



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(51) Int Cl⁷

(11) 320429

A 61 K 35/80, 31/716

(13) B1

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20032494	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	
(22)	Inng.dag	2003.06.03	(85)	Videreføringsdag	
(24)	Løpedag	2003.06.03	(30)	Prioritet	Ingen
(41)	Alm.tilgj	2004.12.06			
(45)	Meddelt	2005.12.05			
(73)	Innehaver	Sinvent AS , S. P. Andersensvei 5, 7465 TRONDHEIM, NO			
(72)	Oppfinner	Jorunn Skjerme, Skyåsvegen 36, 7045 Trondheim, NO			
		Trond Røvik Størseth, Paul Fjermstads veg 73, 7052 Trondheim, NO			
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS , Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, NO			

(54)	Benevnelse	Farmasøytisk blanding for forøkning av motstanden mot sykdommer forårsaket av patogene mikroorganismer og anvendelse av gluknan for fremstilling av en farmasøytisk blanding.
(56)	Anførte publikasjoner	Dalmo R. Et al.: "The immunomodulatory effect of laminaran [B(1,3)-D-glucan] on Atlantic salmon..", Journal of Fish Diseases (1996), 19 (6), 449-457 NO 300692 Raa J.: "The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds", Avances en Nutrición Acuicola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola, 19-22 Noviembre, 2000. Yucatán, Mexico Dalmo R.: "Immunostimulatory B(1,3)-D-glucans;prophylactic drugs against...".Proceedings of the Phytochemical Society of Erope (2000), 44 (Bioactive Carbohydrate Polymers), 95-106 Granum E.: "Metabolism and function of b-1,3-glucan in marine diatoms", doktoravhandling, NTNU, 2002

(57) Sammendrag
Sammendrag

Anvendelse av et gluknan for å forøke den totale motstanden mot sykdommer forårsaket av patogene mikroorganismer, hvori gluknanet er fra diatomeer, og en sammensetning som omfatter et gluknan fra diatomeer.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en farmasøytisk blanding som har profylaktiske effekter for forøkning av den totale motstanden mot sykdommer forårsaket av patogene og opportunistisk patogene mikroorganismer, og anvendelse av glukose for fremstilling av en farmasøytisk blanding for forøkning av den totale motstanden mot sykdommer forårsaket av patogene mikroorganismer.

Bakgrunn

Immunomodulatoriske forbindelser er attraktive for profylaktisk behandling av oppdrettsfisk og dyr, for å øke den totale motstanden mot sykdommer forårsaket av patogene mikroorganismer. Immunostimulanter aktiverer det uspesifikke immunsystemet ved binding til makrofager. Positive effekter fra administrering av uspesifikke immunostimulanter til dyr gjennom fôr eller vann er forøket vekst, overlevelse og motstand mot sykdom. De uspesifikke immunostimulantene kan også bli administrert til dyr ved injeksjoner, som komponenter av vaksiner.

På grunn av at modulatoriske forbindelser stimulerer det uspesifikke immunsystemet til dyr kan uspesifikk immunostimulering bli anvendt på tidlige yngelstadier, før det spesifikke immunsystemet modnes og dyret kan bli vaksinert med riktige vaksiner. Dette kan være meget verdifullt som et alternativ til antibiotika i intensiv yngelproduksjon, spesielt i aquakultur og kyllingproduksjon, hvor antibiotika jevnlig blir anvendt profylaktisk for forøkning av vekt og for reduserte sykdomsutbrudd.

I fiskeoppdrett er endringen fra levende mat til formulert mat et kritisk stadium ved startfôring. Den formulerte dietten kan ha høy kvalitet både når det gjelder næringsmessig verdi, fordøybarhet og fysiske egenskaper. Derimot fører innføring av matpartikler inn i fisketanken og larvetarmen tilfører substrat for bakteriell vekst. Tilførsel av substrat for bakteriell vekst favoriserer også veksten av hurtigvoksende, opportunistiske bakterier, som kan være skadelige for larvene. Larvene kan derfor lett bli kraftig kolonisert og infisert med bakterier. Høye dødelighetsrater blir derfor ofte observert under tilvenningsfaser. Fremgangsmåter for å øke motstanden til larvene mot bakterielle infeksjoner ved uspesifikk immunostimulering kan følgelig være meget attraktivt.

Beta-glukaner er viktige struktur-polysakkarider fra forskjellige gjærorganismer og alger, og beta-glukaner med 1-3 bindinger og sidekjeder koblet til hovedkjeden i 1-6 posisjonen er det kommentert in vitro og in vivo å ha immunomodulatoriske effekter på fisk og dyr. Macrogard®, se EP 0466037, er et kommersielt tilgjengelig beta-glukan, fremstilt fra bakegjær, *Saccharomyces cerevisiae*. Det blir anvendt som et spesial ingrediens i fiskefôr for laksefisk og for marine fiskearter og skaldyr. Glukan i brunalger blir angitt som laminaran, og er et beta-1,6-grenet beta-1,3-D-glukan. Laminaran fra makroalgen *Laminaria hyperborea* er dokumentert å ha immunomodulatorisk effekt og forøker sykdomsmotstanden til fiskearter som atlantisk laks (Dalmo, R. A. og Seljelid, R. 1995, The immunomodulatory effect of LPS, laminarian and sulfated laminarian [$\beta(1,3)$ -D-glucan] on Atlantic salmon, *Salmo salar* L., macrophages in vitro. *Journal of Fish Disease* 18, 175-185). and blue gourami (Samuel, M., Lam, T. J. and Sin, Y. M. 1996. Effect of Laminarian [$\beta(1,3)$ -D-Glucan] on the protective immunity of blue gourami, *Trichogaster trichopterus* against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology* 6, 443-454). Laminaran blir derimot ekstrahert fra alger som blir høstet fra sjøen. På grunn av at strukturen til polysakkarider i alger i både mikro- og makroalger som vokser i sjøen forandrer seg grunnet sesongmessige endringer i vekstbetingelser (lys, temperatur, tilgjengelighet av næringsstoffer, saltinnhold, strøm) kan den immunomodulatoriske effekten til glukanene muligens variere mellom batcher som blir høstet ved forskjellige tidspunkter i løpet av året, samt mellom batcher fra forskjellige geografiske lokaliteter. Dette er, i tillegg til den utarmede høstingen av alger fra sjøen en meget stor ulempe. Høsting av alger kan også forstyrre den lokale biologiske balansen på stedet for høsting.

Raa J.: "The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds", *Avances en Nutrición Acuicola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, Mexico, beskriver immunostimulanter anvendt i akvakultur og β -1,3/1,6-glukaner er beskrevet som de mest lovende. Disse har en veldefinert kjemisk struktur og mekanisme, og er dokumentert å aktivere det uspesifikke immunsystemet.

Dalmo R. et al.: "The immunomodulatory effect of laminaran [$\beta(1,3)$ -D-glucan] on atlantic salmon ...", Journal of Fish Diseases (1996), 19 (6), 449-457, beskriver $\beta(1,3/1,6)$ -glukanlaminaran fra grønnalge som immunostimulant.

- 5 Granum E.: "Metabolism and function of $\beta(1,3)$ -glucan in marine diatoms", doktoravhandling, NTNU, 2002, beskriver innholdet av $\beta(1,3/1,6)$ -glukan i diatomeer. Det beskrives videre hvordan dyrkningsbetingelsene påvirker syntesen av forbindelsen.
- 10 Det blir derimot ikke nevnt mikroalger som en kilde for immunostimulatoriske forbindelser eller anvendelse av mikroalger for immunostimulering.

Hensikt

- Hovedhensikten med oppfinnelsen er å tilveiebringe en farmasøytisk blanding med immunostimulerende effekter, for å redusere profylaktisk og terapeutisk
15 anvendelse av antibiotika, spesielt i aquakultur og kyllingproduksjon, og for vekst forøkning og redusert utbrudd av sykdom.

Oppfinnelsen

- 20 Hensikten med oppfinnelsen blir oppnådd med en farmasøytisk blanding som har profylaktiske effekter for forøkning av den totale motstanden mot sykdommer forårsaket av patogene og opportunistisk patogene mikroorganismer, kjennetegnet ved at den omfatter glukane fra diatomeer, fortrinnsvis marine diatomeer, hvori glukane er et $\beta(1,3)$ -glukan med 1-6 forgrening. Foreliggende oppfinnelse
25 vedrører videre anvendelse av et glukane for fremstilling av en farmasøytisk blanding for forøkning av den totale motstanden mot sykdommer forårsaket av patogene mikroorganismer, hvori glukane er fra diatomeer, fortrinnsvis marine diatomeer, hvori glukane er et $\beta(1,3)$ -glukan med 1-6 forgrening. Ytterligere fordelaktige trekk er angitt i tilsvarende uavhengige krav. $\beta(1,3)$ -glukaner er
30 viktige lagringspolysakkarider i mange klasser av mikroalger (Myklestad 1974). Disse glukane blir angitt som krysolaminaran, og er relativt kortkjededede (DP 20-60). Spesielt er diatomeer (Bacillariophyceae sp.) kjent for å akkumulere store mengder av β -glukaner i løpet av den stasjonære vekstfasen. Det er ikke

tidligere blitt dokumentert at krysolaminaran har immunomodulerende egenskaper. Intensivt dyrkede torsk (Gadus morhua L.) larver er sårbare for stress og utbrudd av sykdom og spesielt Vibriosis kan drepe store antall av larver og yngel. Det ble derfor valgt å teste om krysolaminaran ville ha positive effekter ved startfôring og tilvenning av torskelarver. Mikroalger kan bli dyrket industrielt i fotobioreaktorer, nøyaktig justert for optimal syntese av valgt β -glukan. Dette gjør en industriell produksjon av et β -glukan med nøyaktig kjemisk struktur mulig i løpet av hele året og forsikrer en stabil tilgjengelighet av β -glukan med kjent kvalitet for levering til fôr- og farmasøytisk industri. Anvendelse av krysolaminaran fra dyrkede mikroalger så som diatomeer, er derfor meget fordelaktig sammenlignet med laminaran fra høstede brunalger.

Oppfinnelsen vil nedenfor bli beskrevet med et eksempel.

Eksempel Fôring av torskelarver med krysolaminaran fra en kultur av diatomet *Chaetoceros mülleri*

Krysolaminaran ble ekstrahert fra en kultur av diatome *Chaetoceros mülleri* (dette krysolaminaranet vil fra nå av bli betegnet Glucan CM), innkorporert i fôr til marine fiskelarver og matet til lakselarver. To andre grupper ble fôret med Macrogard® (KS Biotec-Maczymal, Tromsø, Norge) og vanlig fôr. Effekter på larvevekst, overlevelse og tarmkolonisering ble målt, og resultatene er gitt i vedlagte figurer hvor

fig. 1 viser overlevelsen av torskelarver i løpet av eksperimentet,
fig. 2 viser overlevelsen på dag 27, når eksperimentet ble avsluttet,
fig. 3 viser at relativ prosentbeskyttelse ble betydelig forøket ved behandling av larvene med Glucan CM,
fig. 4 viser at veksten av torskelarvene var like for grupper fôret med glukaner frem til dag 20, når den formulerte dietten ble introdusert,
fig. 5 presenterer de spesifikke vekstratene (SGR) for larvene i løpet av 4 perioder av eksperimentet, og
fig. 6 viser at larver behandlet med Glucan CM hadde betydelige lavere antall av bakterier i tarmen.

C. mülleri ble dyrket i 200 liter f/2-medium (Guillard, R. R. L. & Ryther, J. H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. Canadian Journal of Microbiology 8, 229-239), ved 20°C og med kontinuerlig lys på 70-90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Vekstmediet ble sannet fra
5 mikrofiltrert (5 μm) sjøvann pluss tilsatte næringsstoffer, og kulturer luftet med filtrert tilsatt luft <0,1% CO_2 . Når algekulturen var i stasjonær vekstfase (6 dager etter inokulering av medium) ble cellene høstet ved sentrifugering. Cellulært beta-1,3-glukan ble ekstrahert med 0,0005 M H_2SO_4 ved 60°C. Ekstraktet ble filtrert på Whatman GF/C filter, filteret ble vasket med destillert vann og ekstraktet ble
10 dialysert (1000 MWCO) mot Milli-Q vann. Det dialyserte ekstraktet ble konsentrert i en roterende avdamper og frysetørket. Det tørkede ekstraktet ble lagret i beholdere, ved 4°C.

Strukturen til ekstraktet ble karakterisert ved ^1H - og ^{13}C -DEPT-NMR spektroskopi.
15 Ifølge metoden til Kim et al. (Kim, YT; Kim, EH; Cheong, C; Williams, DL; Kim, CW; Lim, ST. Structural characterization of β -D-(1-3,1-6)-linked glucans using NMR spectroscopy, 2000, Carbohydrate Research, 328: 331-341), korresponderer de eksperimentelle resultatene med et beta-1,3-glukan, med en polymeriseringsgrad på 19-24, som tilsvarer en molekylvekt på ~4500-5200, og en grad av 1-6
20 forgrening på 0,005-0,009. ^{13}C -DEPT-NMR bekreftet beta 1-3 strukturen til glukan.

Glukan CM ble innkapslet i alginat mikrokuler som beskrevet av Skjermo, J., Defoort, T., Dehasque, M., Espevik, T., Olsen, Y., Skjåk-Bræk, G., Sorgeloos, P.
25 and Vadstein, O. (1995). Immunostimulering av pigvaryngel (*Scophthalmus maximus* L.) ved anvendelse av et alginat med et høyt mannuronsyre innhold administrert via levende fôr organismen *Artemia*. Fish & Shellfish Immunology 5, 531-534, ved blanding av 1 g glukan og 3 g LF 10/60 alginat (FMC Biopolymer, Drammen, Norway) inn i 360 ml destillert vann og spraying av løsningen gjennom
30 en dyse inn i en vandig løsning av kalsiumklorid (50 mM) og metanol (5%). Mikrokulene ble høstet på en sikt, vasket og lagret i vann inneholdende 0,1% formaldehyd.

Egg fra torsk ble plassert i 70 liters tanker med flat bunn og sentral utførsel. Vanninnførselen var gjennom rør nær tankveggen, perforert for å danne en sirkulær vannstrøm i tanken. Begynnende tetthet var 100 egg per liter. Algepasta fra *Nanocloropsis oculata* (Reed Mariculture) ble tilsatt til tankvannet fra dag 1 etter klekking. Larvene ble matet med rotatorier dyrket med gjær og en marin olje fra dag 2 etter klekking. Fra dag 20 ble larvene tilført formulert, tørrfôr. Eksperimentet ble avsluttet på dag 27 etter klekking.

Glucan CM mikrokulene og Macrogard® ble bioinnkapslet i 10 tatorier (*Brachionus plicatilis*) ved inkubering av rotatorier i 20-30 minutter i tettheter på 250 ind ml^{-1} i sjøvann tilsatt $0,5 \text{ g l}^{-1}$ immunostimulanter. Behandlede rotatorier ble matet til torskelarver som tre måltider per dag på dag 4, 11 og 18 etter klekking. Kontrollgruppen ble matet med rotatorier dyrket med gjær og en marin olje, ved disse måltidene. Eksperimentet ble kjørt med 3 replikater per behandling, i totalt ni tanker. Den første behandlingen med immunostimulanter, på dag 4 etter utklekking, ble valgt på grunn av at det var ventet at larvene trengte noen dager på å begynne å fordøye rotatoriene i optimale rater.

Prøver for bestemmelse av larvevekst ble samlet på dag 1, 6, 13, 20 og 27 etter klekking. Overlevelsen ble bestemt hver andre/tredje dag ved støvsuging av bunnen og opptelling av døde larver. Etter innføring av formulert fôr ble støvsuging utført daglig. Fra 10 dager etter klekking var overlevelsen av torskelarvene høyest i gruppen matet med Glucan CM (se figur 1). Den totale overlevelsen av Glucan CM-gruppen ble øket med henholdsvis 41 og 47% sammenlignet med grupper tilført Macrogard® og kontroll på dag 27 (se figur 2). Dette indikerer en 10 ganger høyere relativ prosent beskyttelse for gruppen matet med Glucan CM sammenlignet med grupper matet med Macrogard® (se figur 3). Varianskoeffisienter (CV) av overlevelseprosentandeler var henholdsvis 14, 51 og 19% for grupper behandlet med Glucan CM, Macrogard® og kontroll. Dette indikerer at reproduserbarheten av overlevelse innenfor behandlingene også ble øket ved fôring av larvene Glucan CM, sammenlignet med Macrogard®. Den dårlige reproduserbarheten for Macrogard® indikerer at denne behandlingen ikke hadde noen positiv eller til og med noen negative effekter på torskelarver i dette

eksperimentet, mens den gode reproduserbarheten mellom kontrolltanker indikerer at det eksperimentelle oppsettet fungerte godt.

Etter en ukes føring med formulert diett hadde både Macrogard® og
5 kontrollgruppene reduserte tørrvekter (se figur 4). Den negative stigningen fra dag 20 til 27 skyldes den forøkte dødeligheten av de største larvene. Gruppen føret med Glucan CM fortsatte også å vokse etter skifte fra rotatorier til formulert diett, og nådde høyere larvevekt enn Macrogard gruppen. De spesifikke vekstratene i perioden med formulert diett (dag 20-27) var videre positive kun for gruppen som
10 var blitt føret Glucan CM i løpet av rotatorier føringsperiodene (se figur 5).

Larver behandlet med Glucan CM hadde betydelige lavere antall bakterier i tarmen (se figur 6). Kontrollarvene og gruppen behandlet med Macrogard® hadde henholdsvis 11000 og 22000 total CFU i tarmene og dette tilsvarer 30 og 156%
15 høyere bakterielt innhold enn i Glucan CM larvene. Glucan CM gruppen hadde også et meget lavt innhold av *Vibrio* bakterier (200 per larve), målt på TCBS agar, sammenlignet med kontrollen og Macrogard® gruppene som inneholdt henholdsvis 7000 og 4600 *Vibrio* CFU per larve. I Glucan CM larven korresponderte *Vibrio* sp. med 2% av total CFU, mens *Vibrio* sp. utgjorde 63 og
20 21% av det totale bakterielle antallet i henholdsvis kontroll og Macrogard® behandlede larver. Antall *Pseudomonas* sp. var ikke unormalt høy i noen av gruppene.

Beta-1,3-glukaner er kjent å være immunomodulatoriske, og de positive effektene
25 oppnådd fra behandling av torskelarver med beta-1,3-glukan fra en marin diatome indikerte at dette glukane hadde sterke immunomodulerende egenskaper. Den immunostimulerende behandlingen bredte følgelig larvene for bedre toleranse mot bakterielt stress introdusert ved forandring av dietten. Dette ble bekreftet ved de mye lavere bakterielle antallene som ble kvantifisert i larver behandlet med
30 glukane CM, enn i kontrollarver og larver behandlet med glukane fra *Saccharomyces cerevisiae* (Macrogard®).

Den meget gode motstanden mot kolonisering av *Vibrio* sp. i Glucan CM behandlet gruppe er også ventet å være et direkte resultat av immunostimulering, og er en meget positiv effekt. Blant *Vibrios* er det mange patogene arter for fisk, både opportunistiske og obligate, og utbrudd av Vibrosis etter stress er et velkjent problem ved yngelproduksjon av torsk. Det høye antallet av *Vibrio* sp. i torskelarver på dag 27 tyder derfor på dårlig tilstand for larvene og mulige infeksjoner. For Glucan CM behandlet gruppe blir det foreslått at glukane var bundet til reseptorer på makrofager i tarmslimhinnen til torskelarvene. Derved ble det uspesifikke immunsystemet i tarmen til larvene stimulert for bedre motstand mot bakteriell kolonisering og infeksjon, muligens fra *Vibrio* sp.

Dagens startfôringsregimer for torskelarver inkluderer normalt fôring med *Artemia* fra rundt dag 17-20 og i 2-3 uker, før larvene blir tilvendt til formulert, tørrfôr. I dette eksperimentet ble det vist at immunostimulering av torskelarver med Glucan CM i løpet av rotifer perioden muliggjorde en meget tidlig tilvenning av larvene på grunn av at larvene hadde ervervet en bedre toleranse mot bakterielt stress induisert av formulert fôr.

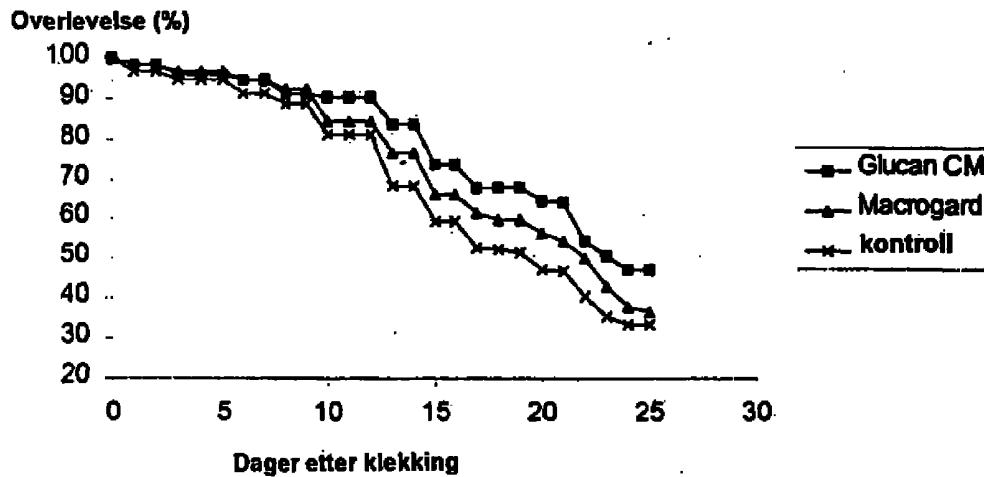
En farmasøytisk blanding ifølge foreliggende oppfinnelse, inneholdende glukane fra diatomeer, fortrinnsvis marine diatomeer, bør bli anvendt for immunostimulering av larver fra dyrkede marine oppdrettsfisk og skalldyr i løpet av startfôring med levende fôrorganismer, for å forøke vekst og overlevelse, og å forberede larvene for tilvenning til formulert fôr. Ved behandling av larvene kun i korte perioder (dager) blir ingen utmattelse av immunsystemet eller utvikling av toleranse induisert. Det kan også fremmes at sammensetningen bør være en del av formulert fôr anvendt både for fôring av yngel og voksne stadier av fisk og skalldyr, og i tilvenningsperioden for torskelarver, eller for larver fra hvilke som helst andre marine arter av oppdrettsfisk og skalldyr som må bli tilvendt fra levende fôr til tørkede dietter. Selv om eksempelet vedrører torskelarver skal oppfinnelsen ikke bli begrenset til larve eller fisk, siden den mest sannsynlig vil være like effektiv overfor andre dyr for eksempel kylling. Glukaner fra diatomeer, fortrinnsvis marine, kan også bli foreslått anvendt som adjuvans i vaksiner.

Glukaner fra marine diatomeer har bedre immunomodulerende effekt på torskelarver enn kommersielt tilgjengelig gjær glukane Macrogard®, som ikke hadde noen forbedrende effekter på levedyktigheten til larver. Torskelarver føret med Macrogard® var betraktelig kolonisert i tarmen av *Vibrio*. Forskjellen mellom 5 glukane fra marin diatome (Glucan CM) og fra gjærcellevegger (Macrogard®) er hovedsakelig vannoppløseligheten og forgreningsgraden. De positive effektene fra Glucan CM på torskelarver kan skyldes denne forskjellen. Glucan CM molekylet kan ha en struktur som gjør den mer egnet for binding til reseptorer på makrofager for derved å indusere uspesifikke immunresponser så som forsterket fagocytose 10 og produksjon av oksidative radikaler hurtigere enn Macrogard®. De store forskjellene kan dermed bli oppnådd ved anvendelse av glukane fra marine diatomeer, i stedet for glukane fra gjær.

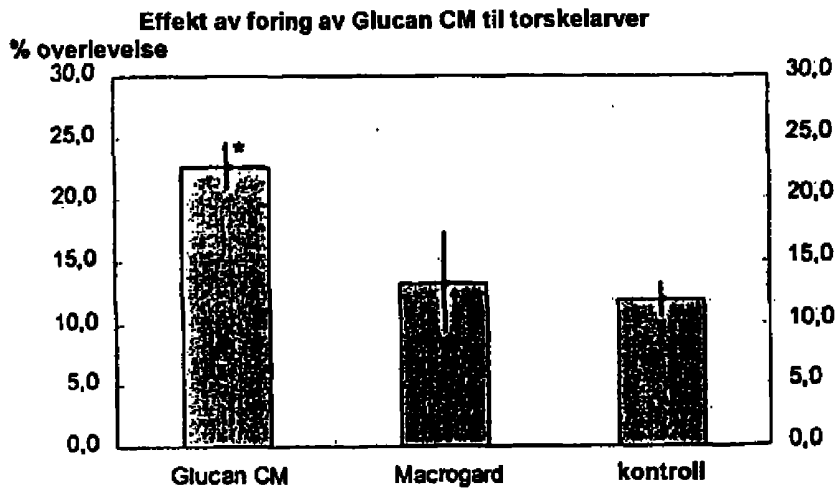
P a t e n t k r a v

1. Farmasøytisk blanding som har profylaktiske effekter for forøkning av den totale motstanden mot sykdommer forårsaket av patogene og opportunistisk
5 patogene mikroorganismer, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den omfatter glukane fra diatomeer, fortrinnsvis marine diatomeer, hvori glukane er et beta-1,3-glukan med 1-6 forgrening.
2. Blanding ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t diatomeet er en
10 Bacillariophyta,
3. Blanding ifølge et hvilket som helst av kravene 1-3, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den er en del av formulert fôr.
- 15 4. Anvendelse av glukane for fremstilling av en farmasøytisk blanding for forøkning av den totale motstanden mot sykdommer forårsaket av patogene mikroorganismer, hvori glukane er fra diatomeer, fortrinnsvis marine diatomeer, hvori glukane er et beta-1,3-glukan med 1-6 forgrening.
- 20 5. Anvendelse ifølge krav 4, hvori glukane er fra diatomeet Bacillariophyta.
6. Anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 4-5, i løpet av startfôring av larver av marine arter av oppdrettsfisk og skalldyr, med levende fôrorganismer.
25
7. Anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 5-6, i løpet av tilvenning.
8. Anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 4-7, i løpet av fôring av yngel og voksne stadier av fisk og skalldyr.
30

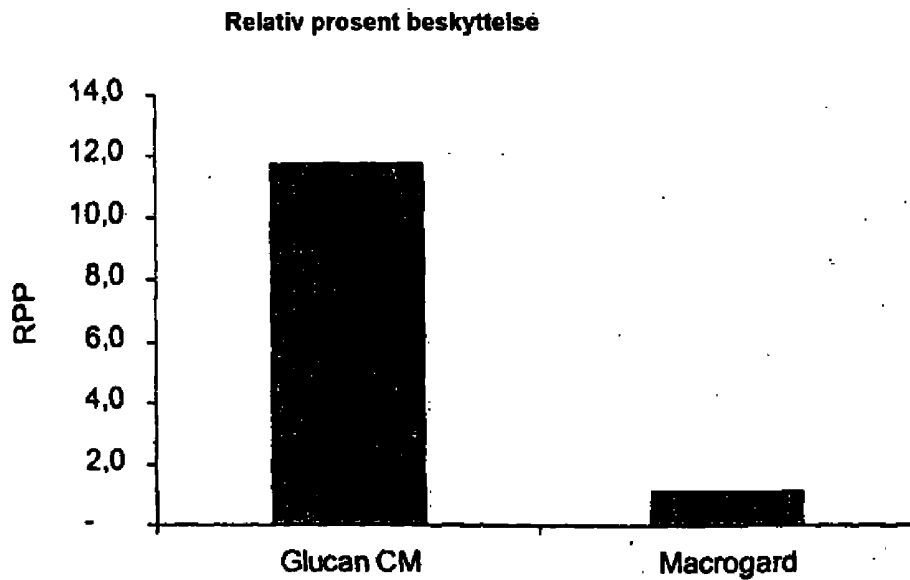
Effekt av Glucan CM på overlevelse av torskelarver



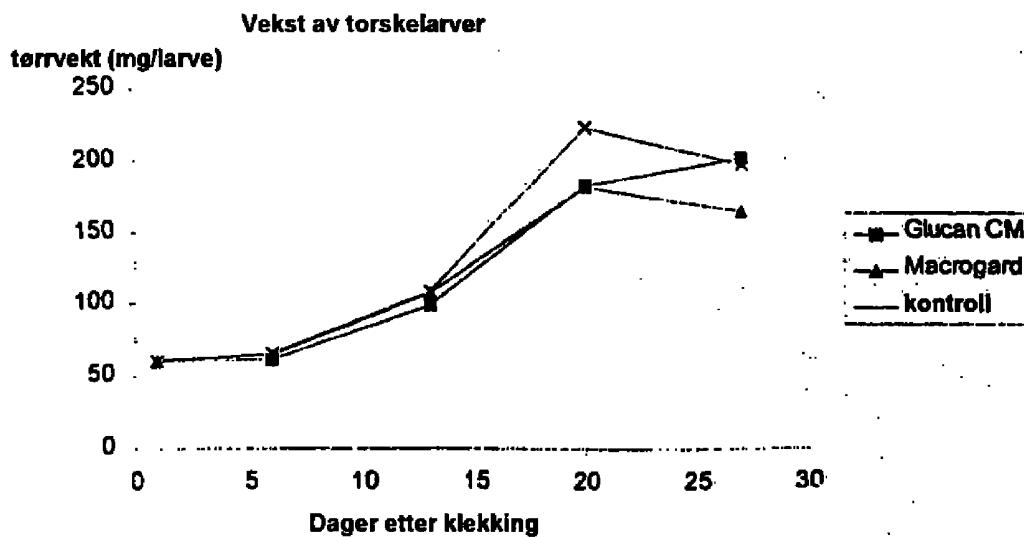
Figur 1. Dødelighetskurve for torskelarver føret med Glucan CM, Macrogard® eller vanlig anrikede rotatorier. Gjennomsnittlige overlevelsesprosentandeler for 3 replikater.



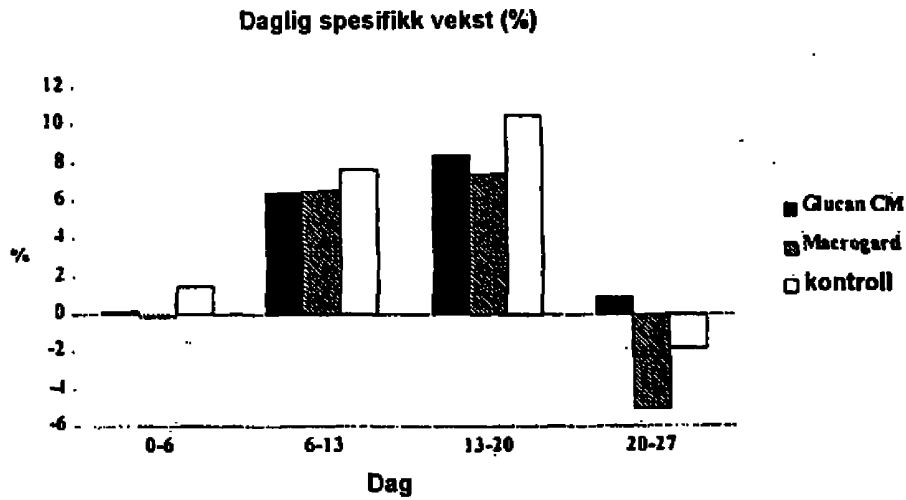
Figur 2. Gjennomsnittlig overlevelse av 27 dager gamle torskelarver føret med Glucan CM, Macrogard® eller vanlig anrikede rotatorier. N=3. * angir statistisk signifikant forskjell fra kontroll.



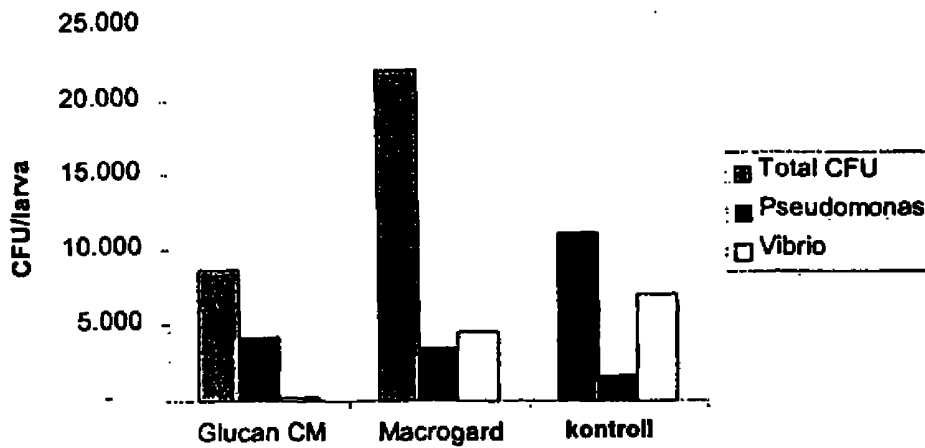
Figur 3. Relativ prosent beskyttelse fra føring av torskelarver med Glucan CM og macrogard® som immuno profylaktiske behandlinger.



Figur 4. Vekst av torskelarver føret med Glucan CM, Macroguard® eller vanlig anrikede rotatorier.



Figur 5. Daglige spesifikke vekstrater til torskelarver føret glukaner.



Figur 6. Bakterielle antall i larvetam på dag 27 etter klekking, målt på M65 sjøvann agar (total CFU), Pseudomonas Agar (Pseudomonas sp.) og TCBS (Vibrio sp.).