omkring ti ganger. Epitelet inneholder også endokrine celler som tømmer sitt innhold i blodet, og sekretoriske celler som tømmer sitt innhold i tarmlumen (Kryvi & Totland 1997). Histologisk skiller baktarmen seg i liten grad fra fremtarmen. Antall goblet celler øker en del bakover i tarmen, noe som letter passasjen av avføring etter hvert som den blir tørrere. Epitelet forandres fra ènlaget sylindrisk til flerlaget plateepitel ofte et godt stykke innenfor selve analåpningen (Kryvi & Totland 1997; Krogdhal 2001). Fermenteringskammeret, tarmsegmentet rett før anus hos torsk ser ut til å skille seg fra baktarm ved at mikrovilli i fermenteringskammeret er mye lengre enn i resten av tarmen (Ringø et al. 2006).

1.6. Fiskens beskyttelse mot bakterie infeksjoner.

Fisk har en naturlig flora av bakterier i tarmkanalen, slik som andre dyr, og denne mikrobiotaen består av aerobe, fakultativt anaerobe og obligate anaerobe bakterier (Cahil 1990; Ringø et al. 1995; Ringø & Birkbeck 1999). Sammensetningen varierer med alder, type ernæring og vannmiljø, og antall bakterier øker generelt bakover i tarmen (Cahil 1990; Ringø et al. 1995; Ringø & Birkbeck 1999; Einen et al. 2006). Tarmmikrobiota hos fisk er sensitiv ovenfor stress, antibiotika og fôrets sammensetning (Cahil 1990; Ringø et al. 1995; Olsen et al. 2003). Det er vist at ulike fettsyrer og ulike protein mel påvirker og endrer tarmfloraen hos fisk (Ringø et al. 1998; 2006). Lav stabilitet i mikrofloraen kan ha konsekvenser for fiskens motstandskraft mot sykdom, da det kan medføre vekst av patogene bakterier som skader tarmepitelet på bekostning av nøytrale og/eller gunstige bakterier (for eksempel melkesyrebakterier) (Einen et al. 2006).

Patogener kan også tas opp gjennom tarmslimhinnen ved endocytose, som vist i laksefisk ved elektronmikroskopi (Bakken 2002). Dette antyder at tarmkanalen er en av hovedrutene for infeksjon hos fisk. Patogenitet kan bli delt inn i fire ulike faser: 1) den første fasen der patogene entrer vertens miljø, inkluderer fordøyelsessystemet, 2) den eksponentielle fasen hvor patogene fester seg og koloniserer slimoverflaten, reproducerer seg til at de er i stand til å trenge inn i vertens entrocytter, 3) stasjonære fasen, der patogene reproducerer inni verten og lurer vertens forsvarssystem, i denne fasen er fisken døende, og kan gå fort inni neste fase 4) som er døds fase (Birkbeck & Ringø 2005).

For å hindre mikrobiologisk invasjon har fisk utviklet mange og ulike beskyttelses mekanismer. Eksempler på dette kan være slimproduksjon ved goblet celler, surt miljø i tarmepitelet, celle fornying, magesyre, lysosomer, og antibakteriell aktivitet av epidermal

mucus. Mucus er vertens første barriere mot bakterier, og den som hurtigst reguleres. Slim blir skilt ut fra spesialiserte goblet celler som er lokalisert mellom tarmens epitelceller, mucus er en nødvendig barriere mot bakteriene i tarm hos både fisk og endotermiske dyr (Florey 1962; Westerdahl et al. 1991). Tarmens mucus har tre hovedfunksjoner, 1) beskytter det underliggende tarmepitelet mot kjemiske og fysiske skader, 2) smøring av tarmen, og 3) lager en barriere for de patogene bakteriene (Birkbeck & Ringø 2005). Ved å øke slim/ mucus produksjon vil det bli vanskeligere for bakteriene å feste seg til tarmveggen.

1.7. Problemstilling og avgrensning av oppgaven

Helt siden forrige århundre er det gjennomført flere vitenskapelige arbeid rundt torsken. Blant annet skrev Thesen i 1890 om torsketarmens oppbygging. Videre publiserte Odense og Bishop i 1966 et studie på torsk, der de presenterte de første TEM bildene av torsketarm. I dette studiet har jeg til hensikt å se nærmere på om baktarm og fermenteringskammer hos oppdrettstorsk kan være infeksjonsvei for *V. anguillarum*. Arbeidet er en videreføring av prosjektoppgaven (Løvmo 2007), der det ble studert om fremtarm kunne være en infeksjonsvei for *V. anguillarum*.

Videre i denne oppgaven ønsker man å se nærmere på hvilke effekter en probiotisk bakterie har på samme deler av tarmen (baktarm og fermenteringskammer). Prosjektoppgaven (Løvmo 2007) viste ikke noen enstydig resultat på om *C. divergens* hadde en positiv virkning på torsk, slik det er påvist hos laks (Ringø et al. 2007b). Med bakgrunn i det, har man derfor i denne oppgaven valgt å benytte en melkesyrebakterie, *C. maltaromaticum*, isolert fra fermenteringskammer hos torsk (Seppola et al. 2006).

For å kvalitetssikre studiet samt og for å undersøke de ulike bakterienes evne til å feste seg til baktarm og fermenteringskammeret, har man studert tarmmikrobiota før og etter eksponering av bakterier *C. maltaromaticum* og *V. anguillarum*. Gjennom dette ønsker en å avdekke om sammensetningen i tarmmikrobiota blir forandret når fisken blir eksponert for de ulike bakteriene.

2. Material og metoder

2.1. Fisk

25 uvaksinerte torsk (*Gadus morhua* L.), produsert av Sagafjord Seafarm AS generasjon 2005, ble tatt inn til havbruksstasjonen i Kårvika, Universitetet i Tromsø i februar 2006 som 5 grams yngel. Fra dette stadiet ble fisken utelukkende fôret med fôr fra Dana Feed AS, ("Dan-Ex-1562"). Pelletens størrelse ble kontinuerlig tilpasset etter til fiskens størrelse gjennom vekstperioden. Fisken ble holdt på naturlig temperatur og lys. Ved uttak i mai 2007, var temperaturen 11 °C og fisken var ca. 600 gram.

2.2. Bakterier

I dette arbeidet ble det benyttet *Carnobacterium maltaromaticum* opprinnelig isolert fra fermenteringskammer hos torsk fra Austervoll (Seppola et al. 2006) og en Va 4299 *Vibrio anguillarum* serotype O2b isolert fra hodenyre hos vill torsk i 2001 (Vetrinærinstituttet, Oslo).

Bakterier	Gitt av:
Va 4299 <i>V.anguillarum</i> serotype O2b, isolert fra hodenyre hos torsk.	Helene Mikkelsen, Fiskeriforskning
Torske isolat 1 (<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>)	Elin Sandaker, Fiskeriforskning

2.3. Dyrking og vekststudier

Stoffer som er benyttet, med deres produsenter osv. samt oppskriftene til de ulike vekstmediene som er brukt i oppgaven er beskrevet i appendiks, se side 51.

2.3.1. Dyrking og vekststudier av bakterier

Til dyrking av *V. anguillarum* ble det benyttet et Marin Broth (MB); vekstmedium. *V. anguillarum* ble strøket ut på blodagar skåler med 2 % NaCl. Skålene ble deretter innkubert ved 12 °C i 3 døgn. Forkulturen ble laget ved å inokulere flere rene bakteriekolonier i 10 ml MB- medium i 50 ml vingekolber. Deretter ble forkulturen innkubert med risting ved 12 °C i et døgn. Forkulturen ble overført til mediet (Marin Broth) i forholdet 1:100 i en vingekolbe (250 ml), og innkubert under risting ved 12 °C i et døgn.

For dyrking av *C. maltaromaticum* ble det benyttet et tryptic soya broth vekstmedium tilsatt 5 % glukose og 1 % salt (TSBgs), mens et tryptic soya agar medium tilsatt glukose og salt ble

benyttet til dyrking av bakterier på plater. Agar platene ble deretter innkubert ved 12 °C i to døgn. Videre ble det fremstilt en kultur ved å innokulere flere rene bakteriekolonier til 40 ml TSBgs vekstmedium i en vingekolbe (250 ml). Denne kulturen ble oppebevart ved romtemperatur og under risting.

Det ble benyttet to metoder for å bestemme bakterie konsentrasjonen i løsningen.

A. Optical density (OD).

Bakteriekonsentrasjonen bestemmes ut i fra løsningens turbiditet ved at lysets spredning måles med et spektrofotometer ved OD_{600nm}. Økt konsentrasjon av bakterier i løsningen gir økt refleksjon av lys. OD_{600nm} måles ved å ta 1 ml av kulturen i en engangskuvette. Ved verdier over 0,3 ble kulturen fortynt med 0,9 % NaCl, 1:10 fortytning. Bakterier er encellede organismer og absorbansen er proporsjonal med antall celler. Ved bruk av denne metoden skilles det ikke mellom døde og levende celler (Madigan et al. 2000).

B. Kimtallsbestemmelse / Colony forming units (CFU).

Denne metoden angir kun kolonidannende celler, det vil si bakterier som er aktive og i stand til å formere seg. Det ble laget en fortynningsrekke fra den originale bakteriekulturen, 100 µl fra hver fortytning ble platet ut på agarskål, og innkubert ved optimal temperatur i 2- 3 dager. Hver koloni representerer en levende celle. Skåler med tellbart antall (20-200) kolonier benyttes til å beregne CFU/ ml i den ufortynnete kulturen (Madigan et al. 2000).

2.4. *In vitro* eksponering av bakterier

I dette studiet ble det brukt en *in vitro* metode tidligere beskrevet av Ringø et al. (2007b) og Salinas et al. (2007). Årsaken til at denne metoden er valgt fremfor *in vivo* metode er å bidra til å redusere antall forsøksdyr. I 2006 ble det totalt brukt over 700.000 forsøksdyr og 92 % av disse var fisk (Forsøksdyreutvalget 2006). Utvalget oppfordrer til å prøve å begrense antall forsøksdyr som lider unødvendig, og på bakgrunn av dette er det derfor viktig å undersøke om det er mulig å benytte alternative *in vitro* metoder istedenfor *in vivo* metoder.

”The intestinal sack” metoden benyttet i dette studiet har tidligere vist å være hensiktsmessig når en ønsker å studere tarm skader forårsaket av patogene bakterier samt interaksjoner mellom patogene agens og melkesyrebakterier (Ringø et al. 2007b; Salinas et al. 2007). I et innledende arbeid av Løvmo (2007) ble fremre del av tarm benyttet mens det i denne

oppgaven vil bli benytte bakre del av torsketarmen, og fermenteringskammer (se figur 1.1, side 5).

I *in vitro* forsøket ble det benyttet tre fisker i åtte grupper, totalt 24 fisk. Fem grupper ble brukt til elektronmikroskopidelen, og tre grupper til den bakteriologiske delen. En oversikt over de forskjellige behandlingene er beskrevet i tabell 2.1.

Tabell 2.1. Oversikt over de ulike behandlingene av torsketarmen.

Behandlings nummer.	Bakterie stamme og konsentrasjon
1	Fysiologisk saltvann
2	<i>C. maltaromaticum</i> 10 ⁶
3	<i>V. anguillarum</i> 10 ⁶
4	<i>C. maltaromaticum</i> / <i>V. anguillarum</i> 10 ⁶
5	<i>V. anguillarum</i> / <i>C. maltaromaticum</i> 10 ⁶

Fisken ble avlivet ved et slag i hode, og bukhulen ble åpnet slik at tarmen ble blottlagt. Tarmen ble forsiktig tatt ut i full lengde og kuttet av like bak blindsekkene, som beskrevet av Ringø et al. (2007b). Fremre del av tarmen ble fjernet, bakre del og fermenteringskammeret ble skylt tre ganger, fri for matrester med fysiologisk saltvann. Når mageinnholdet var løst ble tarmen skylt ytterligere to ganger. Tarmen ble så ”sydd” igjen med sytråd i den bakre enden, og deretter eksponert for behandlingene 1, 2 og 3 angitt i tabellen over (tabell 2.1). Deretter ble den ”fremre” delen av tarmen sydd igjen, og tarmen innkubert i fysiologisk saltvann ved 10 °C i en time. For behandling nummer 4 og 5 ble tarmen først eksponert for *C. maltaromaticum* eller *V. anguillarum* i 30 minutter. Deretter ble tarmen åpnet og skylt tre ganger med sterilt fysiologisk saltvann før den på nytt ble eksponert for henholdsvis *V. anguillarum* eller *C. maltaromaticum* i nye 30 minutter.

Etter innkubering ble tarmen skylt med fysiologisk saltvann før det ble tatt ut et 0,5 cm segment fra bakre del av bak tarmen og fermenteringskammeret. Segmentene ble overført til 1,8 ml cryo-rør som inneholdt 1,5 ml McDowell’s løsning (McDowell & Trump 1976).

Den eksakte mengden av levende bakterier som hver tarm ble eksponert for ble beregnet ut ved kimtallsbestemmelse av bakterieløsningene som ble brukt i behandlingen.

2.5. Bakteriologi

Det ble benyttet ni fisker til bakteriologisk bestemmelse av torskens microbiota i bakre del av tarm og fermenteringskammer. Fisken ble behandlet på samme måte som tidligere men bare med behandlingsnummer 1, 4 og 5. Etter innkubering ble tarmen åpnet forsiktig i begge ender og deretter tømt. Tarmen ble videre lagt i sterile plastikkposer, veid, tilsatt 2 ml fysiologisk saltvann og homogenisert i en Stomacher (Seeward Laboratory, U.K) som beskrevet av Ringø (1993). Homogeniseringsvæsken ble deretter platet ut på blodagarskåler og TSAgs agar skåler, ved to ulike fortyninger (1/10 og 1/100). Agarskålene ble innkubert ved 12 °C i tre døgn, før ca 20 tilfeldig utvalgte kolonier fra hvert segment og fisk ble plukket ut for renkultivering. Renkulturene ble Gram testet, katalase, oksidase og fermenteringstestet. Deretter ble renkulturene innokulert i 4 ml av sitt respektive vekstmedium ved 12 °C og ved risting i to døgn. Alle kulturene ble frosset ned ved -80°C.

Ut fra den morfologiske beskrivelsen og de kjemiske testene ble 103 isolater benyttet til isolering av DNA, PCR- kjøring og sekvensering. Se appendiks 7.5, side 54 for mer utførlig beskrivelse av hvordan dette ble utført.

2.6. Mikroskopering

De ulike tarmsegmentene ble direkte fiksert i McDowell's fiks (McDowell & Trump 1976) og oppebevart ved 4 °C til den mikrobiologiske delen av oppgaven ble avsluttet.

2.6.1. Lysmikroskopi (LM)

Innstøypning av prøver til LM kan gjøres i plast eller parafin. I denne oppgaven ble prøvene støpt inn i plast slik at de samme prøvebitene kunne ses i transmisjon elektron mikroskopi (TEM). Innstøpningsprosessen og snittingen ble gjort etter samme fremgangsmåte som beskrevet av Løvmo (2007). Innstøpningsprosessen ble utført som beskrevet i protokollen til elektronmikroskopi avdelingen ved Universitetet i Tromsø, se appendiks 7.6 side 55.

Lysmikroskopet som ble brukt i denne oppgaven er et Leica DMLB mikroskop med Leica DC kamra, koblet til datasystemet analySIS. Utstyret som ble benyttet inngår i standard lysmikroskopianalyser ved instituttet for anatomi og cellebiologi, det medisinske fakultetet ved Universitetet i Bergen.

2.6.2. Transmisjon elektronmikroskopi (TEM)

Prøvene ble støpt inn i plast og snittet på en ultramikrotom (Leica EM UC6, Leica) med en tykkelse på 60 nm. Snittene ble lagt på en kobber gridd, farget ved hjelp av uranyl og blyløsning. Transmisjons mikroskopet som ble benyttet har betegnelsen JEM 1230 (www.jeoleuro.com). Kameraet på TEM er et MultiScan 600CW (www.gatan.com). Softwaren som ble benyttet var fra Gatan og har betegnelsen Digital Micrograph.

2.6.3. Scanning elektronmikroskopi (SEM)

Fremføringsprotokollen til SEM er beskrevet i appendiks 7.6. Etter gjennomføring av denne måtte preparatet kritisk punkt tørkes. Dette vil si at man gradvis slippes ut alkohol og erstatter den med CO₂ (Wawak og Campbell 1986). Bakgrunnen for denne prosessen er prinsippet om at CO₂ har like mye masse i flytende som i gassform. Dette vil si at ved 31,5 °C og et trykk på 175 bar vil CO₂ gå over i gassform og preparatet tørke uten å ha fått artefakter/ feil (Quorum Technologies). Etter kritisk punkt tørking ble prøvene montert på en metall stubb/nagl og sprøytet med metall før man kunne studere dem i SEM. I denne oppgaven ble prøvene belagt med et tynt lag av blandingen gull og platinium. Metallaget hindrer den høye spenningen i SEM å ødelegge prøvene og hindrer at prøvene overopphetet. Metallaget vil også lede elektronene tilbake til elektrondetektoren som omformer elektronene til et bilde (Bozzola & Russel 1991).

SEM som ble benyttet i denne oppgaven er FESEM 7400 (Field Emission Scanning Electron Microscope), med kald emitter (www.jeoleuro.com).

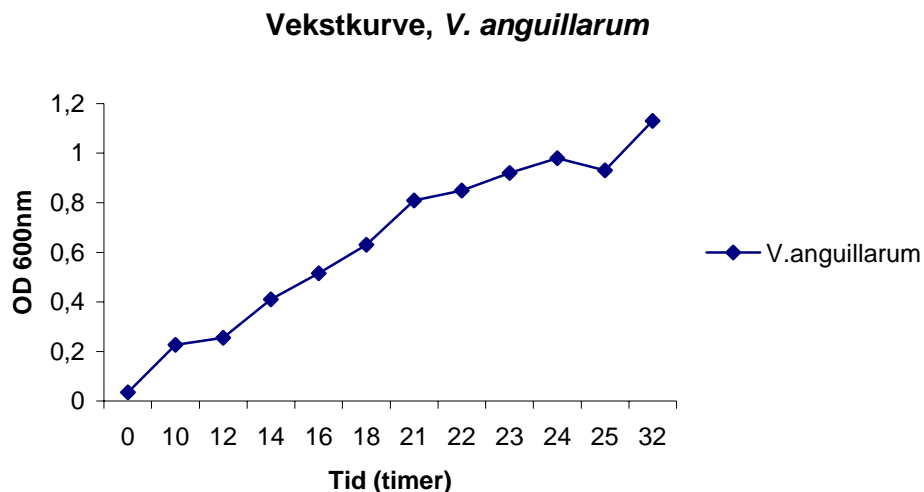
3. Resultater

3.1. Vekstforsøk med *Vibrio anguillarum* og *Carnobacterium maltaromaticum*

Vekstkurver for *V. anguillarum* og *C. maltaromaticum* ble laget ved å måle OD_{600nm} frem til bakteriekulturen var kommet inn i en stasjonær vekstfase. Vekst dataene som er vist i Figur 3.1 og 3.2 er basert på gjennomsnittet av to parallelle hovedkulturer for hver bakterie.

Maksimal OD_{600nm} verdi ble oppnådd etter 33 og 39 timer for henholdsvis *V. anguillarum* og *C. maltaromaticum*.

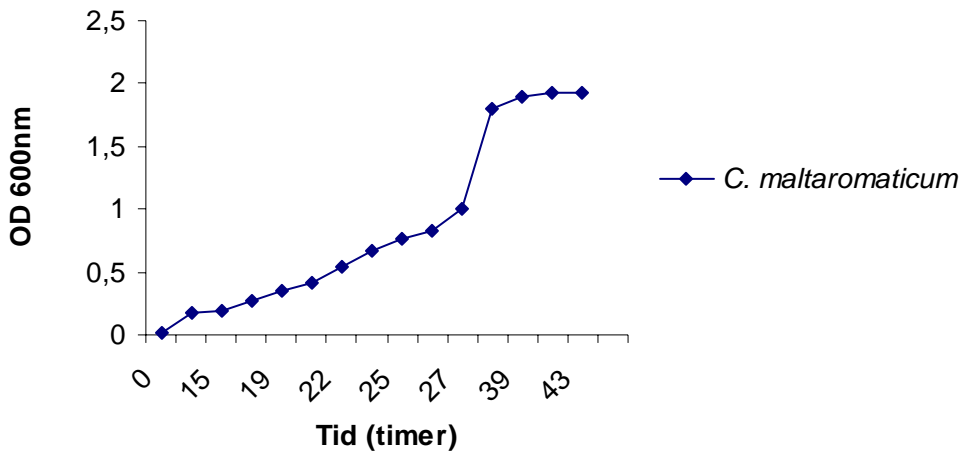
Vekstkurven for *V. anguillarum* (Figur 3.1) viser at bakterien var i den eksponentielle fase fra ca. 12 til 24 timer etter inokulering. I denne oppgaven ble den videre høsting av denne bakterien derfor foretatt etter ett døgn. Maksimal OD verdi (1,11) ble påvist etter 32,5 timer.



Figur 3.1. Vekstkurve for *V. anguillarum* 4299 O2b målt ved OD_{600nm}.

Figur 3.2 viser vekstforløpet for *C. maltaromaticum*. Bakterien var i den eksponentielle vekst fase ca. 27 til 39 timer etter at kulturen ble startet. På bakgrunn av disse dataene ble derfor *C. maltaromaticum* i det videre arbeidet høstet etter 30 timer. Maksimal OD verdi var 1,9 og ble påvist etter 39 timer.

Vekstkurve *C. maltaromaticum*



Figur 3.2. Vekstkurve for *C. maltaromaticum* målt ved OD_{600nm}

3.2. In vitro eksponering av torsketaarm

Bakteriekonsentrasjonen av *V. anguillarum* og *C. maltaromaticum* i stamløsningen, som var utgangspunkt for *in vitro* studiet, ble bestemt på bakgrunn av antall CFU (Colony Forming Units) på agarskålene med ulike fortyngninger. For å regne tilbake til bakteriekonsentrasjonen i utgangsløsningen, ble fortyngningen som fikk oppvekst av ca. 20- 200 kolonier på platene benyttet. De kulturene som ble bruk i eksponeringsforsøket hadde en konsentrasjon på $5,3 \cdot 10^6$ for *V. anguillarum* og $2,3 \cdot 10^7$ for *C. maltaromaticum*.

3.3. Bakteriologi

3.3.1. Utstryk av microbiota fra torsketaarm

Alle bakteriene som ble isolert i denne oppgaven er autochthone, det vil si at de er stedegen og har evnen til og feste seg til mucus.

Totalt antall levedyktige kolonier (TVC) per gram tarm (våt vekt) i de ulike behandlingsgruppene er basert fortykning og vekt av prøvene. Resultatene har store individuelle forskjeller, men viser at i gjennomsnitt var det større diversitet og høyere bakterieantall i fermenteringskammer hos torsk.

Tabell 3.1. TVC per gram og per ml ved en fortyning ved 1/100, fra baktarm og fermenteringskammer ut fra de ulike behandlingene.

Behandlingsgruppe	Baktarm TVC 1/100		Fermenteringskammer TVC 1/100	
	Per gram	Per ml	Per gram	Per ml
Kontroll fisk	$2,0 \cdot 10^3$	$6,0 \cdot 10^2$	$1,4 \cdot 10^4$	$4,2 \cdot 10^3$
Kontrollfisk	$2,3 \cdot 10^3$	$6,9 \cdot 10^2$	$7,8 \cdot 10^4$	$3,1 \cdot 10^4$
Kontrollfisk	$1,0 \cdot 10^4$	$3,0 \cdot 10^3$	$2,6 \cdot 10^5$	$7,8 \cdot 10^4$
<i>C. maltaromaticum</i> + <i>V. anguillarum</i>	$1,0 \cdot 10^4$	$3,0 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^5$	$3,3 \cdot 10^4$
<i>C. maltaromaticum</i> + <i>V. anguillarum</i>	*	*	$1,2 \cdot 10^4$	$6,0 \cdot 10^3$
<i>C. maltaromaticum</i> + <i>V. anguillarum</i>	$3,0 \cdot 10^3$	$9,0 \cdot 10^2$	$5,5 \cdot 10^3$	$2,2 \cdot 10^3$
<i>V. anguillarum</i> + <i>C. maltaromaticum</i>	$2,0 \cdot 10^3$	$6,0 \cdot 10^2$	$2,3 \cdot 10^4$	$4,6 \cdot 10^3$
<i>V. anguillarum</i> + <i>C. maltaromaticum</i>	$3,5 \cdot 10^3$	$1,4 \cdot 10^3$	$2,4 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^5$
<i>V. anguillarum</i> + <i>C. maltaromaticum</i>	$1,5 \cdot 10^3$	$9,0 \cdot 10^2$	$1,5 \cdot 10^5$	$6,0 \cdot 10^4$

* Fra denne fisken var det ikke oppvekst på skålene.

3.3.2. Resultater av sekvensering av ren kulturer dyrket fra de ulike behandlingsgruppene.

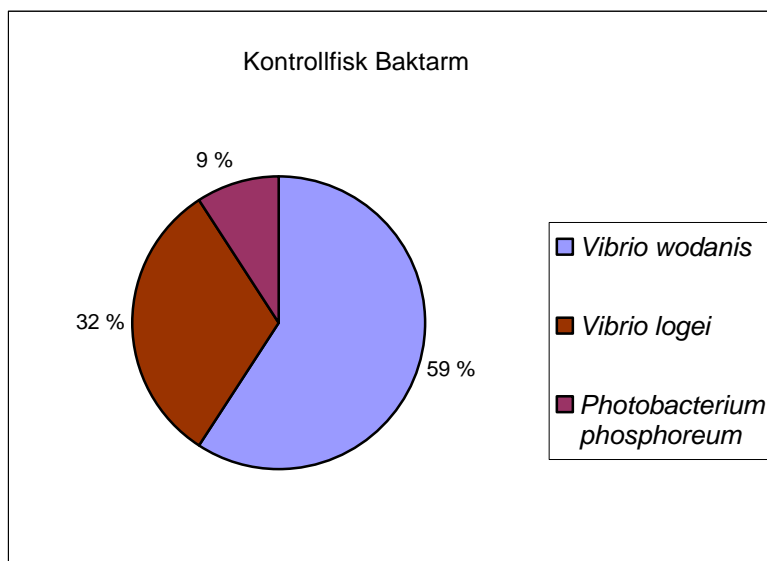
De isolatene som ble isolert, ble plukket ut med tanke på å påvise hvilke bakterier fisken var blitt eksponert for, samt for å kartlegge torskens tarmmikrobiota. Det ble plukket ut ca 20 isolater fra hver fisk og hvert segment, totalt 300 isolater. 269 av isolatene ble sammenlignet med bakgrunn i morfologi, og en del biokjemiske analyser (Gram- testet, katalase, oksidase og fermenteringstestet). Fra de 269 isolatene ble 103 isolater plukket ut fra tre kriterier, hvilke tarm segment det kommer fra, hvilken gruppe fisk og resultatene fra de biokjemiske analysene. De 103 isolatene ble forsøkt identifisert ved hjelp av 16S rRNA. Imidlertid, var det seks av disse isolatene som ikke kunne kobles opp mot en slekt eller art i BLAST database søkt opp i GenBank på grunn av for liten likhet (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). I denne oppgaven ble den definert grensen ved $\leq 97\%$ likhet,

de seks isolatene som hadde under 97 % likhet ble derfor sett bort fra. De 50 første nukleotidene og nukleotidene etter posisjon 650 ble trimmet vekk. Det vil si at lengden ligger jevnt på 600 nukleotider (nt), noe som anses å være tilstrekkelig for å si noe om slektskap.

Isolatene identifisert ved hjelp av 16S rRNA og de isolatene som hadde identiske biokjemiske karakteristika tilsvarende de isolatene som ble identifisert er presentert i kake diagrammene.

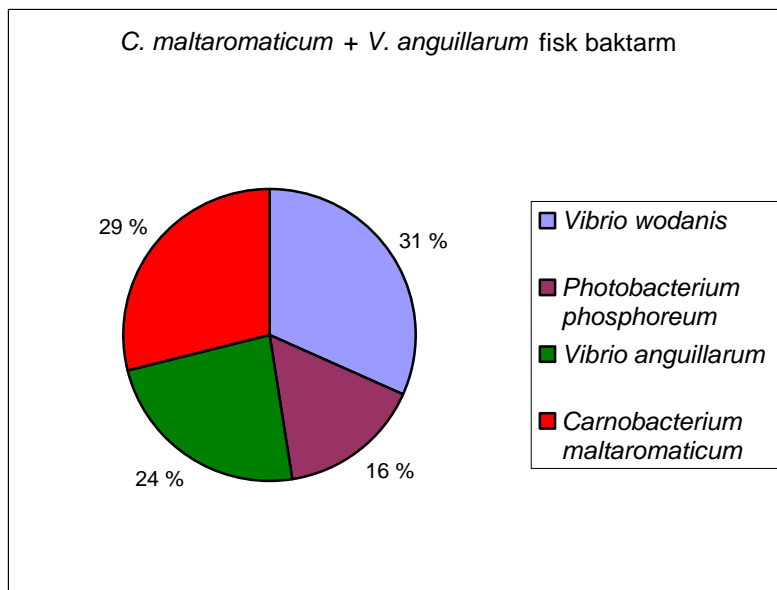
Denne fremstillingsmåten er benyttet for å få en oversiktlig fremstilling av hvordan sammensetningen av bakteriene varierer i de ulike gruppene.

I kontrollfiskens baktarm ble det identifisert tre ulike dominerende bakterier *Vibrio wodanis*, *Vibrio logei* og *Photobacterium phosphoreum*. Fordelingen mellom disse er vist i Figur 3.3.



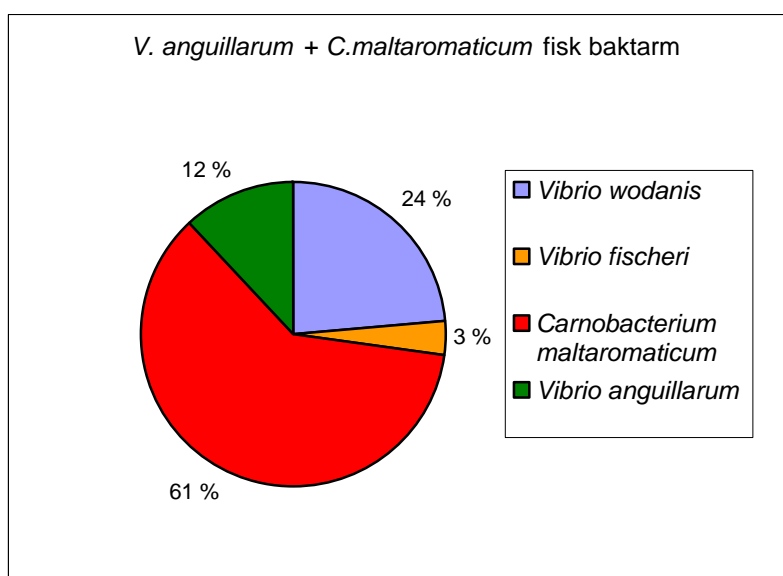
Figur 3.3. Viser sammensetningen av de isolatene som ble dyrket frem fra kontrollfiskens baktarm. Totalt ble det dyrket opp 45 isolater i denne gruppen.

I gruppen der baktarm ble behandlet med torskisolatet først og deretter med en *V. anguillarum*, ble de tilsatte bakteriene identifisert ved 16S rRNA sekvensering (Figur 3.4). Dette viser at disse bakteriene er i stand til å feste seg i baktarm. I tillegg til disse to bakterieisolatene ble *V. wodanis* og *Photobacterium phosphoreum* identifisert, mens *Vibrio logei* ikke ble isolert fra denne gruppen (Figur 3.4).



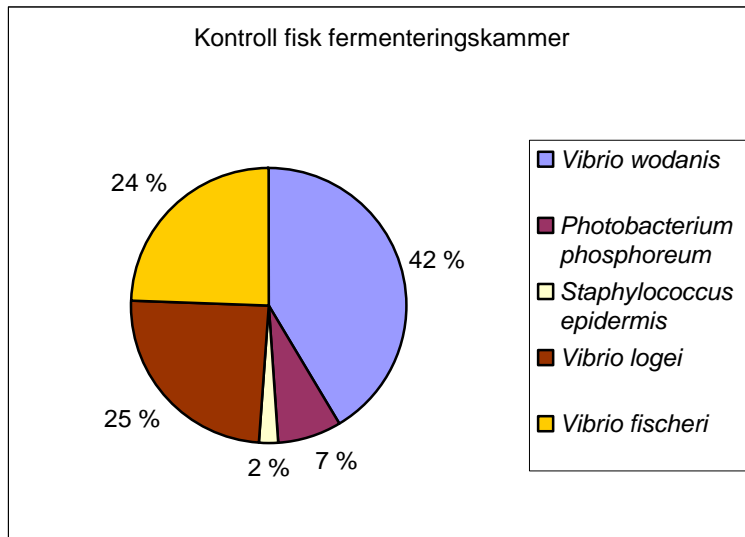
Figur 3.4. Sammensetningen i av de isolatene som ble dyrket frem fra baktarmen hos gruppen som først ble eksponert for *C. maltaromaticum* og videre for *V. anguillarum*. Her har man isolert både *C. maltaromaticum* og *V. anguillarum*.

I baktarm hos gruppen fisk som først ble eksponert for *V. anguillarum* og deretter for *C. maltaromaticum*, ble de to bakteriene som tarmen ble eksponert for isolert (Figur 3.5). I denne gruppen var *C. maltaromaticum* dominerende og utgjorde 61 % av bakteriene som ble karakterisert i denne gruppen. Her ble det heller ikke isolert *V. logei*, noe som kan indikere at denne bakterien ble utkonkurrert ved eksponering (Figur 3.5).

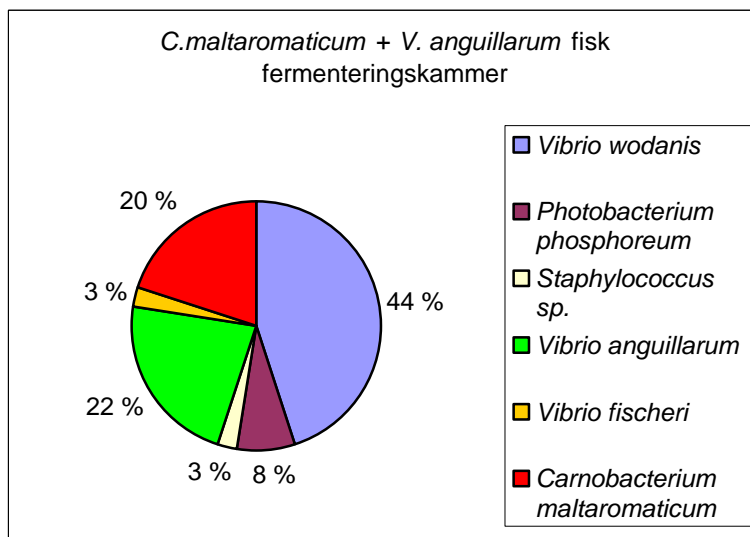


Figur 3.5. Fordeling av isolater fra baktarm hos gruppen som først ble eksponert for *V. anguillarum* og deretter *C. maltaromaticum*. Her ble begge de respektive bakteriene (*V. anguillarum* og *C. maltaromaticum*) isolert.

I fermenteringskammeret fra kontroll fisk ble det isolert fem ulike bakterier (Figur 3.6), *Staphylococcus epidermis* og *Vibrio fischeri*, samt de bakteriene som ble isolert fra baktarm i kontrollfisk. I fermenteringskammeret ser det ut til at *V. wodanis* er den dominerende bakterien (Figur 3.6).

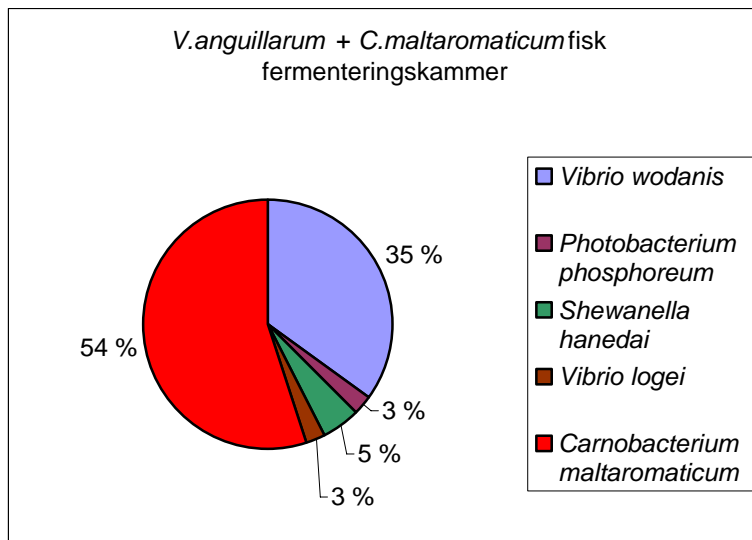


Figur 3.6. Viser sammensetningen av isolatene fra fermenteringskammer hos kontrollfisken. I gruppen der fermenteringskammeret først ble eksponert for *C. maltaromaticum* og deretter eksponert for *V. anguillarum*, ble begge bakteriene isolert. *V. logei* ble ikke isolert, men ut over det ble de samme bakteriene isolert som fra kontrollfisken.



Figur 3.7. Angir fordelingen av bakteriene i gruppen som ble eksponert for torskisolatet, og deretter for *V. anguillarum*. Her er det påvist både *C. maltaromaticum* og *V. anguillarum*.

I gruppen som først ble eksponert for *V. anguillarum* og deretter *C. maltaromaticum*, ble det i fermenteringskammeret ikke isolert *V. anguillarum*. 54 % av isolatene tilhører *C. maltaromaticum*. Ellers er det ikke store forskjeller fra de andre gruppene. *V. wodanis* er også i denne gruppen veldig dominerende (35 %), mens isolatene som hadde høy likhet med *Shewanella hanedai* utgjorde 5 % av isolatene i denne gruppen. *S. hanedai* ble ikke isolert i de andre gruppene.



Figur 3.8. Viser sammensetningen av bakteriene i gruppen som først ble eksponert for *V. anguillarum* deretter for *C. maltaromaticum*. Her er det ikke sekvensert *V. anguillarum*, men over halvparten av isolatene er *C. maltaromaticum*.

Det er utført statistiske tester for å se om en finner signifikante forskjeller. Dette gav ingen resultater på grunn av for stor individuell variasjon mellom individene. For eksempel er det 4000 til 78000 bakterier i kontrollgruppens fermenteringskammer. Dette gjelder alle gruppene og begge segmentene.

Tabell 3.2 viser forskjellene mellom segmentene (baktarm og fermenteringskammer) for gjennomsnittstallene for de ulike gruppene. Her skiller man mellom de bakteriene som faktisk er isolert og de som er lik. De bakteriene som blir betegnet som lik, er de bakteriene som har samme resultatet ut fra de biokjemiske testene, som alle 269 isolatene ble testet for (Gram-, kalalase-, oksidase- og fermentering testet).

Vi ser at det er flere bakterier i fermenteringskammeret enn i baktarm med tanke på gjennomsnittet i gruppa, og at det er isolert flere ulike bakterier i fermenteringskammer.

Tabell 3.2. Logaritmen av total levedyktige kolonier per gram tarm våt vekt (Log TVC). Tabellen angir totalantallet, og de ulike bakteriene som ble isolert i kontrollfisken.

	Baktarm	Fermenteringskammer
Log TVC	3,6	4,6
Totalt antall isolater	45	42
Gram – negative bakterier		
<i>Vibrio wodanis</i> *	2,34	3,50
<i>Vibrio wodanis- lik</i>	2,80	4,10
<i>Photobacterium phosphoreum</i> *	1,80	3,45
<i>Photobacterium phosphoreum- lik</i>	1,80	
<i>Vibrio logei</i> *	1,97	3,45
<i>Vibrio logei –lik</i>	2,54	3,80
<i>Vibrio fischeri</i> *		3,30
<i>Vibrio fischeri- lik</i>		3,88
Gram- positive bakterier		
<i>Staphylococcus epidermis</i> *		2,97

* - isolater karakterisert ved hjelp av 16S rRNA

I gruppen som først ble eksponert for torskeisolatet og deretter for *V. anguillarum* er det også forskjeller mellom de to segmentene. Fermenteringskammeret har flere bakterier enn baktarm ut fra gjennomsnittstallene for gruppene (Tabell 3.3).

Tabell 3.3. Logaritmen av total levedyktige kolonier per gram tarm våt vekt (Log TVC). Tabellen viser totalantallet, og de ulike bakteriene som ble isolert i gruppen. Denne gruppen ble først eksponert for *C. maltaromaticum* i 30 min for deretter å bli eksponert ovenfor *V. anguillarum* i 30 min.

	Baktarm	Fermenteringskammer
Log TVC	3,3	4,6
Totalt antall isolater	38	44
Gram – negative bakterier		
<i>Vibrio wodanis</i> *	2,01	3,50
<i>Vibrio wodanis- lik</i>	2,70	4,20
<i>Photobacterium phosphoreum</i> *	2,01	3,27
<i>Photobacterium phosphoreum- lik</i>	2,31	2,97
<i>Vibrio anguillarum</i> *	2,48	3,40
<i>Vibrio anguillarum –lik</i>	2,14	3,70
<i>Vibrio fischeri</i> *		2,97
Gram- positiv bakterier		
<i>Staphylococcus sp. *</i>		2,97
<i>Carnobacterium maltaromatium</i> *	2,41	3,70
<i>Carnobacterium maltaromatium -lik</i>	4,48	2,97

* - isolater karakterisert ved hjelp av 16S rRNA

I gruppen som ble eksponert for *V. anguillarum* og deretter eksponert for torskeisolatet, ser man at det er gjennomsnittlig flere bakterier i fermenteringskammeret enn det er i baktarm. Tabell 3.4 viser også at det ikke er isolert *V. anguillarum* i fermenteringskammeret, mens den er funnet igjen i baktarm.

Tabell 3.4. Logaritmen av total levedyktige kolonier per gram tarm våt vekt (Log TVC). Viser totalantallet, og de ulike bakteriene som ble isolert i gruppen, Denne gruppen ble først ble eksponert for *V. anguillarum* i 30 min deretter for *C. maltaromaticum* i 30 min.

	Baktarm	Fermenteringskammer
Log TVC	2,98	4,78
Totalt antall isolater	61	39
Gram – negative bakterier		
<i>Vibrio wodanis</i> *	1,80	3,80
<i>Vibrio wodanis- lik</i>	2,19	4,10
<i>Photobacterium phosphoreum</i> *		3,10
<i>Vibrio logei</i> *		3,10
<i>Vibrio fischeri</i> *	1,19	
<i>Vibrio fischeri – lik</i>	1,19	
<i>Vibrio anguillarum</i> *	1,19	
<i>Vibrio anguillarum – lik</i>	1,97	
Gram- positiv bakterier		
<i>Shewanella hanedai</i> *		3,10
<i>Shewanella hanedai –lik</i>		3,10
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> *	2,15	4,02
<i>Carnobacterium maltaromaticum – lik</i>	2,60	4,30

* - isolater karakterisert ved hjelp av 16S rRNA

3.4. Mikroskopi del

3.4.1. Lysmikroskopi

Et sammendrag av ulike morfologiske forandringer basert på lysmikroskopi som ble observert etter hver behandling i baktarm er presentert i tabell 3.5. De lysmikroskopiske snittene viste at mikrovilli, cellekontakter, lamina propria og junction complex var normale i alle fem gruppene. Epitelcellene har løsnet fra basalmembranen, men dette er like fremtredende i kontrollfisk som i de andre gruppene. I alle gruppene var det et stort antall av goblet celler, men det var ingen forskjell mellom gruppene. Med så stort antall av goblet celler så det ut til at de normale epitelcellene var skviset sammen. I de områdene man kunne se epitelceller uten så stor mengde med goblet celler så vevet helt normalt ut i alle gruppene.

Tabell 3.5. Morfologiske forandringer av torskens baktarm basert på lysmikroskopiske undersøkelser for kontrollfisk, og de fire gruppene eksponert for ulike bakteriebehandlinger. Resultatene er basert på totalt 45 bilder med tre bilder fra hver fisk og tre fisker fra hver gruppe. De morfologiske forandringene som ble observert ble rangert etter denne skalaen, 0= ingen observert, 1 = lav (1 av 3 fisk), 2= moderat (2 av 3 fisk) og 3= høy (3 av 3 fisk).

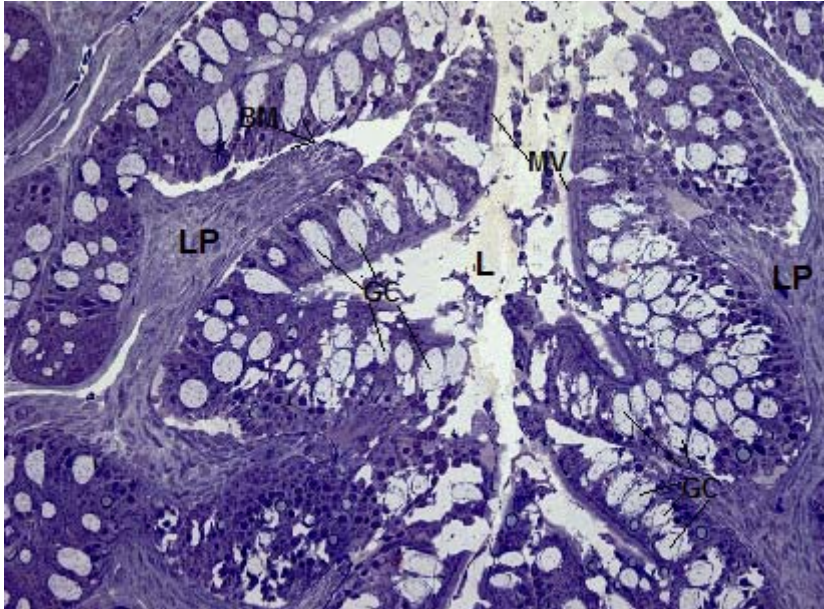
Morfologiske forandringer	Kontroll	<i>C. maltaromaticum</i>	<i>V. anguillarum</i>	<i>C. maltaromaticum</i> + <i>V. anguillarum</i>	<i>V. anguillarum</i> + <i>C. maltaromaticum</i>
Uorganisert mikrovilli	0	0	0	0	0
Unormale cellekontakter	0	0	0	0	0
Unormal lamina propria	0	0	0	0	0
Unormale cellekontakter	0	0	0	0	0
Epitelcellene løsnet fra basal-membranen	2	2	3	2	2
Antall goblet celler per synsfelt ved 40x	44	38	52	54	42

De ulike morfologiske forandringene basert på lysmikroskopi som ble observert, ved ulike behandlinger i fermenteringskammer, er presentert i Tabell 3.6. Det ble ikke observert noen morfologiske forskjeller i fermenteringskammer ved å se på snittene i lysmikroskopi. Det var noen individer som delvis hadde mistet mikrovilli, men det var i et begrenset område og kunne se ut som mekaniske skader. En av kontrollfiskene ble ikke tatt i betraktning fordi det ble observert store artefakter (Figur 3.10).

Tabell 3.6. Morfologiske forandringer av torskens fermenteringskammer basert på lysmikroskopiske undersøkelser for kontrollfisk og de fire gruppene eksponert for ulike bakteriebehandlinger. Resultatene er basert på totalt 45 bilder med tre bilder fra hver fisk og tre fisker fra hver gruppe. De morfologiske forandringene som ble observert ble rangert etter denne skalaen, 0= ingen observert, 1 = lav (1 av 3 fisk), 2= moderat (2 av 3 fisk) og 3= høy (3 av 3 fisk).

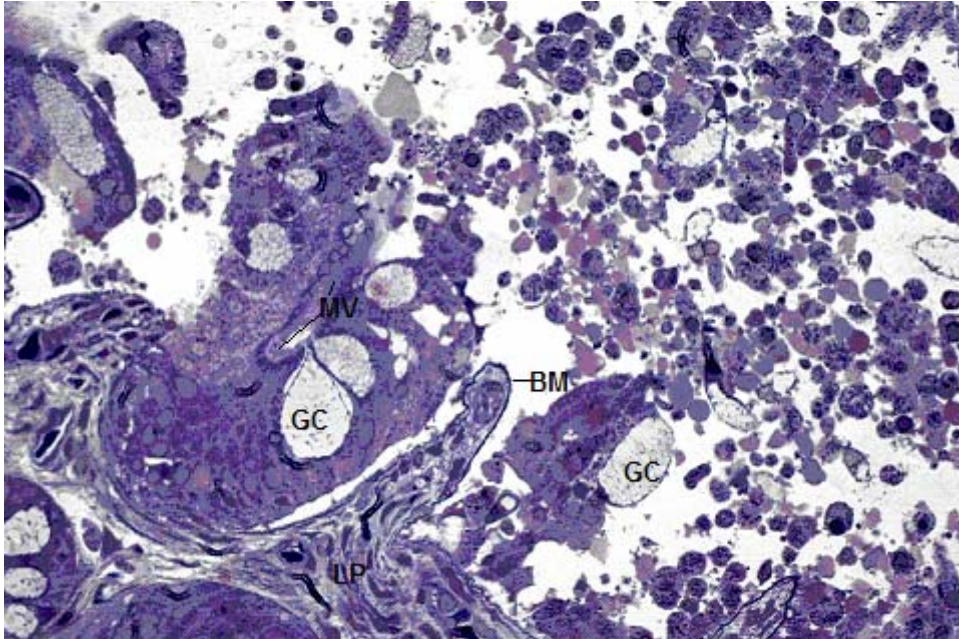
Morfologiske forandringer	Kontroll	<i>C. maltaromaticum</i>	<i>V. anguillarum</i>	<i>C. maltaromaticum</i> + <i>V. anguillarum</i>	<i>V. anguillarum</i> + <i>C. maltaromaticum</i>
Mangler mikrovilli delvis	0	0	1	2	1
Unormale cellekontakter	0	0	0	0	0
Unormal lamina propria	0	0	0	0	0
Unormale cellekontakter	0	0	0	0	0
Epitelcellene løsnet fra basal-membranen	2	2	3	2	2
Antall goblet celler per synsfelt ved 40x	44	22	23	23	35

Figur 3.9 viser snitt fra baktarm hos kontrollfisk. Her er det observert store mengder goblet celler. Denne fisken skilte seg ut fra resten av individene i kontroll gruppa. Der ut som om goblet cellene har presset bort det normale tarm-vevet.



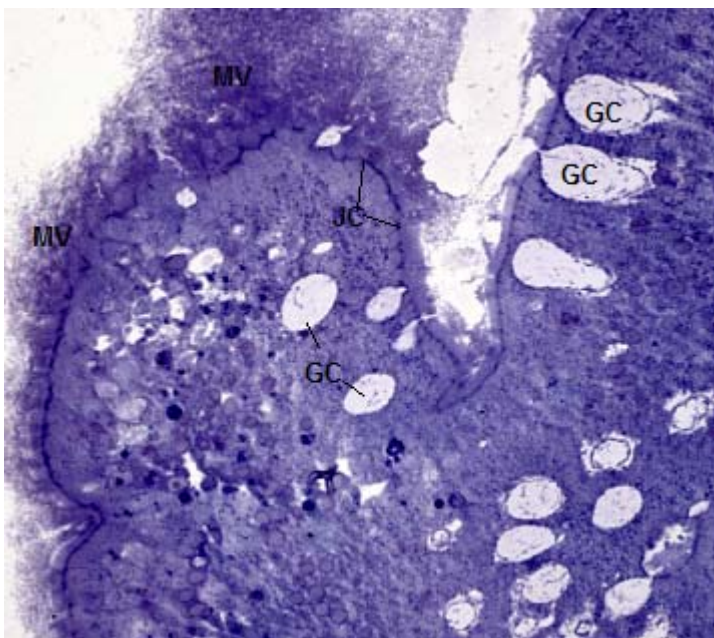
Figur 3.9. Snitt fra baktarmen hos kontrollfisk, viser et stort antall goblet celler. LP- lamina propria, L- lumen, GC- goblet celler, MV- mikrovilli, BM- basalmembranen.

Snitt av fermenteringskammer hos kontroll fisk er vist i Figur 3.10. Her er det store mengder celle- debris i lumen. Det kan være en artefakt, noe som er en mekaniske skader påført vevet ved preparering. Årsaken kan være at fikseringsvæsken ikke har trekt tilstrekkelig nok inn i vevet. Eksemplet viser at man må tolke bildene med en viss forsiktighet, og ikke utelukkende lete etter det man ønsker å finne.



Figur 3.10. Viser snitt fra fermenteringskammer hos kontrollfisk. Epitelcellene har nesten gått i oppløsning. GC- goblet celler, LP- lamina propria, BM- basalmembranen, MV- mikrovilli.

Figur 3.11 viser fermenteringskammer fra gruppen som ble eksponert for *C. maltaromaticum*. Vevet har et normalt utseende, og snittet viser de typiske lange mikrovilliene som man har i fermenteringskammer hos torsk.



Figur 3.11. I gruppen som er eksponert for *C. maltaromaticum* ble det ikke observert noe unormalt. De lange mikrovilliene som er karakteristisk for fermenteringskammer hos torsk. MV- mikrovilli, JC- junctional complex, GC – goblet celler

3.4.2. Morfologiske forandringer observert i transmisjons elektronmikroskopi (TEM).

I TEM undersøkelsen ble baktarm og fermenteringskammer undersøkt fra en fisk fra hver gruppe. Årsaken til dette er tidsbegrensninger og fordi det ikke ble registrert store synlige forskjeller innad i gruppene under lysmikroskopi. Rangsjering ble her gjort ved hjelp av ++, + og – i forhold til hvor mye som er observert.

Tabell 3.7 oppsummerer de observasjonene som ble gjort i baktarm. Goblet cellene var tilstede i store mengder i alle gruppene, men det var bare i kontrollfisken det ble observert fylte goblet celler. Det var den samme fisken som skilte seg ut med antall goblet celler under lysmikroskopi. En observerte en rodletcelle, dette i gruppen eksponert for torskeisolatet deretter *V. anguillarum*. Terminal- web var klart avgrenset, men det var ingen forskjeller mellom gruppene.

Tabell 3.7. Morfologisk beskrivelse av torskens baktarm basert på TEM fra kontrollfisk og en fisk fra hver av behandlingsgruppene. – angir at det ikke er observert i den gruppen, + angir at det er observert i liten grad og ++ angir at det er observert i hele preparatet.

Morfologiske forandringer	Kontroll	<i>C. maltaromaticum</i>	<i>V. anguillarum</i>	<i>C. maltaromaticum</i> + <i>V. anguillarum</i>	<i>V. anguillarum</i> + <i>C. maltaromaticum</i>
Avsnøringer av mikrovilli	-	+	+	+	+
Tomme goblet celler	++	++	++	++	++
Fylte goblet celler	++	-	-	-	-
Unormale cellekontakter	-	-	-	-	-
Rodlet celler	-	-	-	+	-
Protozo lignende organismer	-	-	-	-	-
Terminal web	Ca 2,5cm	Ca 1,9 cm	Ca 2,0	Ca 2,5 cm	Ca 2,4 cm

I fermenteringskammer var ikke terminal- web like avgrenset som i baktarm. Her ble det observert noen protozo lignende organismer i gruppen eksponert for *V. anguillarum* og deretter *C. maltaromaticum*. I den gruppen som bare ble eksponert for *V. anguillarum*, ble det observert et lite område med ødem hos fisken. Tabell 3.8 oppsummerer dette.

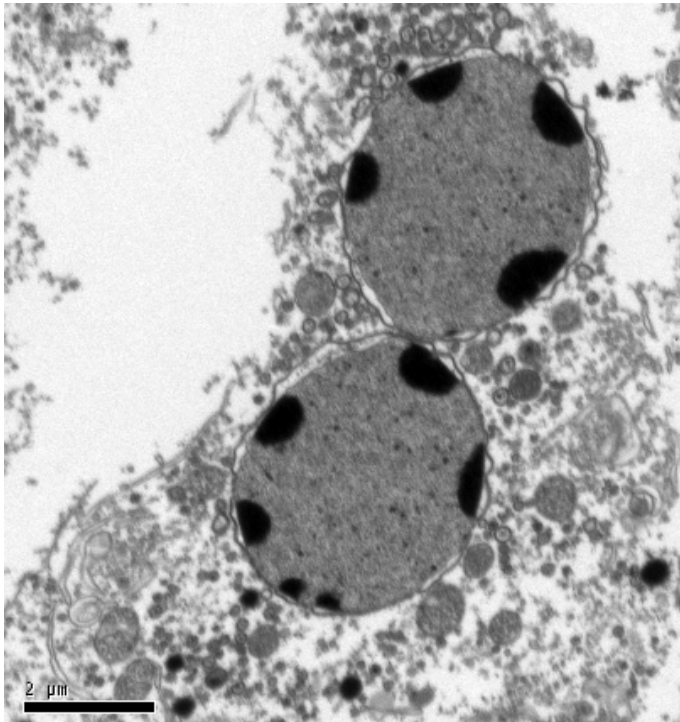
Tabell 3.8. Morfologisk beskrivelse av torskens fermenteringskammer basert på TEM fra kontroll fisk og en fisk fra hver av behandlingsgruppene. – angir at det ikke er observert i den gruppen, + angir at det er observert i liten grad og ++ angir at det er observert i store deler av preparatet.

Morfologiske forandringer	Kontroll	<i>C. maltaromaticum</i>	<i>V. anguillarum</i>	<i>C. maltaromaticum</i> + <i>V. anguillarum</i>	<i>V. anguillarum</i> + <i>C. maltaromaticum</i>
Avsnøringer av mikrovilli	-	-	-	-	-
Tomme goblet celler	+	+	+	+	+
Ødemer	-	-	+	-	-
Fylte goblet celler	-	-	-	-	-
Unormale cellekontakter	-	-	-	-	-
Rodlet celler	-	-	-	-	-
Protozo lignende organismer	-	-	-	-	+
Termina web	Ca 1,2cm	Ca 1,6 cm	Ca 1,6 cm	Ca 0,9 cm	Ca 1,5 cm

I baktarm hos kontrollfisken som skilte seg ut med et stort antall goblet celler i lysmikroskopi, ble det i TEM observert indikasjon på apoptose (Figur 3.12).

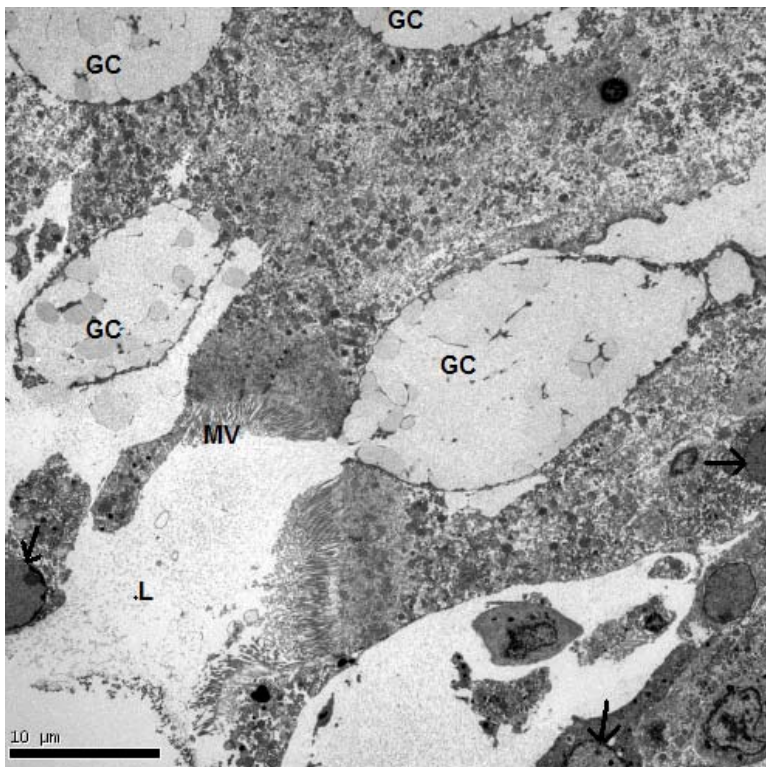
Apoptose, (regulert, ikke-nekrotisk celledød) et fenomen med fundamental betydning både for fosterutviklingen og for homøostase i modne vev. Slik at i vev som fornyes kontinuerlig (for eksempel hud og tarmslimhinne) vil apoptose automatisk inntre (Becker et al. 2003).

Apoptose er definert ut fra sin karakteristiske morfologi, med trinnvise forandringer hvor cellen skrumper. Kromatinet i kjernen kondenseres og fragmenteres, og det dannes membrankledde pakker med celleinnhold som fagocytteres av naboceller eller makrofager. Det er en renslig form for celledød, som ikke etterlater seg spor etter cellerester (Becker et al. 2003). Figur 3.12 viser kontrollfiskens baktarm, her har kromatinet samlet seg langs cellemembranen som er et typisk tegn på apoptose.



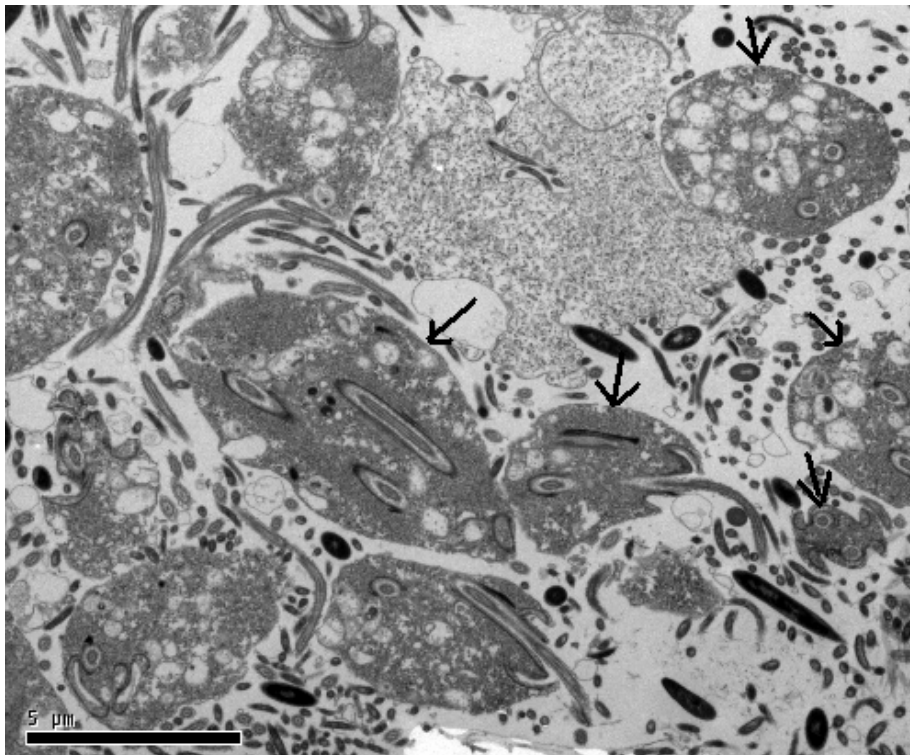
Figur 3.12. Hetrokromatin har her lagt seg rundt cellemembranen.

I området som viste tegn til apoptose var det mange goblet celler som var fulle og en del goblet celler som tømte seg i lumen, slik som Figur 3.13 viser.

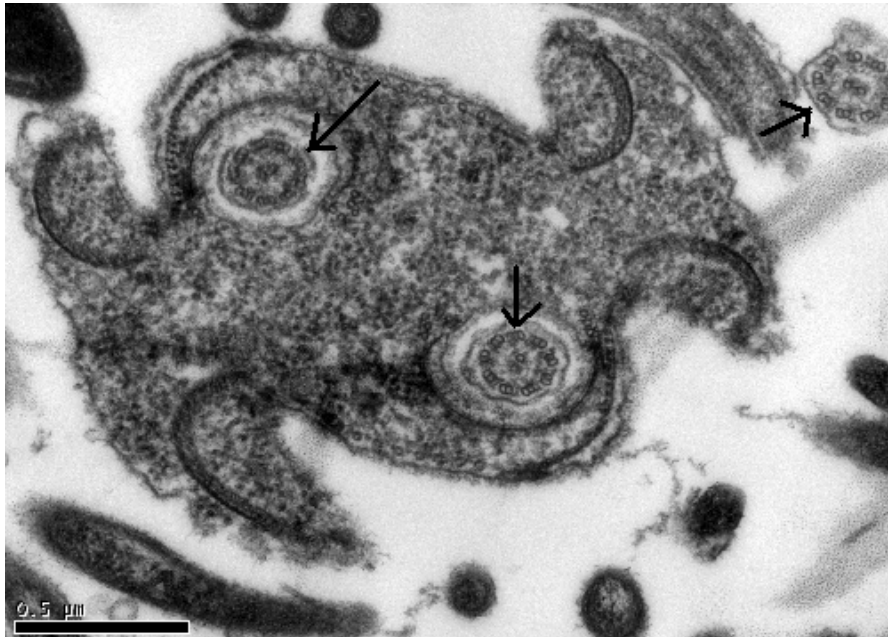


Figur 3.13. Baktarm hos kontrollfisk og viser goblet cellene som tømmer seg i lumen. Pilene viser celler der kromatin har begynt å samle seg rundt cellemembranen. GC- goblet celle, MV- mikrovilli, L- lumen.

I TEM ble de ikke observert de store forskjellene mellom gruppene. Det ble observert noen protozo lignende organismer i snitt fra fermenteringskammeret (Figur 3.14). Det ble observert den typiske 9 + 2 strukturer, tilsvarende det man finner i cilier og flageller (Figur 3.15). Denne strukturen er spesiell, tykkelsen på disse var ca 0,20 μm ut fra et gjennomsnitt av 20 stk. Det ble ikke observert noen stivelses vakuoler eller ”granum” som er spesielt for klorofyll (Musser et al. 1984; Becker et al 2003). Det ble observert ru endoplasmatisk retikulum, mitokondrier og golgi apparatet.



Figur 3.14. Pilene viser de protozolignende organismene som ble påvist i fermenteringskammeret. Dette snittet er fra gruppen som ble eksponert for *V. anguillarum*.



Figur 3.15. Pilene viser en typisk 9 + 2 strukturen som ble observert i de protozoalignende organismene. Denne er en typisk for flageller og cilier.

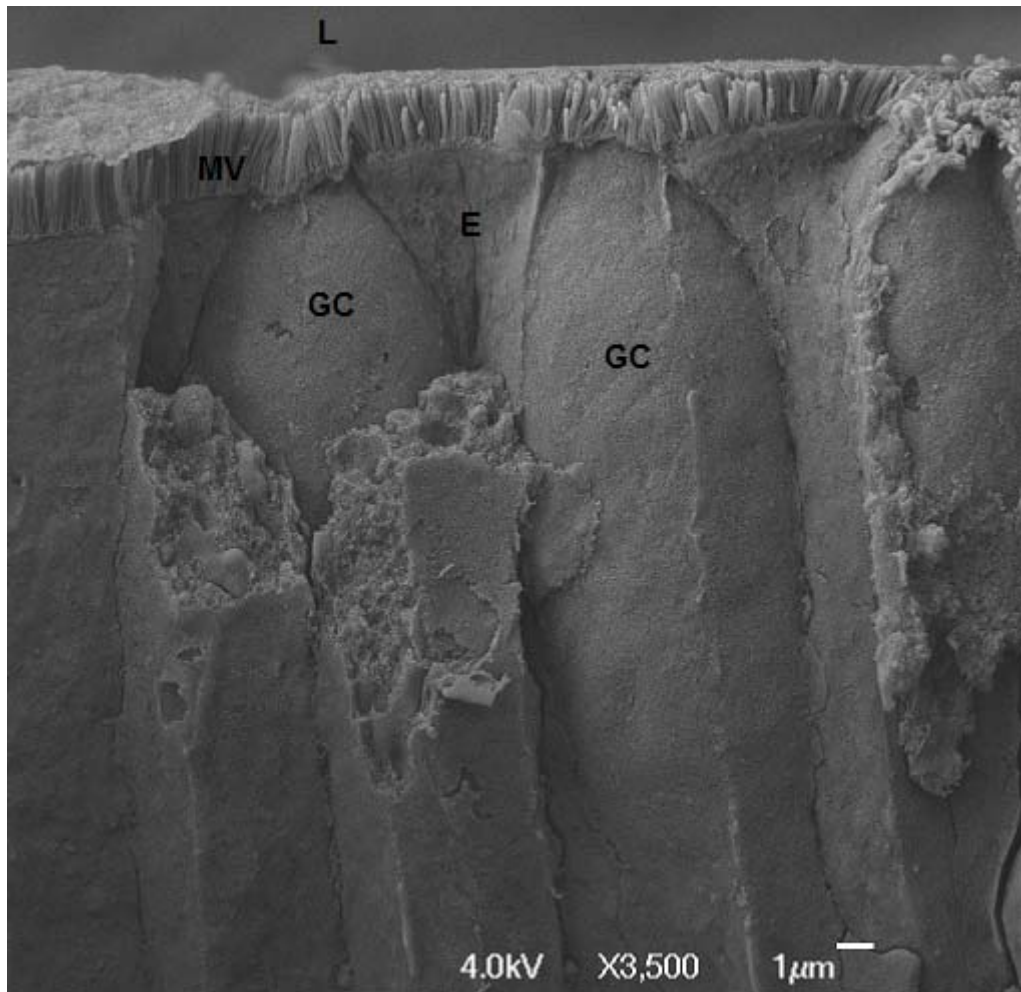
3.4.3. Strukturelle forandringer observert ved hjelp av skanning elektron mikroskopi (SEM)

For undersøkelse i SEM valgte man å se på de samme tarmdelene som ble undersøkt i TEM.

Det ble ikke observert noe som tyder på at de ulike behandlingene har påvirket tarmen.

Figuren 3.16 viser et oversiktsbilde av baktarm i gruppen som ble eksponert for *C.*

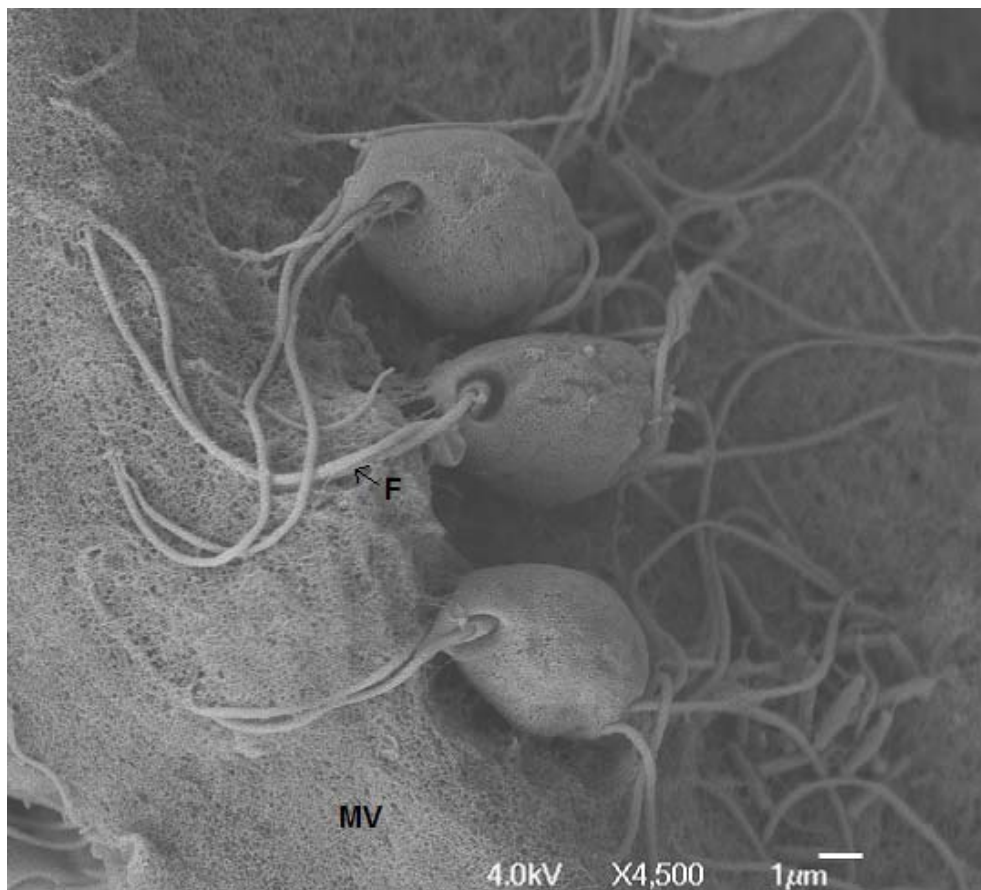
maltaromaticum. Her ser vi mikrovilli som står tett og systematisk, og det store antallet goblet celler som ble observert i lysmikroskopisnitt.



Figur 3.16. Baktarmen hos fisk eksponert av *C. maltaromaticum*. Goblet cellene klemmer sammen epitelcellene. I enkelte områder i baktarmen var det store mengder av begerceller. MV- mikrovilli, L- lumen, E- enterocytter, GC- goblet celler.

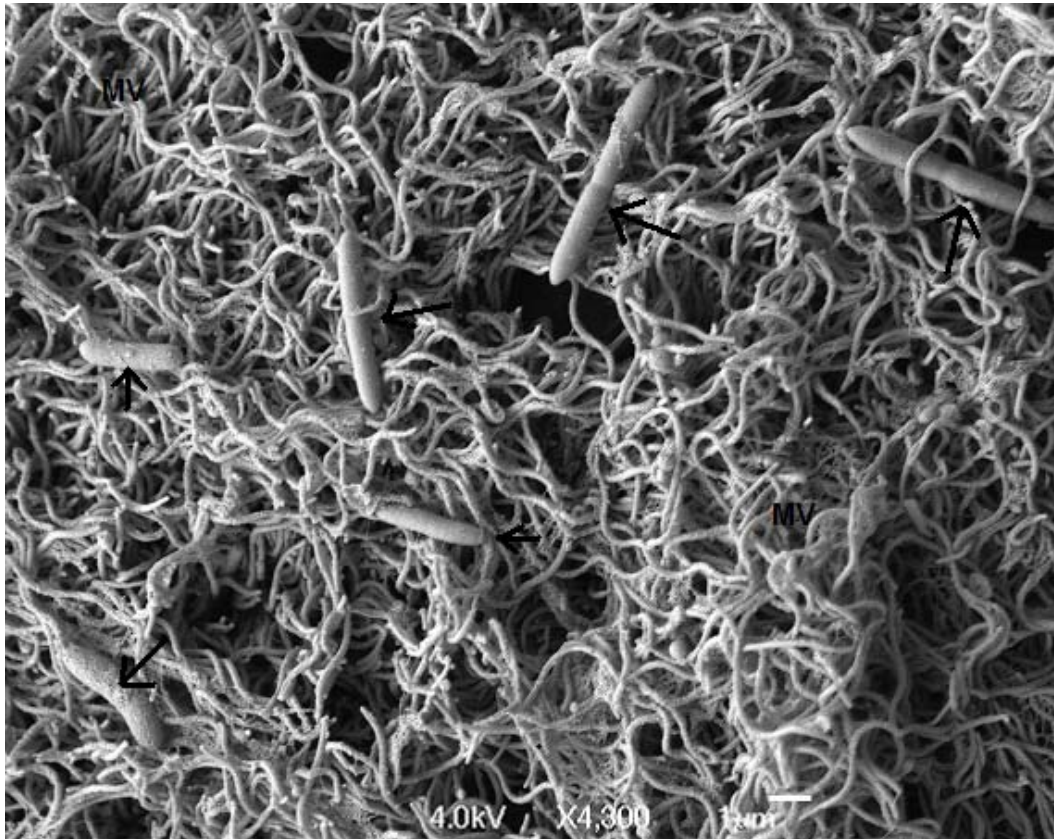
De protozolignende organismene som ble påvist i TEM undersøkelsen, ble observert i alle preparatene fra fermenteringskammer i SEM, uavhengig av behandling. Flagellene ble målt til å ha en diameter på 0,22 µm og en lengde på 16 µm, dette er et gjennomsnitt av 60 målinger. Organismen ble målt til å ha en diameter på 3,13 µm basert på gjennomsnitt av 23 dyr. Mikrovilli i fermenteringskammert ble målt til å ha en diameter på 0,11 µm. Denne verdien er gjennomsnittet av 43 målinger.

Figur 3.17 viser et SEM bilde av protozo lignende organismer, og de har noen få men lange flageller. Disse organismene ble påvist hos alle individene som ble undersøkt uavhengig av hva tarmen er blitt eksponert for.



Figur 3.17. SEM mikroskopisk bilde av fermenteringskammer fra fisk kontrollgruppa. Protozolignende organismer med få men lange flageller er assosiert med mucus på enterocyt overflaten. F- flageller, MV- mikrovilli.

I SEM undersøkelsen ble det observert flere bakterier i fermenteringskammeret (Figur 3.18). Figuren viser fermenteringskammer fra den gruppen som først ble eksponert for *C. maltaromaticum* og deretter eksponert for *V. anguillarum*, her ser vi flere bakterier. Denne observasjonen forteller oss at det finnes mange bakterier gjemt mellom de lange mikrovilliene i fermenteringskammeret.



Figur 3.18. Flere bakterier (piler) har gjemt seg i det lange mikrovilliene i fermenteringskammeret. Denne gruppen er eksponert for *C. maltaromaticum* så for *V. anguillarum*. MV- mikrovilli.

4. Diskusjon

4.1. Bakteriologi

I tre tidligere arbeider av Ringø et al. (2004; 2007b) og Salinas et al. (2007) ble *in vitro* metodene ”*ussing chamber*” og ”*intestinal sack*” benyttet for å undersøke skade effekt av patogene bakterier i tarm hos laks. I disse arbeidene undersøkte ikke forskerne tarm mikrobiota før og etter at tarmen ble eksponert av bakterier. Imidlertid ble dette undersøkt av Løvmo (2007) i liten skala, hvor 13 bakterier ble plukket ut på bakgrunn av morfologi for deretter å bli identifisert ved hjelp av 16S rRNA.

Denne oppgaven er en videreføring av arbeidet til Løvmo (2007) og er det første hvor en har isolert, rendyrket og karakterisert tilstrekkelig mange bakterier. Dette for å kunne si noe om sammensetningen av bakterier før og etter at tarmen ble eksponert for bakterier (*Vibrio anguillarum* og *Carnobacterium maltaromaticum*). I dette studiet ble det dyrket renkulturer av 269 tarmisolater. Alle renkulturene ble testet for Gram reaksjon, katalase, oksidase- og fermentering. Ut fra disse resultatene ble det valgt ut 103 isolater som ble sekvensert ved hjelp av 16S rRNA. Imidlertid skal en ut fra 16S rRNA sekvenseringen være forsiktig med å si noe sikkert med hensyn til hvilken art de forskjellige isolatene tilhører, men man kan antyde hvilke bakterier som er isolert.

V. anguillarum stammen som ble benyttet i dette forsøket er opprinnelig isolert fra klinisk vibrio syk Atlantisk torsk og er tidligere sekvensert av Colquhoun & Rodger (upubliserte data, NCBI). Sekvensering av torskeisolatet opprinnelig isolert fra fermenteringskammer hos torsk (Seppola et al. 2006) viste at isolatet var 100 % identisk med *Carnobacterium maltaromaticum* (GenBank accession no. EF 204311). Denne bakterien ble første gang isolert fra rå melk (Zacharov & Halpern, upublisert data, NCBI).

I alle eksperiment gruppene, i begge segmentene (baktarm og fermenteringskammer) ble det isolert mange bakterier som hadde høy likhet med *Vibrio wodanis* (GenBank accession no. Y17575). Denne bakterien ble første gang beskrevet av Lunder et al. (2000), og ble isolerte fra vintersår hos Atlantisk laks. Det er diskutert om *V. wodanis* sammen med *Vibrio viscosus*, i dag benevnt som *Moritella viscosus*, er bakteriene som i hovedsak forårsaker vintersår hos Atlantisk laks. Blant vibrio artene som blir isolert fra vintersår hos Atlantisk laks, er *V. wodanis* et vanlig funn. På bakgrunn av at *V. wodanis* så ofte er isolert i tilknytning til sår har det blitt gjennomført flere smittforsøk for å vurdere virulens hos denne bakterien. Til tross for høye doser injisert i bukhulen, er det så langt ikke påvist at *V. wodanis* alene kan

gjenscape sykdomsbildet knyttet til vintersår eller å øke dødelighet når den er smittet sammen med *M. viscosus*. Man kan imidlertid ikke se bort fra at tilstedeværelsen av denne bakterien kan bidra til videreutvikling av allerede etablerte sår (Thorarinsson & Lystad, 2003).

I baktarm hos kontrollfisk ble det også isolert en bakterie som hadde høy likhet med *Vibrio logei* (GenBank accession no. AY292932) tidligere beskrevet av Nishiguchi & Nair (2003) i et studie der man undersøkte lysorganer hos fisk.

I kontroll gruppens baktarm ble bakterien *Photobacterium phosphoreum* (GenBank accession no. AY888014) isolert, den er tidligere isolert fra skinn hos torsk i Alaska (Ast & Dunlap 2005).

I fermenteringskammer til kontrollfisken ble fem ulike bakterier karakterisert. Sammenligner man kontrollfiskens baktarm med fermenteringskammeret, ble det isolert *Staphylococcus epidermis* (GenBank accession no. AB305326) og *Vibrio fischeri* (GenBank accession no. AY292949) i fermenteringskammeret i tillegg til de bakteriene som ble isolert fra baktarm. Generelt viser resultatene at *V. wodanis* er en bakterie som har naturlig tilhold i tarmen hos torsk. Bakterien utgjør en stor andel av totalantallet, både i behandlet og ubehandlet tarm. Med bakgrunn i denne observasjonen så antas det at bakterien ikke blir ”utkonkurrert”, siden den ble isolert fra tarm i alle behandlings gruppene.

Når tarmen er eksponert for *C. maltaromaticum* påviser man den i begge segmentene, og i begge gruppene som ble eksponert for denne bakterien. På bakgrunn av disse resultatene fremsetter jeg hypotesen om at *C. maltaromaticum* er i stand til å feste seg i tarmen. Denne hypotesen må etterprøves i senere studier der en for eksempel benytter fluoricens merking eller immunogull merking, for å påvise bakterien. Disse to metodene er benyttet for å påvise *L. delbruecki* ssp. *lactis* i fremtarm hos Atlantisk laks (Salinas et al. 2007) og *A. salmonicida* spp. *salmonicida* i tarm hos røye (Lødemel et al. 2001). Når det gjelder *V. anguillarum* sin evne til å feste seg til tarm mucus, så framsatte Olsson et al. (1996) en hypotese om at bakterien er i stand til å feste seg i mucus hos piggvar (*Scophthalmus maximus* L.). Dette er i overensstemmelse med mine resultater, men ingen av disse arbeidene har merket bakteriene og kan derfor ikke være helt spesifikke. Av resultatene presentert i denne oppgaven kan det se ut som om *V. anguillarum* ikke har samme evne til å feste seg i mucus overflater i tarmen som *C. maltaromaticum*.

Det kan se ut som om at de bakteriene som tarmen ble eksponert for på mange måter ”utkonkurrerer” noen av de bakteriene som opprinnelig var tilstede i tarmen. I begge segmentene av tarmen er *V. logei* nesten fullstendig utkonkurrert, da bakterien ble påvist i små mengder (3 %) i fermenteringskammeret i den gruppen som ble først eksponert for *V.*

anguillarum og deretter for *C. maltaromaticum*. De andre bakteriene som ble isolert fra kontrollfisken er til stede, men i mindre mengder.

I dette arbeidet er det vist at den probiotiske bakterien *C. maltaromaticum* var tilstede i tarmen selv etter eksponering ovenfor *V. anguillarum*. Arbeidet til Salinas et al. (2007) var det første som viste at ved å eksponere fisketarm (laks) oven for en melkesyrebakterie (*L. delbruecki* ssp. *lactis*) så er den i stand til å kolonisere fremtarm. Effekten av probiotiske bakterier er generelt akseptert for å ha gunstige helsemessige effekter for varmblodige dyr (Ouwehand et al. 2002). I studier av fisk er det vist at probiotiske bakterier økte sykdomsresistansen og stimulerte immunsystemet (Nikoshelaine et al. 2001; Iranto & Austin 2003; Ringø et al. 2004;2007b). Ringø et al. (2007b) har også vist at en probiotisk bakterie *C. divergens*, kan være med på å begrense skadene forårsaket av patogene bakterier. I dette studiet og arbeidet til Salinas et al. (2007) vises det at probiotiske bakterier kan være i stand til å kolonisere tarmen. Denne observasjonen kan tyde på at disse bakteriene kan ha langidsvirkninger, og resultatene bør stimulere bakteriologer til videre å undersøke interaksjoner mellom gode bakterier (for eksempel melkesyrebakterier og *Bacillus*) og ulike fiskepatogene bakterier i fisketarm.

4.2. Lys- og elektron mikroskopi.

I denne delen av arbeidet har jeg undersøkt histologiske forandringer i baktarm og fermenteringskammer hos torsk, som følge av eksponering av *C. maltaromaticum* og *V. anguillarum* bakterier. *V. anguillarum* er i tidligere arbeid vist å være en patogen bakterie med tarm som infeksjonsvei hos både sebrafisk (O'Toole et al. 2004) og laks (Ringø et al. 2007b). Den patogene bakterien som er brukt i denne oppgaven er isolert fra hodenyre hos syk torsk.

Effektene av de ulike behandlingene er visualisert ved lysmikroskop (LM), transmisjon elektron mikroskopi (TEM) og scanning elektron mikroskopi (SEM), og noen av resultater som ble påvist i dette studiet er forskjellig fra det som tidligere er observert i studier med laks. Hos laks er det observert uorganiserte/ ødelagte mikrovilli, ødemer og ødeleggelse av entrocyttene ved eksponering av patogene bakterier (Ringø et al. 2007b; Salinas et al. 2007), mens tilsvarende morfologiske forandringer ikke ble påvist hos torsk eksponert ovenfor *V. anguillarum*.

Ut fra morfologiske forandringer observert ved LM synes det ikke å være store forskjeller om tarmen har vært eksponert for bakterier eller ikke. Det er heller ikke observert tilsvarende endringene (lyse epitelcellekjerner) som ble påvist når fremre del av tarm ble eksponert ovenfor bakterier (Løvmo, 2007). Det er observert at epitelcellene delvis har løsnet fra basalmembranen. Løvmo (2007) beskriver dette som en endring på grunn av bakterie eksponering i fremre del av tarmen. I dette arbeidet ser det ut som om det er en artefakt (Reidar Myklebust, personlig meddelelse). Baktarmen hos torsk er veldig muskulær. Det vil medføre at den hurtig trekker seg sammen. Denne voldsomme sammentrekningen kan kanskje føre til at epitelcellene delvis løsner fra basalmembranen. Videre observerte Løvmo (2007) at goblet cellene var fylt i gruppene som var eksponert for bakterier. I dette studiet ble ikke disse morfologiske endringene påvist. Det ble imidlertid observert store mengder med goblet celler, og i større omfang i baktarm enn i fermenteringskammeret. Det er ikke observert forskjeller i mengden goblet celler mellom de ulike behandlings gruppene i baktarm ved bruk av LM, bortsett fra et individ fra kontroll gruppen. Årsaken til økningen av goblet celler bakover i tarmen er å lette passasjen av avføring etter hvert som den blir tørrere (Kryvi og Totland 1997). I TEM undersøkelsene ble det ikke observert noe som kan betraktes som ”unormalt” i baktarm.

I baktarm fra en kontrollfisk basert på LM ble det påvist større antall goblet celler, enn hos de andre fiskene fra denne gruppen. Det kunne se ut som om fisken i kontroll gruppen mistet mye celler og hadde mye celledetring i lumen. Årsaken til dette er vanskelig å se ut fra LM. I TEM undersøkelser av kontrollfiskens baktarm ble det observert at vevet besto av mange fylte goblet celler og at det i et område ble påvist apoptose (programmert celledød). Ved apoptose er hetrokromatin oppkveilt noe som gjør cellene mørkere, mens eukromatin er aktivt og utkveilt (Raven & Johnson 2002). I hele område der apoptose ble påvist (se figur 3.12 og 3.13) kan det se ut som om vevet skiftes ut, mens tarmen produserer store mengder slim for beskyttelse. Det kan se ut som om at goblet cellene produserer slim i store mengder for å beskytte tarmen på best mulig måte. På denne måten blir døde celler skilt ut samtidig som bakterier og andre ting som kommer inn i tarmen blir skyldt unna vei når tarmen fornyer vevet. Dette kan være årsaken til at det var mye ”celledetring” i lumen.

Det er tidligere sett at enkelt celler dør, noe en trodde medførte at tarmen skifter ut en celle umiddelbart. Denne observasjonen kan tyde på at tarmen fornyer cellene også på andre måter, blant annet at den skifter ut større område av gangen og at den beskytter seg selv ved å skille ut store mengder slim. Celledelingen skjer langsommere hos fisk sammenlignet med pattedyr,

selv temperaturen tatt i betraktning (Krogdal, 2001). Med bakgrunn i det vil fisk i lengre tid være sårbar for infeksjoner når cellene skiftes ut.

Ringø et al. (2004; 2007b) og Salinas et al. (2007) har også registrert celledetring i lumen og uorganiserte mikrovill etter eksponering av høye konsentrasjoner av patogene bakterier. I dette studiet mener jeg å se noe av de samme effektene på kontrollfisk. Dette kan tyde på at ødeleggelsene i lumen ikke utelukkende skyldes de patogene bakteriene, men at det også kan være et resultat av apoptose.

Det ble observert flagell/ cilie strukturer, i fermenteringskammer i gruppen der fisken ble eksponert for *V. anguillarum* og *C. maltaromaticum*. Denne 9 + 2 tubuli strukturen er spesifikk for flageller og cilier (Becker et al. 2003). Diameteren er den samme for flageller og cilier. Det som skiller de er lengden og antallet per celle. Lengden ble målt til 16 µm, lengden på flagellene er mellom 10- 200 µm, mens ciliene har en lengde på 2- 10 µm (Becker et al. 2003). Ciliene kan være opp til flere hundre på en celle, mens flagellene er noen få. I dette studiet er det påvist 8 strukturer per organisme, noe som tyder på at det er flageller. I disse cellene som hadde flageller ble det ikke observert klorofyll. Derfor kan vi utelukke at det er alger, da disse har klorofyll (Graham & Wilcox 2000; Becker et al. 2003).

Løvmo (2007) observerte avsnøringer av mikrovilli apikalt i de to gruppene som hadde vært eksponert for bakterier (*C. divergens* og *V. anguillarum*), og konkluderte med at denne avsnøringen trolig ikke var en artefakt. Tilsvarende avsnøringer ble i dette studiet ikke observert i samme grad som av Løvmo (2007), men i TEM preparater med de fire gruppene som var eksponert for bakterier kunne man se antydninger til avsnøringer i baktarm. I fermenteringskammeret kunne man ikke observere dette fenomenet. Ved nøye studering av bilder publisert i arbeidene til Odense & Bishop (1966) og Morrison (1987) ser man antydninger til avsnøringer av mikrovilli, men ikke i samme omfang som vist av Løvmo (2007). I disse tre arbeidene er det TEM bilder fra fremre del av tarmen som er vist. Årsaken til avsnøringer av mikrovilli kan være en forsvarsmekanisme, som trolig er først barriere mot bakterier. Det kan se ut som om at dette er noe som bare foregår i stort omfang i fremre del av tarmen, og som muligens er mindre viktig i bakre del av tarmen. Nå er det også slik at jo lengre bak i tarmen man kommer jo flere goblet celler har fisken, noe som vil medføre større slimproduksjon. Kanskje inngår avsnøring av mikrovilli i den primære forsvarsmekanismen mot bakterier i fremtarm mens den bakre delen av tarmen ikke har samme behov som fremre del til å avsnøre mikrovilli for beskyttelse.

Fermenteringskammeret har ikke like mange goblet celler som baktarmen, men her er mikrovilli betydelig mye lengre 5,6 μm sammenlignet med 2,2 μm i baktarm. De lange mikrovilliene i fermenteringskammer kan derfor være viktig i å hindre at bakterier trenger inn i epitelcellene (translokering).

Rodlet celler ble første gang beskrevet av Thelohan i 1892, men er bare observert hos beinfisk (Reite 2005). Siden den første beskrivelsen i 1892 har det vært fremsatt to forskjellige hypoteser om hvilken funksjon denne celle typen har. Noen forskere mener at de er en parasitt (Hale 1965; Bannister 1966; Anderson et al. 1976; Bielek & Viehberger 1983) mens andre er av den oppfatning at de er en type immunceller (Leino 1974; Desser & Lester 1975; Morrison & Odense 1987; Smith et al. 1995). Rodlet celler har et dråpeformet utseende og cytoplasma synes ofte å inneholde elektron tette staver (Reidar Myklebust, personlig meddelelse). Et annet typisk trekk ved rodlet cellene er den tykke kapselen som omgir cellen (Leino 1974). I dette studiet ble det observert en rodlet celle i baktarm som først ble eksponert for *C. maltaromaticum* og deretter for *V. anguillarum*. Løvmo (2007) observerte rodletceller i fremtarm hos torsk eksponert for bakterier. Rodlet celler er også påvist i fremtarm hos Atlantisk laks (Salinas et al. 2007).

Terminal web er et nettverk av fine filamenter, som ligger like under basis av mikrovilli og over epitelcellene (Biology- online. Org 2007). Terminal web ser ut til å ha en støttende cytoskjelett funksjon. Odense og Bishop (1966) publiserte TEM bilder fra fremre del av tarm hos torsk, og forskerne viser på disse bildene en klar terminal web. I dette studiet var det en klart avgrenset terminal web i baktarm, med små eller ingen forskjeller mellom gruppene. I fermenteringskammeret var ikke terminal web like avgrenset. Det kan se ut til at denne delen av tarmen ikke har den samme morfologiske oppbygningen som frem og baktarm. Disse observasjonene er med på å styrke tidligere antagelser om at morfologien i tarm hos laks og torsk er forskjellig.

Når det gjelder strukturelle forandringer observert ved hjelp av SEM, ble det ikke observert noe som tyder på at de ulike behandlingene har påvirket tarmen. I baktarmen ble det observert en stor andel av goblet celler, som tilsynelatende presser ut de normale epitelcellene. Tilsvarende observasjoner er ikke påvist i fremtarm (Odense & Bishop 1966; Morrison 1987; Løvmo 2007).

I SEM undersøkelsen av fermenteringskammer ble det observert protozolignende organismer med flageller i alle gruppene uavhengig av behandling. I TEM undersøkelsen ble disse organismene kun påvist i gruppen eksponert ovenfor *V. anguillarum* og deretter *C. maltaromaticum*.

I henhold til Tor Atle Mo (Veterinærinstituttet, Oslo) som har studert bildene som er vist i figur 3.14, 3.15 og 3.17 tilhører organismen en art av den encellede parasitten *Spironucleus*. Hos torsk er det tidligere påvist en art, *Spironucleus torsa* (Poynton & Morrison 1990), mens det hos laksefisk er påvist *Spironucleus salmonis* (Poynton et al. 2004). Poynton & Morrison (1990) har beskrevet *Spironucleus torsa* taksonomisk, der de beskriver at den først og fremst vil finnes i rektum hos torsk. I denne oppgaven ble den bare påvist i fermenteringskammer, det samme område som Poynton & Morrison (1990) definerer som rektum. Det er ikke kjent at denne arten er til sjenanse for sine verter, og betegnelsen kommensal er nok mer passende enn ”parasitt” (Mo et al. 1999). Kommensalisme er et samliv mellom organismer til fordel for den ene part og uten å skade den andre, verten (Bush et al. 2001).

5. Konklusjon

Med hensyn til de morfologiske forandringene basert på LM, TEM og SEM, er det i dette studiet små eller ingen forskjeller mellom de ulike gruppene fisk som ble undersøkt. Dette er ikke i samsvar med det som er vist i *in vitro* studier av laks (Ringø et al. 2004; 2007b; Salinas et al. 2007). Det kan være med på å underbygge at man ikke direkte kan overføre resultatene som er påvist hos Atlantisk laks til andre arter som for eksempel torsk. Det kan derfor være viktig å undersøke ulike fiskeslags reaksjon på patogene bakterier, for på denne måten å danne seg et helhetlig bilde over hva som skjer i tarm som utsettes for patogene bakterier. I et tidligere arbeid ble det vist at 6×10^6 *Vibrio anguillarum* forårsaket store skader i fermtarmen hos laks (Ringø et al. 2007b). Da tilsvarende skader ikke ble påvist i fremtarm hos torsk eksponert for 2×10^6 *V. anguillarum* isolert fra syk torsk (Løvmo 2007), valgte man å studere andre deler av tarmen i dette studiet. Heller ikke observasjonene i dette studiet som er gjort av torskens baktarm og fermenteringskammer viser skader. Bakterie konsentrasjonen som er brukt i dette forsøket er på $5,3 \times 10^6$ *V. anguillarum*. Forskjellene mellom konsentrasjonene i de tre forsøkene er så små at de trolig ikke kan være årsaken til at det observeres forskjeller.

En har i denne oppgaven benyttet *Carnobacterium maltaromaticum* som opprinnelig er isolert fra fermenteringskammer hos torsk (Seppola et al. 2006). *Carnobacterium divergens* isolert fra røye har vist seg å ha antagonistisk effekt ovenfor en *V. anguillarum* stamme isolert fra laks (Ringø et al. 2002). I et nylig studium (Ringø et al. 2007b) ble det vist at denne bakterien har positiv effekt på laksetarm gjennom begrensninger av skadene som ble påført av de patogene bakteriene. Resultatene i denne oppgaven viser ikke noe entydig positiv effekt av *C. maltaromaticum*, men det kan også være vanskelig å si noe entydig om dette fordi *V. anguillarum* ikke viser seg å forårsake skader i tarmen hos torsk som hos laks

I dette arbeidet har man ikke påvist at *V. anguillarum* forårsaker celledskader i baktarm og fermenteringskammer hos torsk, men at bakterien har evne til å feste seg til i tarmen. Tids aspektet er ikke tatt med i denne oppgaven. Det kan tenkes at *V. anguillarum* trenger lengre tid for å forårsake skader enn det som er tatt høyde for i dette studiet. I dette forsøket er eksponeringstiden en time, som er det samme som en har benyttet i studier av laks (Ringø et al. 2007b) hvor det ble påvist celledskader. Det er videre mange ytre ulikheter på torskens og laksens tarm. Blant annet er torsketarm mer muskulær og er lengre, noe som kan ha innvirkning på bakteriens evne til å skade tarmen.

Resultatene fra den mikrobiologiske delen av oppgaven forteller at både den patogene og den probiotiske bakterien er i stand til å feste seg til tarmen hos torsk. Det kan videre se ut som om at den probiotiske bakterien fester seg bedre enn den patogene.

For å være i stand til å konkludere med større sikkerhet, bør et videre forskningsarbeid baseres på flere elektronmikroskopi bilder enn hva som er foretatt i dette studiet. På denne måten kan en teste funnene statistisk. I denne oppgaven er det bare tatt slike bilder av en av de tre individene i hver gruppe.

Når det gjelder utvalget i den mikrobiologiske delen, baserer disse dataene seg på tre individer fra hver gruppe. Ideelt sett burde man ha fem - seks individer fra hver gruppe. Tidligere studier av tarmmikrobiologien hos fisk generelt har vist store variasjoner. Variasjon mellom de ulike individene samt dags variasjoner (Ringø et al. 1995).

I det videre forskningsarbeidet på den probiotiske bakterien, bør trolig bakterien merkes, for eksempel med immunogull eller grønn fluoresens, slik at man med sikkerhet kan si at man finner igjen bakterien.

6. Referanser

- Anderson, C.D., Robertson R.J., MacKenzie, K. & McVicar, A.H. (1976).** The hepatorenal syndrome in cultured turbot (*Scophthalmus maximus* L.) Journal of Fish Biology 8: 331-341.
- Ast, J.C. & Dunlap, P.V. (2005).** Phylogenetic resolution and habitat specificity of members of the Photobacterium phosphoreum species group. Environmental Microbiology 7; 1641-1654.
- Bakken, Y. (2002).** Histological studies of pyloric caeca of Atlantic salmon (*Salmo Salar* L.) fed diets containing linseed-, soybean-, and marine oils. – Effects of challenge with *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida*. Cand. Scient. Thesis. Norges fiskerihøgskole, Universitetet i Tromsø.
- Bannister, L.H. (1966).** Is *Rhabdospora thelohani* (Laguesse) a sporozoan parasite or a tissue cell of lower vertebrates? Parasitology 56: 633-638.
- Becker, W.M., Kleinsmith, L.J. & Hardin, J. (2003).** The world of the cell, 5th edition. Benjamin Cummings, San Francisco s 802.
- Bergot, P., Solair, A. & Luquet, P. (1975).** Dimension des cæca pyloriques chez la truite arc-en-ciel. Influence de la taille du poisson et du nombre de cæca. Annales d'Hydrobiologie 6: 27- 43.
- Bielek, E. & Viehberger, G. (1983).** New aspects on the “rodlet cell” in teleosts. Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology 15: 681-694
- Biology-online. Org (2007).** http://www.biology-online.org/dictionary/Terminal_web
- Birkbeck, T.H. & Ringø, E. (2005).** Pathogenesis and the gastrointestinal tract of growing fish. In: Microbial Ecology in Growing Animals. Holzappel, W.H & Naughton, P.J. (Eds) Elsevier, Edinburgh, s 208- 234.
- Bishop, C. & Odense, P.H. (1966).** Morphology of the digestive tract of the cod, *Gadus morhua*. Journal of the Fisheries Research Board of Canada 23: 1607-1615.
- Bozzola, J.J. & Russell L.D. (1991).** Electron Microscopy Principles and Techniques for Biologists. Jones and Bartlett Publisher, Boston 542s
- Buddington, R.K. & Diamond, J.M. (1987).** Pyloric ceca of fish- a new absorptive organ. American Journal of Physiological 166: G65- G76.
- Bush, A.O., Fernández, J.C., Esch, G.W. & Seed, J.R. (2001).** Parasitism. The diversity and ecology of animal parasites. Cambridge University Press, Cambridge s 566.
- Cahill, M.M. (1990).** Bacteri flora of fishes: a review. Microbial Ecology. 19: 21-41.
- Collins, M.D., Farrow, J.A.E., Phillips, B.A., Feresu, S. & Jones, D. (1987).** Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola* and some Catalase- Negative, asporogenous, rodshaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium*. International Journal of Systematic Bacteriology 37: 310-316.
- Danguy, A., Kiss, R., De Launoit, Y. & Lenglet, G. (1988).** Cell proliferation in Digestive Mucosa of fishes as revealed by Autoradiography with Tritiated Thymidin. Zeitschrift für Mikroskopisch- Anatomische Forschung Leipzig 102: 489-502.
- Desser, S.S. & Lester, R. (1975).** An ultrastructural study of the enigmatic “rodlet cells” in the white sucker, *Catostomus commersoni* (Lacépède) (Pisces: Catostomidae). Canadian Journal of Zoology 53: 1483-1494.
- Einen, O., Alne, H., Grisdale-Helland, B., Helland, S., Hemre, G.I., Ruyter, B., Refstie, S. & Waagbø, R. (2006).** Ernæringsbiologi hos oppdrettsfisk s 190-224, Havbruksforskning: Fra merd til mat. Norges forskningsråd s 373.

- Fänge, R. & Grove, D. (1978).** Digestion. In: Fish Physiology Vol VIII, Hoar, W.S, Randall, D.J & Brett. J.R. (Eds). Academic Press, New York, s 162- 260.
- Florey, H.W. (1962).** The secretion and function of intestinal mucus. *Gastroenterology* 43: 326-329.
- Forsøksdyreutvalget (2006).** Forsøksdyreutvalget sin årsrapport 2006.
<http://www.mattilsynet.no/fdu/om/arsrapporter/article48269.ece>
- Gatan sin hjemmeside.** TEM mikroskopets kamera.
http://www.gatan.com/imaging/600_w.php
- Graham, L.E & Wilcox L.W. (2000).** Algae, Prentice Hall, Kap 7. Prentice Hall, Upper Saddle River. 640s.
- Gram, L. & Ringø, E. (2005).** Prospects of fish probiotics. In *Microbial Ecology in Growing Animals*, Holzappel, W.H & Naughton, P.J (Eds.). Elsevier, Edinburgh s 379- 418.
- Griez, L. & Ollevier, F. (1995).** Comparative Serology of the Marine Fish Pathogen *Vibrio anguillarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 4367-4373.
- Hale, P.A. (1965).** The morphology and histology of the digestive system of two freshwater teleosts, *Poecilia reticulata* and *Gasterosteus aculeatus*. *Journal of Zoology* 146: 132- 149
- Hellberg, H.(2006).** Helsesituasjonen hos marin fisk. Havbruksrapporten 2006: Kyst og havbruk 137-141.
- Hellberg, H. & Colquhoun, D. (2005).** Helsesituasjonen hos marin fiske 2005. I Helsesituasjonen hos oppdrettsfisk 2005, Vetrinærinstituttet. s 13- 19.
- Holt, J.H., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. & Williams, S.T. (1994).** *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Williams & Wilkins.
- Irianto, A. & Austin, B. (2003).** Use of probiotic cells to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 25: 333-342.
- Jeol sine hjemmesider.** SEM mikroskop <http://www.jeol.com/Default.aspx?tabid=116>
- Jeol sine hjemmesider.** TEM mikroskop <http://www.jeoleuro.com/instr/tem/tem120.htm>
- Johansen, R. (2004).** Helsesituasjonen hos marin oppdrettsfisk. Havbruksrapport 2004: Fisken og havet: 79-88.
- Jones, M., Cockerill, D.J., Birkbeck, T.H. & Cox, D.I. (2000).** Clinical Infection of Cod (*Gadus morhua* L.) in Scotland by *Vibrio anguillarum* – A Case History. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologist* 20: 125- 129.
- Karlsen, Ø. (2004).** Oppdret av torsk. Havbruksrapporten 2004: Fisken og havet: 52-54.
- Karlsen, Ø & Adoff G.R (2003).** Oppdrett av torsk. Havbruksrapporten 2003 Kap.2: 28-30
- Kita- Tsukamotoa, K., Oyaizu, H., Nanba, K. & Simidu, U. (1993).** Phylogenetic Relationship of Marin Bacteria, Mainly Members of the Family *Vibrionaceae*. Determined on the basis of 16S rRNA sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1: 8-19
- Kjønhaug, A.F., (2006).** Produksjon av torsk 2005. Havbruksrapporten 2006: Kyst og havbruk 134-137.
- Kristoffersen, C., Karlsen, Ø., Hansen, T., Kristiansen, T., Fosseidengen, J.E. & Taranger, G.L. (2006).** Kjønnsmodning i matfisk produksjon av torsk. Havbruksrapporten 2006: Kyst og havbruk 141-144.
- Krogdhal, Å. (2001).** Forøvelsessystemet hos kaldtvannsfisk oppbygging og funksjon s 11-25. Waagbø, R., Espe, M., Hamre, K., & Lie, Ø. (red.) *Fiskeernæring*. Kystnærings Forlag og Bokklubb AS, Bergen, 415 s.
- Kryvi, H. (1992).** Generell anatomi s 8-40. I *Fiskens Fysiologi*, Døving, K. & Reimers, E. (red.), John Grieg forlag, Stavanger 420 s.
- Kryvi, H. & Totland, G.K. (1997).** *Fiskeanatomi*, Høyskoleforlaget, Kristiansand. 332s.

- Kvenseth, P.G. & Bothen, J. (2002).** Torsken kommer nå! Havbruksrapporten 2002: Fisken og havet 58- 59.
- Larsen, J.L. (1984).** *Vibrio anguillarum*: Influence of temperature, pH, NaCl concentration and incubation time on growth. *Journal of Applied Bacteriology* 57: 237-246.
- Larsen, J.L. & Pedersen, K. (1999).** Infeksjoner med *Vibrio*-bakterier s 68-84 i Poppe, T. (red): Fiskehelse og fiske sykdommer. Universitetsforlaget, Oslo. 411s
- Leino, R.L. (1974).** Ultrastructure of immature, developing and secretory rodlet cells in fish. *Cell and Tissue Research* 155: 367-387.
- Lillehaug, A. & Skrudland, A. (2006).** Nye sykdommer – Fra fenomen til problem s 148 - 163 i Havbruksforskning: Fra merd til mat. Norges forskningsråd 373s.
- Lilly, D.M. & Stillwel, R.H. (1965).** Probiotics: Growth- promoting factors produced by microorganisms. *Science* 147: 747-748.
- Lunder, T., Sørum, H., Holstad, G., Steigerwalt, A.G., Mowinckel, P. & Brenner, D.J. (2000).** Phenotypic and genotypic characterization of *Vibrio viscosus* sp. nov. and *Vibrio wodanis* sp. nov isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*) with 'winter ulcer'. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology* 50: 427-450.
- Lødemel, J.B., Mayhew, T.M., Myklebust, R., Olsen, R.E., Espelid, S. & Ringø, E. (2001).** Effect of three dietary oils on disease susceptibility in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) during cohabitant challenge with *Aeromonas salmonicida* ssp. *Salmonicida*. *Aquaculture Research* 32: 935- 945.
- Løvmo, L. (2007).** In vitro eksponering av torsketarm. Histologiske forandringer som følge av eksponering av *Carnobacterium divergens* og *Vibrio anguillarum*. Bio -3604 Prosjektoppgave. Norges Fiskerihøgskole, Universitetet i Tromsø.
- MacDonell, M.T. & Colwell R.R. (1985).** Phylogen of the Vibrionaceae and recommendation for two new genera *Listonella* and *Shewanella*. *Systematic and Applied Microbiology* 6: 171-182.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. & Parker, J. (2000).** Brock Biology of Microorganisms Prentice Hall, Upper Saddle River N.J., 142 -146: 312-314.
- Mayhew, T. (1990).** Striated brush border of intestinal absorptive epithelial cells: stereological studies on microvillous morphology in different adaptive states. *Journal of Electron Microscopy Technique* 16: 45-55.
- McDowell, E.M. & Trump, B.F. (1976).** Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 100: 405- 414.
- Mo, T.A, Stensrud, E, Nilsen, F., Berland, B., Appelby, C., Heuch, P.A. & Schram T.A.(1999).** Parasittsykdommer s 182- 228 i Poppe, T. (red): Fiskehelse og fiske sykdommer. Univeritetsforlaget, Oslo. 411 s.
- Moen, R.E. & Svensen, E. (2000).** Dyreliv i havet, Håndbok i norsk marin fauna. Kom Forlag, Kristiansund 576s.
- Morrison, C.M. (1987).** Histology of the Atlantic cod, *Gadus morhua*; an Atlas. Part one: Digestive tract and associated organs. Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences 219.
- Morrison, C.M. & Odense, P.H. (1987).** Distribution and morphology of the rodlet cell in fish. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 35: 101-116.
- Mortensen, A. & Fjalestad, K. (2004).** Avlsarbeid skal sikre lønnsomhet i torskeoppdrett. Havbruksrapporten 2004: Fisken og havet: 55-57.

- Musser, R.L., Thomas, S.A., Wise, R.R. & Peeler T.C. (1984).** Chloroplast ultrastructure, Chlorophyll fluorescence, and pigment composition in chilling- stressed soybeans. *Journal of Plant Physiology* 74: 749-754.
- National Center for Biotechnology Information.** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Nikoskelainene, S., Ouwehand, A., Salmonene, S. & Bylund, G. (2001).** Protection of rainbow trout (*Ocorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rahmnosus*. *Aquaculture* 198: 229- 236.
- Nishiguchi, M.K. & Nair, V.S. (2003).** Evolution of symbiosis in the *Vibrionaceae*: a combined approach using molecules and physiology. *International Journal of Systematic an Evolutionary Microbiology* 53: 2019-2026.
- Odense, P.H. & Bishop, C.M. (1966).**The ultrastucture of the Epitelial Border of the Ileum, Pyloric Caeca, and Rectum of the Cod, *Gadus morhua*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 23: 1841-1843.
- Olsen, R.E. & Ringø, E. (1997).** Lipid digestibility in fish: A review. *Recent Res Devel in Lipid Res* 1: 199-265.
- Olsen, R.E., Dragnes, B.T., Myklebust, R. & Ringø, R. (2003).** Effect of soybeanoil and soybean lecithin on intestinal lipid composition and lipid droplet accumulation of reinbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. *Fish Physiology and Biochemistry* 29; 181-192.
- Olsson, C., Jöborn, A., Westerdahl, A., Blomberg, L., Kjellberg, S. & Conway, P.L. (1996).** Is the turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), Intestine a port of entry for the fish pathogen *Vibrio anguillarum*? *Journal of Fish Diseases* 19: 225-234.
- O' Toole, R., Von Hofsten, J., Rosqvist, R., Olsson, P.E. & Wolf- Watz, H. (2004).** Visualisation of zebrafish infection by GFP-labelled *Vibrio Anguillarum*. *Microbial Pathogenesis* 37: 41-46.
- Ouwehand, A.C., Salminen, S. & Isolauri, E. (2002).** Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leewenhoek* 82: 279- 289.
- Pedersen, K., Grisez, L., van Houdt, R., Tiainen, T., Ollevier, F. & Larsen, J.L. (1999).** Extended Serotyping Scheme for *Vibrio anguillarum* with the Definition and characterization of Seven Provisional O-Serogroups. *Current Microbiology* 38 :183-189.
- Pethon, P. (1998).** *Aschehougs store fiskebok*, Aschehoug, Oslo, 447s.
- Plehn, M. (1911).** Die furunkulose der salmonidien *Central Bakteriol Parasit Infect. Hyg.* Abt. 1 Org 60: 609- 624.
- Poynton, S.L. & Morrison, C.M. (1990).** Morphology of diplomonad flagellates: *Spironucleus torsa* N.Sp.from Atlantic cod *Gadus morhua* L., and haddock *Melanogrammus aeglefinus* (L.) and *Hexamita salmonis* Moore from brook trout *Salvelinus fontinalis* (Mitchill). *The Journal of Protozoology* 35: 369-383
- Poynton, S.L., Saghari Fard M.R., Jenkins, J. & Ferguson, H.W. (2004).** Ultrastructure of *Spironucleus salmonis* n.comb. (formerly *Octomitus salmonis* sensu Moore 1922, Davis 1926, and *Hexamita salmonis* sensu Ferguson 1979), with a guide to *Spironucleus* species. *Diseases of Aquatic Organisms* 60: 49-64.
- Qurum Technologies Tecgnical Brief.** Critical Point Drying, <http://www.quorumtech.com>
- Raven P.H. & Johnson, R. (2002).** *Biology*, McGraw Hill, Boston. 1238s.
- Reite, O.B. (2005).** The rodlet cells of teleostean fish: their potential role in host defence in relation to the role of mast cells/ eosinophilic granule cells. *Fish & Shellfish Immunology* 19, 253-267.
- Ringø, E. (1993).** The effect of chromic oxide (Cr₂O₃) on aerobic bacterial populations associated with the intestinal epithelial mucosa of Artic charr, *Salvelinus alpinus* (L.) *Canadian Journal of Microbiology* 39: 1169-1173.

- Ringø, E. & Gatesoupe, F.J. (1998).** Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture* 160: 177-203.
- Ringø, E. & Birkbeck, T.H. (1999).** Intestinal microflora of fish larvae and fry. *Aquaculture Research* 30: 73-93.
- Ringø, E., Strøm, E. & Tabachek, J.-A. (1995).** Intestinal microflora of salmonids: a review. *Aquaculture Research* 26: 773-789.
- Ringø, E., Bendiksen, H.R., Gausen, S.J., Sundsfjord, A. & Olsen, R.E. (1998).** The effect of dietary fatty acids on lactic acid bacterial associated with the epithelial mucosa and from faecalia of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *Journal of Applied Microbiology* 85: 855-864.
- Ringø, E., Seppola, M., Berg, A., Olsen R.E., Schillinger, U. & Holzapfel, W. (2002).** Characterization of *Carnobacterium divergens* strain 6251 Isolated from Intestine of Arctic Charr (*Salvelinus alpinus* L.) *Systematic and Applied Microbiology* 25: 120-129.
- Ringø, E., Olsen, R.E., Mayhew, T.M. & Myklebust, R. (2003).** Electron microscopy of the intestinal microflora of fish. *Aquaculture* 227: 395-415.
- Ringø, E., Jutfelt, F., Kanapathippillai, P., Bakken, Y., Sundell, K., Glette, J., Mayhew, T.M., Myklebust, R. & Olsen R.E. (2004).** Damaging effect of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* spp *salmonicida* on intestinal enterocytes of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Cell & Tissue Research* 318: 305-311.
- Ringø, E., Sperstad, S., Myklebust, R., Refstie, S. & Krogdahl, Å. (2006).** Characterisation of the microbiota associated with intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) The effect of fish meal, standard soybean meal and a bioprocessed soybean meal. *Aquaculture* 261: 829-841.
- Ringø, E., Myklebust, R., Mayhew, T.M. & Olsen, R.E. (2007a).** Bacterial translocation and pathogenesis in the digestive tract of larvae and fry. *Aquaculture* 268: 251-264.
- Ringø, E., Salinas, I., Olsen, R.E., Nyhaug, A., Myklebust, R. & Mayhew, T.M. (2007b).** Histological changes in intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following in vitro exposure to pathogenic and probiotic bacterial strains. *Cell & Tissue Research* 328: 109-116.
- Salinas, I., Myklebust, R., Esteban, M.A., Olsen, R.E., Meseguer, J. & Ringø, E. (2007).** *In vitro* studies of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) foregut: tissue responses and evidence of protection against *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* epithelial damage. *Veterinary Microbiology* in press.
- Schrøder, M.B., Villena, A.J. & Jørgensen, T.Ø. (1998).** Ontogeny of lymphoid organs and immunoglobulin producing cells in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Developmental & Comparative Immunology* 22: 507- 517.
- Schrøder, M.B., Mikkelsen, H., Børdal, S., Gravningen, K. & Lund, V. (2006).** Early vaccination and protection of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) juveniles against classical vibriosis. *Aquaculture* 254: 46-53.
- Seppola, M., Olsen, R.E., Sandaker, E., Kanapatippillai, P., Holzapfel, W. & Ringø, E. (2006).** Random amplification of polymeric DNA (RAPD) typing of *Carnobacteria* isolated from hindgut chamber and large intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) *Systematic and Applied Microbiology* 29: 131-137.
- Smith, S.A., Caceci, T., Marei, H.E-S. & El-Haback, H.A. (1995).** Observation on rodlet cells found in the vascular system and extravascular space of angelfish (*Pterophyllum scalare scalare*). *Journal of Fish Biology* 46: 241-251.
- Solem, S.T & Stensvik, J. (2006).** Antibody repertoire development in teleosts- a review with emphasis on salmonids and *Gadus morhua* L. *Developmental & Comparative Immunology* 30: 57-76

- Suyehiro, Y.A. (1942).** A study on the digestive system and feeding habits of fish. Japan Journal of Zoology 10: 1-303
- Sørensen, U.B.S. & Larsen, J.L. (1986).** Serotyping of *Vibrio anguillarum*. Applied and Environmental Microbiology 51: 593- 597.
- Thélohan, P. (1892).** Sur des Sporozoaires indéterminés parasites des Poissons. Journal de l'Anatomie et de la Physiologie 28: 163-171
- Thesen, J. (1890).** Bidrag til tarmkanalens histology og physiologi hos torsken (*Gadus Morhua*). Archiv for Matematik og Naturvidenskab, Vol. XIV: 220-231
- Thorarinsson, R. & Lystad, Y. (2003).** Vintersår, Ny kunnskapskaper optimismisme. Norsk Fiskeoppdrett Nr. 10/ 2003.
- Wawak, B.E. & Campbell, W.L. (1986).** Characterization of clay fabric using critical point drying to preserve clay texture and morphology. Scanning Electron Microscopy IV: 1323-1329.
- Westerdahl A., Olsson, J.C., Kjellberg, S. & Conway, P.L. (1991).** Isolation and characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*)- associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. Applied and Environmental Microbiology 57; 2223-2228.
- Zivkovic, R. (1999).** Probiotics or microbes against microbes. Acta Medica Croatica 53: 23-28.

7. Appendiks

7.1. Reagenser brukt i forsøket

Tabell 7.1 Reagens brukt i forsøkene

Reagenser	Konsentrasjon	Produsent
Bacto Agar	-----	Agar Noble
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing	-----	Applied Biosystems
Blod	-----	Blodbanken, UNN
Blyløsning Pb, Reinolds	Ca 2,5 %	Merck
Buffer F511	10x buffer	Finnzgmcs
EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)	100mM	Sigma
Edikksyre	100 %	Merck
EtOH	70 % og 100 %	Arcus
Etidium bromid	0,5 ul /ml	Sigma
Gel Loadingbuffer	-----	ABgene
Glukose	-----	Merck
Glycerol	87 %	Acros
Guanindium thiocyanat	5 M	Sigma
Marine – Broth (MB)	-----	Difco
Montex	-----	Histolab
Multiagarose	-----	ABgene
NaOH	3 M	Merc, Tyskland
Natriumklorid (NaCl)	MW = 58,44 g/mol	Merck, Tyskland
Nukleotid dNTP	10mM	Promega
Phenol: chloroform:isoamyl alcohol 25:24:1	-----	Sigma
Uranyl	2 %	Merck
Sarcosyl	0,5 %	Sigma
Taq DNA F501L	-----	Finnzgmcs
Toludin med Borax	2 %	Merck
Triz-buffer	-----	Bio-Rad Laboratories
Tryptic soy Agar	-----	Difco, USA
Tryptic soy broth	-----	Difco, USA
Trypton Soy broth	-----	Difco, USA

7.2. Primere

Tabell 7.2 Primere brukt i forsøkene.

Primer	Produsent	Sekvens
27F	Operon Biotechnologies	5' - AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'
1492R	Operon Biotechnologies	5' - GGTTACCTTGTTACGACTT- 3'

7.3. Utstyr

Tabell 7.3 Utstyr brukt i forsøkene.

Utstyr	Produsent
Elektroforesekar, Liberty 2 Systems	Biokey American Instrumen, USA
E.Z.N.A Cycle – pure Kit	Omega
Filter (0,22um)	Millipore
Filterpapir, 125 mm.	Whatman®
Gene Genius Bio Imaging system	Syngene
Inkubatoren, Termaks	Heigar Laboratori utstyr
Kapilær-sekvensator	Applied Biosystems
Kobber gridd	Agar scients
Lysmikroskop	Leica DMLB
Leica DC kamera	Leica
Mono-Va	Bionor, deo20
MultiScan 600CW	Gatan
Nano- drop	Saveen Werner, Sverige
Ristemaskin	IKA® Vibrax VXR Basic
Scanning mikroskop, FESEM 7400	Jeoleuro
Sentrifuge	Centrifuge 5417R Eppendorf
Stomacer	Seeward Laboratory, U.K
Transmisjons mikroskop, JEM 1230	Jeoleuro
Ultramikrotom Leica EM UC 6	Leica
Vortex	VWR internasjonal, Tyskland

7.4. Løsninger

Løsninger til dyrking av bakterier

Marin Broth (MB): vekstmedium. Sammensetningen av mediet for 1000 ml var følgende:

37,5 gram Marine Broth

1000 ml. destillert H₂O

Mediet ble kokt i ca. 2 minutter under omrøring med magnet, og deretter avkjølt før filtrering med wathman papirfilter.

Tryptic soya (TSBgs); vekstmedium med følgende sammensetning for 1000 ml. løsning:

30 gram Tryptic Soy Broth

2,5 gram Glukose

5 gram NaCl

1000 ml. destillert H₂O

Begge de oven fornevnte mediene ble autoklaveret ved 120 °C

Agar- plater til dyrking av bakterier.

Tryptic soya agar tilsatt glukose og NaCl (TSAGs) agar- plater;

40gram Tryptic Soya Agar

5 gram Glukose

5 gram NaCl

1000 ml. destillert vann

Agaren løses i vann og settes så under omrøring med varme for å løse opp de ulike ingrediensene. Mediet autoklaveres ved 120 °C, og avkjøles til ca. 50 °C under omrøring for å få en homogen blanding som helles i sterile petriskåler.

Blodagarskåler tilsatt NaCl;

28 gram Trypton Soya Broth

10,5 gram NaCl

1 strøken ts Bacto agar

700 ml. destillert vann

35 ml. fullblod, evt. 21 ml. 3 % blodlegmer.

Alle ingrediensene utenom blodet ble tilsatt i en kolbe med magnet-rører. Etter autoklaving ble løsningen avkjølt i en time under omrøring, før sterilt fullblod ble tilsatt.

Blodagarløsningen ble tilsatt sterile petriskåler der en benyttet en Intregra bioscience maskin med en innebygd UV- lampe (Tecnomara AG, Sveits). Skålene ble avkjølt ved romtemperatur til neste dag, før de ble satt inn i kjølerom ved 4 °C. Maksimum lagringstid for dette mediet er 2-3 måneder.

Fysiologisk saltvann 0,9 % NaCl:

For 1000 ml. løsning

9 gram NaCl

1000 ml. destillert vann

Deretter autoklaveres saltløsningen ved 120 °C

Oppbevaring av bakterier ved -80 °C i biofryser:

En milliliter løsning inneholder; 200 µl glyserol og 800 µl bakteriekultur. Glyserolen ble på forhånd autoklavert. Før en tilsatte glycerol ble den varmet opp under omrøring slik at den skulle være tyntflytende. Glyserolen ble så tilsatt i 2 ml. sterile cryorør, sammen med bakteriene og lagret i biofryser ved -80 °C.

7.5. Protokoller for DNA- isolering, PCR- kjøring og sekvensering.

DNA- isolering

1,5 ml av bakteriekulturen ble spunnet ned i 2-3 min ved 13200 rpm. Supernatanten ble fjernet og pelleten løst i 50 µl GES (Guanidium thiocyanat, EDTA, og Sarcosyl). Løsningen ble tilsatt 400 µl destillert vann. Videre ble det tilsatt likt volum phenol:chloroform:isoamyl 24:24:1, ristes godt. Innkubert ved romtemperatur i 1-2 min, sentrifuger prøvene i 2-3 min ved 13200 rpm. 200 µl av vannfasen ble overført til et nytt eppendorfrør. Tilsatte deretter 20 µl 3M NaOAc pH 5.3 og 400 µl 100 % EtOH. Vendte røret noen ganger og lot det stå på is i 30 min. Spinn ned prøven i 20 min ved 13200 rpm, fjernet supernatanten og pelleten vasket med 120 µl 70 % EtOH. Ble videre spunnet ned i 5 min, fjernet supernatanten og lot pelleten lufttørke.

PCR- kjøring

Master mix til PCR- kjøringen i denne oppgaven:

Milli Q vann 79 µl, 10x buffer 10 µl, dNTP 1 µl, 27F 0,5 µl 1492R 0,5 µl TaqDNA 0,2 µl og templat 8 µl (DNA 30- 50 ng).

Standard programmet på PCR- maskinen i denne oppgaven:

94 °C →10:00	
94 °C →00:30	30 sykluser
53 °C →00:30	
72 °C →01:30	
72 °C →07:00	
04 °C →Oppebevaring ∞	

For å verifisere at PCR- reaksjonen gav produkt at forventet størrelse ble de kjørt i en agarose- gel. 0,5 g agarose og 50 ml TAE- buffer, ble kokt opp. Nedkjølt til ca 50 °C, tilsatte 3 µl etidium bromid, og blandingen ble helt over i et elektroforese- kar, og plassert i avtrekkskap. Etter at gelen var stivnet ble det tilsatt TAE- buffer i katode og anode siden, mens det i midten ble tilsatt destillert vann. En ladder (størrelsesstandard) og prøvene ble tilsatt i her sin brønn. Karet ble så koblet opp mot en strømkilde, 150V, i 12 minutter. Gelen ble fotografert i UV-lys (Gene Genius Bio Imaging system) og positive prøver viste seg som lyse, fluoriserende bånd, med estimert sekvenslengde på ca. 1500 basepar.

Saltfelling

35 µl PCR-produkt

70 µl 95 % EtOH

3,5 µl 3M NaOAc (pH 5,2)

Blandingen ble kjørt raskt i vortex, spunnet i sentrifuge og innkubert på is i 30 min. Deretter ble rørene sentrifugert i 20 min ved 13.200 rpm. Supernatanten ble fjernet, pellet vasket med 100 µl 70 % EtOH og deretter sentrifugert på ny i 5 min ved 13.200 rpm. Supernatanten ble fjernet enda en gang og pelleten ble tørket ved romtemperatur til all væsken har fordampet. Pelleten ble løst i 30 µl autoklavert MilliQ- vann.

Noen av prøvene ble kjørt rensing på ved hjelp av E.Z.N.A. Cycle – pure Kit i stede for saltfelling.

Sekvensering.

DNA- måling med NanoDrop ble utført på de positive PCR- prøvene. Prøvene ble fortynnet ned til en konsentrasjon på 5 ng/μl. Det ble tilsatt milliQ vann og prøve til 10 μl, så ble det tilsatt 6,5 μl sekvenseringsbuffer, 1,5 μl sekvenseringsmix 3.1 og 2 μl 27F primer (10 ng/μl).

Programmet for reaksjonen var:

94 °C →02:00
94 °C →00:10
53 °C →00:10
60 °C →00:10
04 °C →Oppebevaring ∞

35 sykluser

Prøvene ble deretter saltfelt på samme måte som etter PCR reaksjon, men etter lufttørring ble rørene tilsatt 20μl formamid og sekvensene ble bestemt i en kapilær- sekvensator (ABI Prism 3100 Genetic Analyser, Applied Biosystems, Japan)

7.6. Protokoller til mikroskopidelen.

1X TAE- Buffer

242 g Triz-buffer
57 ml eddiksyre
100 ml 0,5 EDTA
10 liter destillert vann

McDowell's fiks 1000ml:

NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	13,4 gram
NaOH	2,7 gram
Sucrose	37,0 gram
Destillert	400 ml

Dette løses opp og tilsettes:

Paraformald	40 gram
Destillert H ₂ O	200 ml

Løsningen varmes opp til 60 °C og løses ved hjelp av lutperler (NaOH). Avkjøles, filtreres, og tilsettes bufferen, og 40 ml 25 % glutaraldehyd, og blandes godt. Volumet ble justert til 1000 ml med destillert H₂O, og deretter juster til pH 7,2- 7,3 ved hjelp av 1M NaOH eller 1M HCl. Løsningen ble deretter nedfrosset ved -21 °C og har nå lang holdbarhet. Etter at løsningen er tint igjen har det en holdbarhet på 6 mnd.

Protokoll for innstøpningsprosedyren til TEM.

Fiksering min. 4 timer på McDowells fiks.

2x 15 min. i buffer Sørensen's fosfatbuffer
1 % OsO₄ i milliQ- vann 1,5 time
2x 15 min. vask i Sørensen's forfatbuffer
2x skylning i milliQ- vann, raske skift.
2 % uranylacetat i vann i 1,5 time

Dehydrering:

- 30 % etanol i 5 minutter
- 60 % etanol i 10 minutter
(70 % etanol hvis man må stanse prosessen)
- 90 % etanol i 10 minutter
- 96 % etanol i 10 minutter
- 2x abs. alkohol à 10 minutter
- 3x propylenoxid à 5 minutter

Plast: Propylenoxid 1:1, 1 time uten lokk. Ren plast over natta i matter. Polymerisering Epon/Araldit 60 °C over natt.

Framføring av prøve til SEM

Prøvene må være fiksert i McDowells fiks i minst fire timer.

3x 15 min vask i Sørensens fosfatbuffer.

1 % OsO₄ i en time.

2x 15 min vask i Sørensen fosfatbuffer.

Dehydrering

5 min. 30 % alkohol

5-10 min. 50 % alkohol

10 min. 70 % alkohol (Kan oppbevares i dette lenge)

10 min. 96 % alkohol

3x 10 min. abs. alkohol.