

SBF2011A0118 - Åpen

Rapport

Screening av mikrobeflora i vanntilførsler til settefiskanlegg for laks og ørret med fokus på *Pseudomonas* sp.

Forfatter(e)

Yngve Ulgenes
Catrine Ahlen
Jorunn Skjermo
Stine Wiborg Dähle

SINTEF ByggforskPostadresse:
Postboks 4760 Sluppen
7465 TrondheimSentralbord: 73593000
Telefaks: 73592376byggforsk@sintef.no
<http://www.sintef.no/Byggforsk/>
Foretaksregister:
NO 948007029 MVA

Rapport

Screening av mikrobeflora i vanntilførsler til settefiskanlegg for laks og ørret med fokus på *Pseudomonas* sp.

EMNEORD:
Akvakultur
Settefiskanlegg
Bakterier
Pseudomonas
fluorescensVERSJON
EndeligDATO
2011-12-20FORFATTER(E)
Yngve Ulgenes
Catrine Ahlen
Jorunn Skjermo
Stine Wibora DähleOPPDRAKSGIVER(E)
Fiskeri og Havbruksnæringens ForskningsfondOPPDRAKSGIVERS REF.
Merete Bjørgan SchrøderPROSJEKTNR
3C0777.01/ 900622ANTALL SIDER OG VEDLEGG:
21+ vedlegg**SAMMENDRAG****Overskrift sammendrag**

Bakterien *Pseudomonas fluorescens* er omtalt som en problematisk vannbakterie i enkelte settefiskanlegg, der den kan gi gjentatt og til dels massiv dødelighet. Det er i dette forprosjektet foretatt en innsamling av prøver av ferskvann og biofilm fra vannforsynings-systemene i 41 settefiskanlegg for laks og ørret i Norge. Prøvene ble analysert mhp forekomst av primært bakterien *Pseudomonas fluorescens*, og innsamlet prøvemateriale er sammenlignet med en sykdomsfremkallende variant av bakterien som er undersøkt ved Veterinærinstituttet. Ved analyse av den fiskepatogene stammen med det tradisjonelle biotypingssystemet ID32 GN, viser resultatene at den sykdomsfremkallende bakteriestammen ikke kan identifiseres som *Pseudomonas fluorescens*. En test med et nytt identifiseringssystem (MALDI ToF) som er under innkjøring ved St. Olavs Hospital, antyder at den sykdomsfremkallende stammen er en *Pseudomonas antarctica* som er en nylig beskrevet art.

Slik resultatene foreligger nå, kan vi ikke si om den fiskepatogene varianten av *Pseudomonas* finnes i det innsamlede materialet fra settefiskanleggene. Av samme årsak kan vi derfor heller ikke si noe om det er en sammenheng mellom gjentatte infeksjoner av *Pseudomonas* og typen av plastrmateriale i vannforsynings-systemet i settefiskanleggene.

Det innsamlede materialet bør undersøkes videre med de nye metodene for artsbestemmelse av bakterier for om mulig å kunne gå videre med en genotyping av den fiskepatogene varianten av *Pseudomonas*.

UTARBEIDET AV
Yngve Ulgenes

SIGNATUR

KONTROLLERT AV
Herman Helness

SIGNATUR

GODKJENT AV
Arnstein Watn

SIGNATUR

RAPPORTNR
SBF2011A0118ISBN
978-82-14-05165-0GRADERING
ÅpenGRADERING DENNE SIDE
Åpen

Innholdsfortegnelse

1	Innledning	4
2	Materialer og metoder	6
2.1	Valg av anlegg og innsamling av prøvemateriale	6
2.2	Mikrobiologiske analyser – TS, MT-Med mikro.....	7
2.3	Mikrobiologiske analyser – SINTEF F&H.....	8
2.4	Spørreskjema.....	8
3	Resultater	9
3.1	Forekomst av <i>P. fluorescens</i> i de undersøkte anleggene.....	9
3.2	Opplysninger fra spørreskjema.....	9
3.2.1	Vanninntak	9
3.2.2	Vannkvalitet for inntaksvann	11
3.2.3	Inntaksledninger og rørsystem internt i anlegget.....	11
3.2.4	Vannfordelingsrør i anleggene	11
3.2.5	Rutiner for rengjøring av rørsystemene.....	12
3.2.6	Forekomst av infeksjoner/dødelighet av fisk forårsaket av vannbakterier	12
4	Sammenligning av <i>P. fluorescens</i> fra prøvematerialet med sykdomsisolat fra VI	13
5	Genotyping	14
6	Diskusjon	15
7	Foreløpige konklusjoner	17
8	Forslag til videre arbeider	18
9	Referanser	20

1. Prosjektbeskrivelse for forprosjekt:
"Screening av mikrobeflora i vanntilførsler til settefiskanlegg for laks og ørret med fokus på *Pseudomonas* sp."
 2. Spørreskjema for innhenting av opplysninger om anleggene hvor vannprøver og biofilmprøver er hentet.
-

1 Innledning

Vanlig forekommende vannbakterier i ferskvann har vist seg i enkelte sammenhenger å være et problem i settefiskanlegg med til dels stor dødelighet. Bakterier i gruppen *Pseudomonas* sp. og spesielt *Pseudomonas fluorescens* er omtalt å kunne ha slike egenskaper.

Tidligere har man sett på infeksjoner fra vannbakterier som et spørsmål om dårlig vannmiljø i settefiskanlegget. Grunnene til dårlig vannmiljø kan være mange; bl.a. for lavt spesifikt vannforbruk med mulig oksygensvikt, akkumulering av metabolitter med særlig vekt på høye verdier av CO₂, dårlig selvrensing og partikkelopphoping i kar osv. Dårlig vannmiljø påfører fisken stress, og den kan dermed være mer mottakelig for sykdom. Siden vanlig forekommende vannbakterier normalt ikke anses som primærpatogene, har infeksjoner med slike bakterier oftest blitt sett på som et sekundærproblem. Det vil si at fisken "tåler" disse vannbakteriene når vannmiljøet generelt er godt, men blir mer utsatt når miljøet er dårlig.

I den senere tid har man kommet til at enkelte varianter av bakterien *P. fluorescens* også kan ha økt virulens og være en direkte fiskepatogen (Fiskehelserapporten 2009, 2010).

Forekomst av utbrudd som rapporteres å være forårsaket av *P. fluorescens* ses gjerne i sammenheng med håndtering av fisk – som oftest ved stikkvaksinering der man får et utbrudd etter vaksinasjon. Fisk som gjennomgår vaksinasjon, er utsatt for en del stress, og er således mer utsatt for infeksjoner enn ellers.

Noen anlegg opplever gjentatte problemer med infeksjoner forårsaket av vannbakterier. Dette har gitt mistanke om at bakteriesmitten finnes et sted i anleggene. Siden bakterien sannsynligvis kommer inn med vanntilførselen i anleggene, kan det dermed være mistanke om at det kan eksistere et reservoar av bakterier et sted i vannsystemet. Bakteriebelegg i form av biofilm som legger seg på innsiden i vannrørene og ellers på flater som er i kontakt med inntaksvannet, kan være en viktig kilde til slik gjentakende bakteriesmitte.

SINTEF har fra tidligere arbeider etablert spisskompetanse på egenskaper til bakterier innen *Pseudomonas*-gruppen. Dette gjelder blant annet *P. aeruginosa* som er blitt studert kontinuerlig i mer enn 20 år i forbindelse med infeksjons-problematikk hos dypdykkere i Nordsjøen. Bakterien fins overalt i vann, og i dag vet man at bakteriearten har flere hundre forskjellige genotyper. Fra studier av miljøet for dykkerne i Nordsjøen, har man kunnet dokumentere at det kun er noen svært få genotyper av bakterien som er et problem og gir infeksjoner hos dykkerne. Disse genotypene har man videre kunnet vise at de er etablert i biofilm i de rommene der dykkerne oppholder seg og spesielt i vannsystemene (rør og vannbeholdere) der. I denne biofilmen kan *Pseudomonas aeruginosa* overleve svært lenge til tross for regelmessig rengjøring og desinfeksjon. Derfra smitter den miljøet og forårsaker infeksjoner om og om igjen hos dykkerne. (Ahlén et al 1998, 2000, 2001 og 2003). De strategier og metoder som etter hvert er blitt utviklet for å avdekke sammenhenger ved miljørelaterte infeksjoner er vist å være meget brukbare også til andre typer infeksjonsovervåking, for eksempel Legionella.

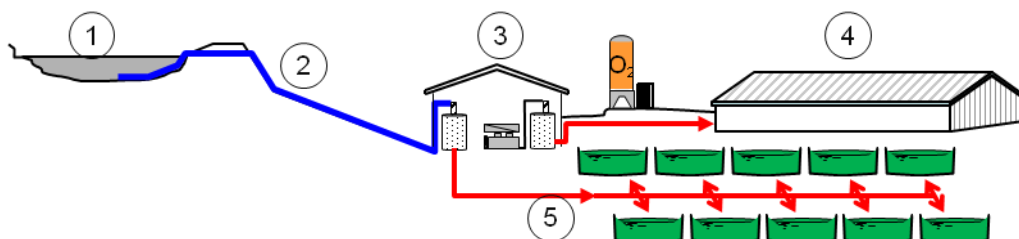
Problemstillingen knyttet til *P. fluorescens* og forekomst av fiskesykdom ble fra vår side sett på som en analog til problematikken med *P. aeruginosa* og infeksjoner hos dykkere. Dette var bakgrunn for initieringen av dette forprosjektet.

Ved SINTEF Materialer og kjemi har man etablert mye kunnskap om bakterien *P. fluorescens*. Den brukes mye som modellorganisme for bl.a. anvendelser innen bioteknologi. Kunnskapen om disse to artene av bakterier innen Pseudomonas-gruppen er blitt både større og delt i løpet av de siste 4 årene gjennom en konsernsatsing på Systembiologi – Biofilm ved SINTEF (2008-2011) med deltakelse fra tre institutt (SINTEF Helse, Materialer og kjemi, Fiskeri og havbruk) og fire avdelinger.

Siden det er grunn til å mistenke at bakterien *P. fluorescens* kan oppholde seg i biofilm et sted i vannsystemene i settefiskanleggene, har dette vært bakgrunnen til etableringen av dette forprosjektet. Ved å samle inn prøver av vann og biofilm fra så mange anlegg som mulig for så å analysere disse mhp bakterier og spesielt fokusere på *Pseudomonas fluorescens*, har man søkt å få en oversikt over forekomst av denne bakterien i vannsystemene til settefiskanleggene.

2 Materialer og metoder

Den prinsipielle oppbyggingen av et settefiskanlegg som var grunnlag for planlegging av prøvetaking, er gitt i prosjektbeskrivelsen som er vedlagt denne rapporten (vedlegg 1) og vist ved illustrasjon i figur 1.



Figur 1. Skjematisk illustrasjon av et settefiskanlegg.

Figuren ovenfor angir hoveddelene av anlegget der det ble tatt ut vannprøver:

1. Vannkilde (elv, innsjø eller grunnvann)
2. Hovedvannledning fra vannkilde til anlegg
3. Avdeling for behandling av vann (f.eks. lufting / oppvarming etc.). Dette kan være eget hus eller rom i hovedanlegget
4. Hus for klekkeri og startforing. Mellom vannbehandling og klekkeri/startforing er et rørsystem angitt med rød strek.
5. Uteavdeling for påvekst. Mellom vannbehandlingsavdeling og uteavdeling går et rørsystem angitt med rød strek og fordeling til hvert kar.

Hensikten med prøvetakingsopplegget var å se om det på denne måten kunne avdekkes hvor i anleggets rørsystem bakterien kunne befinne seg, og/eller om det var noen sammenheng mellom rørmaterialet og forekomst av bakterien. Ett av spørsmålene som var stilt ved begynnelsen, var om det kunne finnes noen sammenheng mellom typen av plastmaterialet i rørene i anleggene. I denne sammenheng om det kunne være noen sammenheng mellom bruk av PVC-rør og forekomst av bakterien *P. fluorescens* i vannet. Bakterien *Pseudomonas fluorescens* er dokumentert å kunne bruke PVC som karbonkilde ved vekst i biofilm (Aamer et al. 2008).

2.1 Valg av anlegg og innsamling av prøvemateriale

Mht. valg av anlegg for innsamling av prøver, måtte vi sette antall anlegg som kunne inkluderes i forhold til de tilgjengelige ressurser i prosjektet. Et viktig kriterium var å få til en relativt god geografisk spredning mellom anleggene og at deres totale produksjon av smolt representerte en betydelig andel av den smolten som totalt produseres i Norge.

På forhånd visste prosjektleder om noen av anleggene som hadde hatt problemer med infeksjoner man mener er forårsaket av *P. fluorescens*. Det understrekes imidlertid at analyselaboratoriet *ikke* hadde denne informasjonen før prøvematerialet ble analysert. Denne ”nøkkelen” ble åpnet først når alle analyseresultatene forelå.

Prøver av vann og biofilm fra de ulike delene av rørsystemet som angitt ovenfor, ble samlet inn fra i alt 41 settefiskanlegg for laks og ørret. Anleggenes er geografisk plassert i Sør-Norge, Midt-Norge og i Nord-Norge. Det var flest anlegg fra Sør- og Midt-Norge.

Vannprøver ble fylt på sterile 1 liters plastflasker. Biofilm-prøver ble tatt fra samme prøvepunkt som vannprøvene og ble tatt ut med bomulls-svabere (Culturettes). I den grad det var mulig, ble vannprøver og biofilm-prøver tatt der vannet ikke hadde vært i kontakt med fisk.

Det ble tatt prøver fra følgende 4 hovedpunkt i vanntilførsel til anlegget:

- Direkte i vannkilden (elv eller innsjø) i nærhet av inntaksledning
- Fra hovedinntaksledning til anlegget (f. eks før lufter)
- Fra rørfordelingssystemet til klekkeri og/eller startforingsavdeling – gjerne ved innløp til et kar
- Fra rørfordelingssystemet til påvekstkar og/eller ”uteavdeling” – fortrinnsvis direkte fra innløpsvannet til et kar

Prøvene av vann og biofilm ble fraktet til Trondheim på raskest mulige måte (”over natten leveranser”). Prøvene ble tatt hånd om ved SINTEF Teknologi og Samfunn (TS), Medisinsk Teknologi (MT) ved gruppe for Medisinsk mikrobiologi (Med mikro) der materialet ble delt i to for analysering hhv. ved mottakslaboratoriet og ved SINTEF Fiskeri og Havbruk.

2.2 Mikrobiologiske analyser – TS, MT-Med mikro

Filtrering, kultivering og primæravlesing

Prøvemateriale på 0,5 L ble filtrert (Millipore 0,45 μ) for analysering av *P. fluorescens*. Filteret ble delt i to til 2 st Pseudomonas-agar skåler (Cetrimidin) med inkubering ved hhv. Romtemperatur (22°C) og 37°C. 0,5 ml av prøven ble kultivert på hhv Blod-agar, Mc Conkey-agar og TSA-agar.

Ved avlesing (som er gjort av en og samme person) ble det gjort dels en semi-kvantitativ bedømmelse av den totale mikrobeveksten (+, ++, +++ og overvekst) for å bedømme antall bakterier i prøven. I tillegg gjorde man dels en kvalitativ bedømming der mistenkte kolonier av *P. fluorescens*, andre pseudomonas/aeromonas, coliforme og andre Gram-negative staver som enten var i dominans eller som ble bedømt ikke å tilhøre en normal vannflora ble spredd for videre uttesting. Samtlige primærkulturer er nedfrost for senere analysering etter behov.

Identifisering /Biotyping

Til artsidentifisering av hvert enkelt bakterieisolat er biotypingssystemet ID32 GN (bioMerieux) benyttet. Dette systemet er velrenommert, og har vært brukt som standard i mange tiår,

Genotyping

Genotyping av bakterier gjøres for å finne mikrober som er "identiske" og er et nødvendig verktøy for relevant smittesporing. Ved hjelp av Pulsed Field Gel Electrophorese, PFGE genotyping av *P. aeruginosa* i dypdykkerinfeksjoner har man i dag kunnet identifisere noen svært få genotyper som er ansvarlige for samtlige infeksjonsutbrudd blant metningsdykkere i de siste 15-20 år.

PFGE-metoden er målfokus i den nå aktuelle forstudien av *P. fluorescens* hos settefisk.

Som referansestamme i søket etter potensielle infeksjonsgenotyper av *P. fluorescens* i settefiskanlegg, fikk vi tilsendt en relevant "sykdomsstamme" fra Veterinærinstituttet etter skriftlig avtale med anlegget hvor stammen kom fra. Denne sykdomsstammen av bakterien er i følge Veterinærinstituttet vist å kunne medføre utbrudd av sykdom ved smitteforsøk.

2.3 Mikrobiologiske analyser – SINTEF F&H

Prøver på 100 µl fra de 159 innsamlede vannprøvene ble strøket ut til to ulike agarskåler, Pseudomonas med CFC-supplement og TSA (Tryptic soya agar) i tre ulike fortyndninger og inkubert ved 10 C° i 20 dager. Ulike kolonier ble plukket enkeltvis fra skålene, ca. 15 kolonier fra TSA og 5 fra Pseudomonas agar, og dyrket over natt i TSB (Tryptic soy broth) i 96-brønners Nuncbrett, med risting ved 10 C°. Dagen etter ble brettene tilsatt glycerol (20 %) og fryst ned ved -80 C°. Totalt ble det isolert 1200 kolonier fordelt på 19 brett.

2.4 Spørreskjema

I sammenheng med innsamling av vannprøver og svaber-prøver av biofilm ble anleggene også bedt om å svare på en del enkle spørsmål om vannkvalitet og om rørsystemet som forsyner anleggene med vann. Vi fokuserte i denne sammenheng på hvilket materiale rørsystemene var laget av (f. eks. PVC, PE e l). Samtidig ble det spurt om vaskeprosedyrer for røranleggene, og når slike rutiner sist ble gjennomført i anleggene. Spørreskjemaet som ble benyttet ved prøveinnsamling, er vedlagt (vedlegg 2).

3 Resultater

3.1 Forekomst av *P. fluorescens* i de undersøkte anleggene

I tabell 1 vises resultatene gjeldende forekomst av *P. fluorescens* ut fra biotyping med ID32GN i de undersøkte settefiskanleggene. Biotypingsystemet ID32GN er den biotypemetode som i dag er mest brukt til slekts- og artsidentifisering av bakterier. *P. fluorescens* med identifiseringsnivå "excellent", "very good", "good" og "acceptable" ble påvist i prøver fra 18 av de 41 anleggene (40 %).

I tillegg til *P. fluorescens* er det i tabellen også gitt informasjon om forekomst av andre bakterieslekter som vil kunne være relevante for problemstillingen, samt et estimat på den totale mikrobemengden i vannet i anlegget gitt som semi-kvantitative tall.

3.2 Opplysninger fra spørreskjema

Spørsmålene i spørreskjemaet var utformet med tanke på å innhente eventuell støtteinformasjon til de resultatene man fikk ved analyser av bakterier i vannprøvene. Slik hypotesen ble formulert i prosjektdefinisjonen, var bruk av PVC-rør i settefiskanlegg omtalt som mistenkt årsak til at *Pseudomonas fluorescens* var et gjentakende problem i anleggene. Bruk av PVC-rør i anleggene ble derfor fokusert i spørsmålstillingen.

Denne formen for datainnsamling må vi anta kan gi noe unøyaktige resultater, og konklusjonene vi kan trekke må forstås ut fra det.

3.2.1 Vanninntak

Inntak fra elv:	28 %
Inntak fra innsjø:	64 %
Flere inntak (elv/innsjø/grunnvann):	8 %

De fleste hadde som ventet inntak av vann fra innsjø, mens ca. 1/3 av anleggene tok enten fra elv alene (28 %) eller både fra elv og innsjø, evt. elv og grunnvann (8%). Inntaksdyp for dem som tok vannet fra innsjø, varierte avhengig av årstid og lå mellom 1 – 3 m om sommeren og ned til 20 – 40 m om vinteren.

Inntakets avstand fra settefiskanlegget varierte fra ca. 50m og opp til 3,5 km på det lengste. Det var i varierende grad annen aktivitet i nedslagsfeltet for anleggene så som bebyggelse/hytter samt jordbruk /skogbruk. For dem som oppga noe her, var det jordbruk som ble fokusert.

Tabell 1. Forekomst av *Pseudomonas fluorescens* i settefiskanlegg påvist vha. ID32GN, vår 2011 (se merknader til tabell øverst på neste side)

Anlegg nr	Antall Prøver /Semi kvantitativ bedømmelse	<i>P. fluorescens</i> 1 eller 2 Excellent, Very Good, Good identification	<i>P. fluorescens?</i> Low discrepancy, Doubtful, Unacceptable identification	Andre bakterietyper (se merknader)
1	12 / +		Doubt	S, A
2	7 / +			P, Y(4), S(2), A
3	5 / ++	Pfl 1 (prøve 4)		P, A,E
4	8 / +(+)	Pfl 2 (prøve 5)		Y, A, E
5	5 / +++	Pfl 2 (prøve 2)		A
6	9 / ++	Pfl 2 (prøve 2)		P, S, A
7	5 / ++	Pfl 2 (prøve 4)		Y(2), S, A, E
8	8 / ++	Pfl 1,2 (prøve 3,6)	+ Low disc + Unaccept	Y, A,
9	8 / +	Pfl 1,2 (prøve 5,7,8)	+ Low disc + Unaccept	
10	4 / +	Pfl 1 (prøve 1)		Y, A, C,
11	6 / +		Unaccept	Y, M, K
12	8 / +	Pfl 2 (prøve 1,4)		P, Y, S, A
13	8 / (+)			P, S
14	10 / ++			E
15	8 / +			Y, S, A
16	8 / ++			Y, S, A
17	8 / +	Pfl 1 (prøve 3)		P, S, A
18	8 / ++		Doubt	
19	8 / ++			Y, S, A
20	8 / ++			P, Y, S, Ec, A
21	8 / ++			A
22	7 / ++	Pfl 1,2 (prøve 2,5)		P, S, E,
23	8 / +++	Pfl 1,2 (prøve 1,4)	+ Doubt	P, S, A
24	8 / ++	Pfl 2 (prøve 1)		S
25	8 / (+)			P
26	8 / ++	Pfl 1,2 (prøve 2,5,8)		
27*	8 / ++			Y, S
28*	8 / ++			P, S, A
29*	8 / +			S
30*	8 / ++		Doubt	P, S
31*	8 / +			P, A
32*	8 / +			Y, S, Ec
33*	8 / +			S
34*	8 / ++	Pfl 1 (prøve 1)	+ Doubt	S, C
35*	8 / (+)	Pfl 2 (prøve 2)		S, E
36*	8 / +++	Pfl 2 (prøve 1)	+ Low disc	P
37*	8 / +++	Pfl 1,2 (prøve 1)		Y, S, A, E
38*	7 / ++(+)			P, Y, A, E
39*	8 / ++			P, S, E
40*	8 / (+)			S
41*	8 / ++			P, S, E

Merknader til tabell 1.

Pfl = Funn av *Pseudomonas fluorescens*, (excellent/very good/good identification)

P. fluorescens? = Low discrimination/doubtful/unacceptable identification

P fl 1= *Pseudomonas fluorescens* type 1; P fl 2: *Pseudomonas fluorescens* type 2

Prøvenr 1-4 = vann; Prøvenr 5-8 = svab

Andre bakterietyper: Y: Yersinia; P: Pseudomonas; S: Serratia; A: Aeromonas; E: Enterobacter; Ec: Ecoli;

M: Morganella, K: Klebsiella; C: Citrobacter;

Semi-kvantitativ bedømmelse: (+) = Kun normalflora; + = beskjeden forekomst; ++ = moderat forekomst; +++ = rikelig forekomst

*: Prøver tatt 20-27. juni er ikke full-analysert grunnet sent innkommet prøvemateriale.

3.2.2 Vannkvalitet for inntaksvann

Dataene for vannkvalitet viste en pH – variasjon mellom 5,2 og 7,2 med hovedvekt på området mellom 6,3 og 6,8. En pH-verdi ned mot 5,2 er meget lavt, og antas å representere ytterpunkter som oppstår i kun spesielle situasjoner (f. eks ved snøsmelting/ekstremregn). Alkaliteten på råvannet lå mest mellom 0,05 og 0,1 mmol/L med noen få høyere verdier (0,15 – 2).

Det var kun halvparten av anleggene som besvarte spørsmålet om farge på inntaksvannet. Mange anga "varierer", "lite" eller "noe". Vi kan anta at dette er uttrykk for at verdiene for fargetall ikke er målt i særlig stor grad.

3.2.3 Inntaksledninger og rørsystem internt i anlegget

Vi spurte her etter materialtype for rørledningene som forsynte anlegget med vann samt alder på dette rørsystemet. Den vanligste typen av inntaksledning var polyetylen (PE) mens noen også hadde PVC i hovedinntaksrøret for vann. Fordelingen for materiale i hovedledninger til anleggene var slik:

PE (polyetylen)	72 %
PVC	17 %
PVC/PE/glassfiber	11 %

Alderen på hovedinntaksledning(e) varierte mellom 3 år og 35 år. De fleste av settefisk-anleggene ble bygget i perioden 1980 – 85, og det er da naturlig at hovedtyngden av hovedvannforsyningen også har en alder i området 25 – 30 år. Det aller meste av det opprinnelige vannforsyningssystemet er fortsatt i bruk. I den grad det har vært fornyinger av vanninntakene, har dette vært for å øke kapasitet. I slike sammenhenger har ny vannledning blitt lagt parallelt med den gamle rørledningen.

3.2.4 Vannfordelingsrør i anleggene

I settefiskanleggene er det gjerne et separat rørsystem internt på anleggene mellom et luftetårn ved hovedinntaket og ut til de ulike delene i anleggene (klekkeri/startfôring/påvekst). Rørmaterialet mellom luftetårn og karavdelinger fordelte seg slik:

PE (polyetylen)	45 %
PVC	32 %
PVC og PE	23 %

Det er altså betydelig flere som har PVC-rør i fordelingssystemet for vann i anlegget sammenlignet med det man har i hovedvannforsyningen. Over halvparten har PVC i det interne rørnettent enten alene eller det finnes en blanding av PE og PVC. Den delen av rørnettent som består av PVC, er gjerne dent som ble installert først, og som dermed er den eldste delen av vannforsyningssystemet.

3.2.5 Rutiner for rengjøring av rørsystemene.

Vi spurte i denne sammenheng om hvilke rutiner de hadde for rengjøring av rørnettent og evt om dette ble gjennomført etter et visst mønster. De aller fleste anleggene hadde ingen rutiner for spyling og rengjøring av vannforsyningssystemet. Kun 6 % av anleggene hadde spylt eller rengjort inntaksledningene for vann til anlegget. Vi har i denne sammenheng ikke tatt med dem som brakklegger hele eller deler av vannforsyningssystemet over vinteren fordi det ikke er i bruk i denne perioden.

Når det gjaldt rengjøring av det interne rørnettent i anleggene var det flere som hadde gjennomført dette (26 %), men bare 10 % av anleggene gjennomførte dette regelmessig eller hadde gjort det mer enn 1 gang. Ca $\frac{3}{4}$ av anleggene hadde altså aldri spylt eller rengjort det interne rørsystemet siden anlegget ble bygget.

3.2.6 Forekomst av infeksjoner/dødelighet av fisk forårsaket av vannbakterier

Vi spurte om hvorvidt man i det hele tatt hadde påvist infeksjoner og dødelighet av fisk i anlegget som kunne vært forårsaket av vannbakterier. Det viste seg at 10 (ca 25 %) av de undersøkte anleggene hadde hatt påvisninger og problemer av varierende karakter knyttet til vannbakterier. I noen tilfeller var årsakssammenhengene noe uklare, men vannbakterier ble angitt som mest sannsynlige årsak til problemene.

I 8 av anleggene var problemene gjentakende dvs. at de hadde opplevd fenomenet flere ganger. Problemene kom i forbindelse med håndtering av fisk og gjerne i forbindelse med vaksinerings. Også markante temperaturoppgjeng ble angitt som sammenfallende med påvist infeksjon. I 5 av de 41 anleggene ble det rapportert at *Pseudomonas* sp. hadde forårsaket til dels betydelig fiskedød, og at dette hadde gjentatt seg flere ganger.

Det var 4 anlegg som oppga spesifikt at *Pseudomonas fluorescens* var diagnostisert som direkte årsak til problemene. Det vil i praksis si at 10 % av anleggene som er med i denne studien, har hatt eller har til dels gjentatte infeksjoner på fisk der denne bakterien er hovedmistenkt.

4 Sammenligning av *P. fluorescens* fra prøvematerialet med sykdomsisolat fra VI

Et isolat av en sykdomsfremkallende *P. fluorescens* (Fnr 6965 2009-09-352 L1) ble oversendt SINTEF fra Veterinærinstituttet. Dette skjedde etter avtale med det aktuelle oppdrettsselskapet som har hatt gjentatte infeksjoner med denne bakterien i sitt anlegg og hvor sykdomsbakterien er hentet fra. Den gjeldende bakterien er testet i laboratoriet hos Veterinærinstituttet, og det er verifisert at bakterien er sykdomsfremkallende hos laks i ferskvannstadiet. Opplysninger om smitteforsøk er delvis beskrevet på internett (www.vetinst.no/pseudomonas1), men er ennå ikke publisert. I beskrivelsen gitt på web omtales bakterien som aggressiv, og at den virker atypisk i forhold til andre isolat av *P. fluorescens* som er studert.

I forbindelse med genotyping blir samtlige isolat retestet på biotyping (ID32 GN); så også isolatet Fnr 6965 fra Veterinærinstituttet. Dessverre viste den seg ikke å kunne identifiseres som *P. fluorescens* men kom ut som *P. fluorescens* "unacceptable profile". I likhet med beskrivelsen fra Veterinærinstituttet fant vi den atypisk også i forhold til våre *P. fluorescens*-isolat og kjente referansestammer av bakterien.

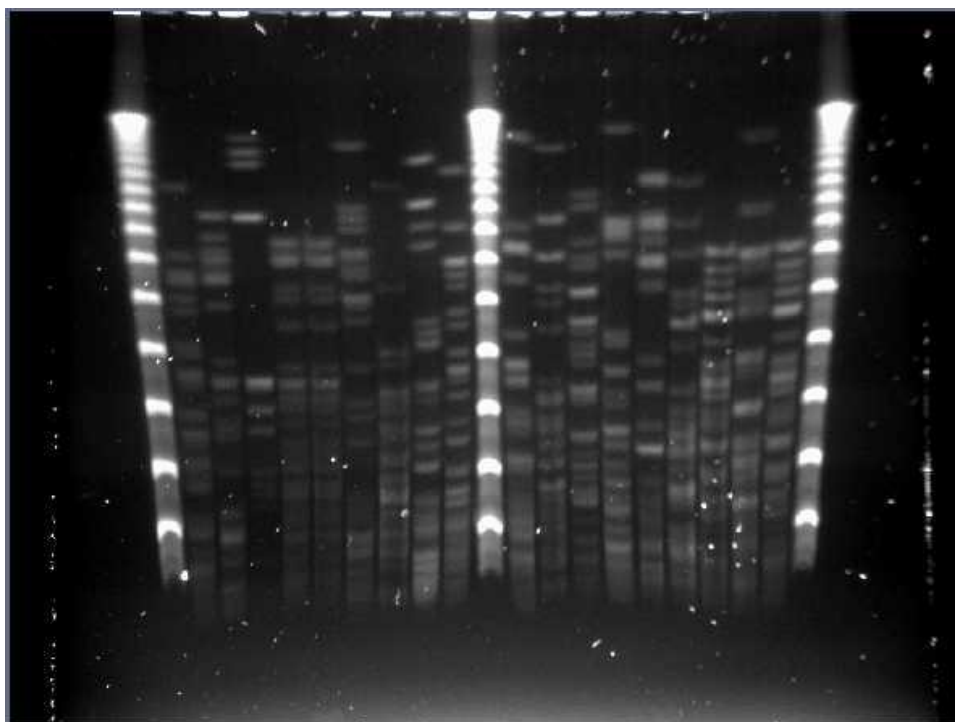
Fra analysene av det innsamlede materialet fins som angitt i tabell 1, i tillegg til *P. fluorescens* "excellent", "very good", "good" og "acceptable" også *P. fluorescens* "low discrimination", "doubtful" og "unacceptable". Hvorvidt den kjente sykdomsfremkallende bakterien er tilstede i materialet fra settefiskanleggene kan derfor ikke evalueres slik resultatene foreligger nå.

En helt ny generasjon analyseutstyr for bakterieidentifisering - Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI)-TOF (Time of flight) - er fra høsten 2011 under etablering ved St. Olavs Hospital sin mikrobiologiske avdeling. Vi fikk anledning å analysere noen meget få isolat på dette nye utstyret, og valgte da å teste den tilsendte *P. fluorescens* stammen (Fnr 6965 2009-09-352 L1). Denne analysen kom ut med *Pseudomonas antarctica* som første valg. Hvorvidt denne inngår i "*P. fluorescens* group" er foreløpig uklart.

5 Genotyping

PFGE-metoden som med stor fremgang er blitt brukt for å separere infeksjonsstammer av *P. aeruginosa* i dypdykkermiljø er vist å være meget egnet også for å skille mellom ulike *P. fluorescens* fra settefiskanlegg. I figur 2 nedenfor er genotyping av *P. fluorescens* stammer (excellent id) fra settefiskanlegg vha. PFGE eksemplifisert og visualisert.

På bakgrunn av de så langt mangelfulle biotypingsresultatene som ble sett fra ID32GN, vil det ikke ha noen hensikt å foreta genotyping av totalmaterialet fra denne screeningen på det nåværende tidspunkt. Det er dog verdt å nevne at den foretatte genotypingen indikerer at det kan være en viss anleggsdominans av enkelte genotyper; dvs. flere prøver fra samme anlegg viser samme genotype.



Figur 2. Separasjon av genotyper av *P. fluorescens* ("excellent id") vha. PFGE

6 Diskusjon

Prøvetaking

Hensikten med prøvetakingsopplegget var å se om det på denne måten kunne avdekkes hvor i anleggets rørsystem de potensielt problematiske bakteriene kunne befinne seg, og/eller om det var noen sammenheng mellom rørmaterialet og forekomst av bakterier. Siden prøvene måtte sendes til laboratoriet i Trondheim kunne mikrobene fortsette å vokse i ulik grad inntil videre bearbeiding, og materialet gir derfor ikke grunnlag for en sikker kvantitativ analyse.

Det var ikke mulig å ta prøver av rennende vann direkte fra rør i alle anlegg, da mange har et dykket innløp i fiskekarene og det var komplisert å demontere dette. I noen tilfeller ble vannprøver og prøver av biofilm derfor tatt direkte i karvannet i nærheten av innløpet til karet. I anlegg med resirkulering av vann var det mindre viktig hvor man tok ut vannprøvene, men de planlagte punktene for prøvetaking ble likevel fulgt i størst mulig grad.

Mikrobiologiske analyser- *P. fluorescens*

P. fluorescens var målmikroben i dette forprosjektet, og bakterien ble med sikkerhet påvist fra 18/41 anlegg (44 %). Tilførselen av bakterien kunne for 8 av de 18 anleggene vises å være relatert til vanninntaket. Bakterien er påvist i både vannprøver og svabprøver (biofilm). Påvisning var i dette prosjektet basert på biotyping med ID32 GN som verktøy der man i tillegg til identitet også får skilt mellom *P. fluorescens* type 1 og type 2. Som ses i resultattabellen er det variasjon mellom anleggene hvilken type av bakterien som er representert. Noen anlegg har kun den ene typen, mens det var kun én type i noen anlegg.

Hovedformålet med dette forprosjektet var via genotyping av *P. fluorescens*-isolat fra settefisk-anleggene om mulig å kunne identifisere og skille hyppige infeksjonsgenotyper fra ikke-infeksjonsgenotyper. Dette falt bokstavelig talt "i fisk" da den eneste sykdomsstammen (tilsendt fra VI) og som skulle være referanse for genotypingen, ikke kunne biotypes til *P. fluorescens* i vårt analysesystem. Videre analysering av VI-stammen vha. MALDI-Tof foreslår at stammen er en *Pseudomonas antartica*, en relativt nylig beskrevet art identifisert vha. nye molekylær-mikrobiologiske metoder. MALDI-Tof separerer utfra proteinmønstre.

Tilleggsanalyser – andre tilstedeværende bakterieslekter

De foretatte analysene har i tillegg til prosjektfokus *P. fluorescens* avdekket forekomst av en rekke andre bakterieslekter av hvilke noen er kjente som potensielt sykdomsfremkallende (for eksempel *Yersinia*). Samtlige isolat fra dyrking av bakterier på skåler er tatt vare på og nedfrosset for mulige videre analyser. Etablering av det nye verktøyet MALDI-Tof – som er betydelig mindre ressurs- og kostnadskrevenne enn det gamle biotypingssystemet (ID32 GN), vil gjøre det mulig med større kartlegginger av de faktisk forekommende slekter og arter i de forskjellige anleggene, og dermed gi føringer og ny kunnskap om forekomsten av spesifikke infeksjonsarter også i dette materialet.

Spørreskjema

Fra de opplysningene vi har innhentet, kan det se ut til at mer enn 10 % av anleggene enten har et betydelig problem, eller i det minste er kjent med problemet fra eget anlegg. Hvis man inkluderer

alle dem som har meddelt at de visste om eller trodde de hadde et problem med vannbakterier (ulike arter), kan man hevde at så mye som 1 av 4 anlegg kan ha problem av denne typen. Dette tyder på at problemomfanget kan være stort, og det burde derfor vært gjennomført en screening av alle anlegg i Norge for om mulig å avdekke det totale omfanget. Forutsetningen for en slik screening vil dog være at man har en optimal analysemetode mht. å kunne separere de ulike bakterieartene.

Til sist - siden vi ikke vet med sikkerhet hvorvidt den antatt fiskepatogene varianten av *P. fluorescens* finnes i det materialet vi samlet inn, kan vi på dette tidspunktet heller ikke si noe om materialkvalitet i rørsystemene har noen innvirkning på forekomst av vannbakterien i settefiskanleggene. Hypotesen om at PVC som rørmateriale kan fungere som "næring" og dermed bidra til at bakterien lett kan etablere seg og overleve i biofilm i rørsystemet, kan derfor på det nåværende tidspunkt ikke vurderes.

7 Foreløpige konklusjoner

- Det er foretatt en mikrobiologisk screening med biotyping for å påvise forekomst av *Pseudomonas fluorescens* i vannprøver og biofilmprøver hentet fra 41 settefiskanlegg for laks og ørret
- *P. fluorescens* (excellent/very good/good/acceptable identification) er påvist i 18 av 41 anlegg
 - I tillegg ser vi flere anlegg med *P. fluorescens* med usikker identifisering, herunder "low discrimination", "doubtful" og "unacceptable"
- Det sykdomsfremkallende *P. fluorescens*-isolatet supplert fra Veterinærinstituttet kommer ut som "unacceptable" i vårt testsystem
 - Analyse med et helt nytt analyseverktøy - MALDI-Tof - gir *P. antarctica*
- Et viktig formål med dette forprosjektet var om mulig å genotype *P. fluorescens*-isolat fra settefiskanleggene for å se om man kunne skille hyppige infeksjonsgenotyper fra ikke-infeksjonsgenotyper. På bakgrunn av at det anvendte biotypingsverktøyet ID32 GN har vist mangelfull evne til å identifisere hvilken art den infeksjøs bakterien er, har dette ikke vært mulig. Om vi har den infeksjøs varianten av mikroben i det innsamlede materialet, kan vi derfor heller ikke si.
- All identifisering av mikrobearter vil i videre arbeid bli utført med MALDI-Tof teknikk som i tillegg til sikrere analyser også er raskere og rimeligere enn tidligere metodikker.

8 Forslag til videre arbeider

Pseudomonas fluorescens ble i januar 2011 meldt om å være årsak til massedød hos settefisk. Problematikken med vannrelaterte infeksjonsutbrudd har vært kontinuerlig arbeidet med i over tjue år gjennom de hyppige utbruddene av hud- og øreinfeksjoner forårsaket av *P. aeruginosa* som dypdykkere offshore har vært og fortsatt er plaget med. I dag vet man at det kun er noen svært få genotyper av bakterien som gir infeksjoner om og om igjen til tross for regelmessig rengjøring og desinfeksjon og at disse vil kunne overleve over tiår i mikrobiologiske samfunn, kalt biofilm, i vannsystem. Biofilm-problematikk henger nøye sammen med materialbruk der noen materialer fremmer dannelse av biofilm mens andre kan motvirke dannelse.

Hovedformålet med dette forprosjektet var – analogt med dykkerproblematikken - å se hvorvidt man kunne identifisere genotyper av *P. fluorescens* som forekom oftere i infeksjonssammenheng for deretter å se på relasjon mellom slike genotyper og materialbruk. Som det fremgår av de rapporterte resultatene, vil det på det nåværende tidspunktet ikke være verken relevant eller hensiktsmessig å genotype den populasjon av *P. fluorescens* som man hittil har kunnet fått identifisert som sikker identifikasjon. Dette all den stund det eneste sykdomsisolatet som er biotypet i vårt system, kommer ut som "unacceptable id" og derfor faller utenfor.

Samtidig med undersøkelsene av forekomst av *P. fluorescens* ble det også sett litt på forekomst av andre bakterier som vi ut fra vår erfaring vil kunne spille en rolle i en sykdomsrelatert tematikk. Representative prøver fra hvert anlegg ble videre undersøkt mhp. florasammensetningen og som vises i Tabell 1 er det relativt mange Gram-negative bakterieslekter som er representert; *Pseudomonas*, *Yersinia*, *Serratia*, *Aeromonas* samt i noen tilfeller en coliform flora med *Enterobacter*, *E. coli*, *Morganella*, *Klebsiella* og *Proteus*.

Vi har i et lite utvalg av prøver også sett på artssammensetningen hos de ulike slektene som er i materialet, noe som også eksemplifiserer kompleksiteten:

Pseudomonas: *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. alcaligenes*, *P. stutzeri*

Stenotrophomonas: *S. maltophila* (fd *Pseudomonas*)

Yersinia: *Y. kristensenii*, *Y. intermediae*, *Y. ruckeri*, *Y. frederiksenii*, *Y. enterocolitica*

Serratia: *S. fonticola*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*

Aeromonas: *A. hydrophila*

E. coli og coliform flora:

Enterobacter: *E. cloacae*, *E. gergoviae*

Morganella: *M. morganii*

Klebsiella: *K. oxytoca*, *K. pneumonia*

Proteus: *P. vulgaris*

Citrobacter: *C. freundii*

Hafnia: *H. alvei*.

Som for *Pseudomonas aeruginosa*, som er dokumentert som patogen i dykkermiljøer, vil det helt sikkert være enkelte genotyper hos de fleste mikroorganismer som oftere opptrer i infeksjoner og dette gjelder særlig i infeksjonsutbrudd. Videre vil noen mikrober kunne "hjelp andre" med

ulike substanser/komponenter/metabolitter som kan gjøre dem mere sykdomsfremkallende og dette skjer som oftest når de blir sammenført i en biofilm; for eks. i rørsystemer, tanker etc.

Med den nye identifiseringsteknikken som nå er tilgjengelig (MALDI-Tof) vil man få helt nye muligheter å gjøre mer presise identifiseringer på større prøvematerialer og det på kortere tid og til lavere pris per prøve enn med det gamle identifiseringssystemet. Vi vil derfor foreslå oppfølgingsstudier på det materiale som allerede er innhentet, og som er oppspart både som enkeltisolat og som primærkultur der hele floraen fortsatt fins tilgjengelig.

Smoltproduksjon av laks foregår vanligvis ved temperaturer rundt 8-12°C og mikrofloraen i miljøet som omgir fisken, er tilpasset denne temperaturen. For å ta vare på bakterier med preferanse for denne temperaturen, og som kanskje ikke vokser ved 22 og 37°C, ble det ved SINTEF Fiskeri & Havbruk derfor isolert bakterier fra de samme vannprøvene ved å inkubere agarskålene med prøvene ved 10°C. Skålene ble dessuten inkubert i 20 dager for å ikke utelukke de saktevoksende artene i prøvene, før kolonier ble isolert. Kolonier ble isolert fra både Pseudomonas agar og Tryptic Soy agar, og det finnes nå en samling på 1200 isolater fra 10°C inkubering. Dette materialet er foreløpig ikke videre karakterisert, men siden samlingen representerer et økologisk riktig bilde av bakteriefloraen i smoltanleggene, kan det være av stor verdi å identifisere bakteriene for å avdekke hvorvidt det er forekomst av patogene bakterier eller andre problembakterier i anleggene.

I oppfølgingsstudiet foreslås det å kjøre en identifisering av disse 1200 isolatene. Dette forutsetter en high-through-put metode, og MALDI-TOF kan være et egnet verktøy til dette.

Den opplagte oppfølgingsstudien å starte med synes å være:

- Oppfølgingsstudie I - Kartlegge hvilke infeksjonsmikrober som har forårsaket infeksjonsutbrudd så langt
- Identifisering til artsnivå vha. Maldi-Tof av potensielle P. fluorescens i materialet fra sykdomsutbrudd i settefiskanlegg som er oppspart ved Veterinærinstituttet. Prosjektsamarbeid SINTEF og Veterinærinstituttet.
- Genotyping PFGE av samtlige fellesarter fra infeksjonsmaterialet

9 Referanser

Ahlén C, Mandal LH, Iversen OJ. (1998). Identification of infectious strains of *Pseudomonas aeruginosa* in occupational saturation environment. *Occup Environ Med* 1998; 55:480-484.

Ahlén C, Mandal LH, Johannessen, L, Iversen OJ. (2000). Survival of infectious *Pseudomonas aeruginosa* genotypes in occupational saturation environments and the significance of these genotypes for frequent skin infections. *Am. J. Ind. Med.* 2000; 37 : 493-500

Ahlén C, Mandal LH, Iversen OJ (2001). The Impact of Environmental *Pseudomonas aeruginosa* Genotypes on Skin Infections in Occupational Saturation Diving Systems. *Scand.J Inf Dis.*33; 413-419, 2001.

Ahlén. C, Mandal LH, Iversen OJ.(2003). An in-field demonstration of the true relationship between skin infections and their true sources in occupational diving systems in the North Sea. *Ann Occ Hyg.*, Vol 47. No3, pp227-233. 2003.

Aamer Ali Shah, Fariha Hasan, Abdul Hameed, Safia Ahmed (2008). Biological degradation of plastics: A comprehensive review . *Biotechnology Advances* 26 (2008) 246–265

Fiskehelse rapporten 2009. Helse situasjonen hos laksefisk 2009. Veterinærinstituttet.

Fiskehelse rapporten 2010. Helse situasjonen hos laksefisk 2010. Veterinærinstituttet.



Teknologi for et bedre samfunn

www.sintef.no

Vedlegg:

1. Prosjektbeskrivelse for forprosjekt: "Screening av mikrobiota i vanntilførsler til settefiskanlegg for laks og ørret med fokus på *Pseudomonas* sp."
2. Spørreskjema for innhenting av opplysninger om anleggene hvor vannprøver og biofilmprøver (svabere) er hentet.

Prosjektforslag

Screening av mikrobeflora i vanntilførsler til settefiskanlegg for laks og ørret med fokus på *Pseudomonas sp.*

VERSJON
Versjon 7

DATO
2011-03-21

MOTTAKER
Fiskeri og Havbruksnæringens Forskningsfond

MOTTAKERS REF.
Merete Bjørgen Schrøder

PROSJEKTNR
Prosjekt nummer

ANTALL SIDER OG VEDLEGG:
10

FORSLAG NR
Skriv forslag nummer

GYLDIG TIL
Velg dato

GRADERING
Åpen

MÅL

I dette prosjektet ønsker vi å foreta en screening av forekomst av *Pseudomonas*-bakterier i vanninntaket til så mange settefiskanlegg som mulig i Norge. På bakgrunn av dataene fra en slik screening, kan man vurdere utbredelse av bl. a. bakterien *Pseudomonas fluorescens* og få et bilde av mulig risiko som denne bakterien representerer.

STARTÅR	2011	SLUTTÅR	2011
ØKONOMISK RAMME STARTÅRET	300000	ØKONOMISK RAMME TOTALT	300000

PROSJEKTLEDER
Yngve Ulgenes, SINTEF Byggforsk, Vann og miljø

SIGNATUR

SIGNATUR

KONTROLLERT AV
Jorunn Skjerme, SINTEF Fiskeri & Havbruk

GODKJENT AV
Herman Helness

SIGNATUR

Innholdsfortegnelse

1	Prosjektets relevans for Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond.....	3
2	Innledning.....	3
3	Hypotese.....	5
4	Målsetting.....	6
5	Arbeidsbeskrivelse.....	6
6	Relevant kompetanse.....	7
7	Organisering.....	8
8	Kvalitetssikring.....	9
9	Tidsplan.....	9
10	Budsjett og finansiering.....	9

BILAG/VEDLEGG

[Skriv inn ønsket bilag/vedlegg]

1 Prosjektets relevans for Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond

I følge Forskningsfondets handlingsplanen er en av målsetningene i 2011 å bidra til å løse nye sykdomsutfordringer raskt. Dette prosjektet vil kartlegge forekomst av en sykdomsfremkallende *Pseudomonas fluorescens* og risiko for sykdom i norske settefiskanlegg.

2 Innledning og bakgrunn

Vannbårne bakterier som finnes i ferskvannskilder – dvs råvannstilførsler - til settefiskanlegg, har i ulik grad i seg potensialet for å skape problemer i settefiskproduksjon. Normalt har ikke de naturlige forekommende vannbakteriene noen merkbar negativ innflytelse på settefiskproduksjonen. Imidlertid har det lenge vært kjent at bakterier fra gruppen *Pseudomonas* kan spille en rolle spesielt ved gjelleinfeksjoner hos yngel av ørret og laks. Ved forekomst av infeksjoner der denne bakterien vurderes som årsak eller medvirkende årsak, har man gjerne på en noe uklar måte karakterisert vannmiljøet for fisken som dårlig. Hva som forstås med dårlig vannmiljø i denne sammenheng er gjerne diffust, men kan betegnes med en fellesbetegnelse som ”stressende miljø”. Eksempelvis kan dette henge sammen med at fisken har gjennomgått håndtering som gir fisken stor påkjenning, redusert appetitt med påfølgende økte mengder spillfôr osv . Infeksjoner av *Pseudomonas* vil i slike tilfeller gjerne bli sett på som sekundære årsak, der altså bildet er sammensatt.

Ifølge Veternærinstituttet (nyhet på kyst.no 25. januar 2011 og informasjon på nettsider) er det nå mistanke om at bakterien *Pseudomonas fluorescens* i mange tilfeller kan være primærårsak til infeksjon og dødelighet hos fisk i settefiskanlegg – dvs en aggressiv patogen bakterie. I løpet av 2010 var det i alt 11 settefiskanlegg hvor bakterien ble rapportert som primærårsak til massiv dødelighet. Risiko for utbrudd og dødelighet ser ut for å være størst i sammenheng med vaksinasjon. Det ser også ut for at det er spesielt virulente varianter av bakterien som skaper problemene.

Ved samtale med noen store aktører i oppdrettsnæringen, meddeler de at det ser ut for at anlegg som har hatt slik massiv dødelighet pga denne bakterien tidligere, har stor risiko for å få problemet igjen. Hvis dette er tilfelle, betyr det i praksis at den aggressive bakterien kan ha egenskaper som medfører at den representerer et kontinuerlig smittepress ved lokaliteter som har denne typen problemer. Det må i praksis bety at bakterien befinner seg et sted i anleggene eller i vannkilden.

Kontaktpersoner som er kontaktet i oppdrettsnæringen:

Klemet Steen, Lerøy – tlf 97032856

Bjarte Sævareid, Marine Harvest – tlf 90893518

Siden *Pseudomonas fluorescens* kan ventes å finnes over alt i norske vassdrag, kan man tenke seg at bakterien representerer en mer utbredt risiko for problemer i settefiskproduksjon enn tidligere antatt. Det må imidlertid også forventes at det kun er noen få varianter av bakterien som er årsak til problemene. Når problemet nå ser ut for å ha et relativt stort omfang på landsbasis, bør dette undersøkes nærmere. I første omgang vil vi undersøke vannprøver som samles inn fra mange

settefiskanlegg for å få en oversikt over forekomst av denne bakterien i vanntilførselen til disse anleggene.

SINTEF har jobbet i mer enn 25 år med ulike arter av *Pseudomonas*, deriblant også *Pseudomonas fluorescens*. Den opprinnelige grunnen til å arbeide med denne arten, var at den kan ha helt spesielle egenskaper innen bioteknologi mht produksjon av biopolymerer med ulike særegne kvaliteter.

Det er imidlertid en annen gren innenfor dette arbeidet som nå kan trekkes fram. Det er arbeidet mye med noe som kanskje kan vise seg å være en analog problemstilling til det man har i settefiskanleggene, nemlig hudinfeksjoner hos dypdykkere som arbeider i Nordsjøen. Dette var tidligere et meget stort problem, og svært ofte skyldtes disse hudinfeksjonene *Pseudomonas*. Hos dykkerne var det *Pseudomonas aeruginosa* som var årsak til plagene, mens det synes som *Pseudomonas fluorescens* er den som nå er problemet hos settefisk.

Da dette arbeidet ble startet opp i 1986, var fenomenet anerkjent som et stort problem ved metningsdykking over hele verden. Den felles forståelsen den gang var at det var dykkerne selv som bar med seg smitten ned i dykkerkamrene og spredte smitten der. Forebygging av infeksjoner var derfor fokusert på å forhindre at dykkere tok smitten med seg ned enten på kroppen eller med utstyr som ble brakt ned i dykkerkamrene.

Prøvetaking av dykkerne før og etter dykket viste imidlertid at de fikk smitten i selve dykkerkamrene, og at det var der smitekilden befant seg. Det betydde altså at man måtte finne ut hvor og hvordan denne bakterien overlevde i miljøet i dykkerkamrene.

Vann og miljøprøver ble tatt både fra miljøet inne i metningskamrene og i arbeidsomgivelsene/dykkersituasjon. Fra disse arbeidene kunne det allerede i 1987 dokumenteres rikelig forekomst av *P. aeruginosa* i vannsystemene ombord på dykkerskipene og også i oppvarmingssystemene for dykkeoperasjonene.

Men det var ikke ensbetydende med påvisning av *P. aeruginosa* at dykkerne fikk hudinfeksjoner. Manglende kobling mellom infeksjoner og påvisning av bakterien skyldtes at man ikke hadde gode nok verktøy for å bestemme ulike varianter av bakterier.

Datidens gullstandard for å relatere infeksjonstammer til miljøstammer var serotyping, men dette verktøyet var lite egnet i den aktuelle settingen da de aller fleste stammene var av samme serotype. Muligheten til å komme nærmere sannheten kom i 1995 da vi kunne etablere genetiske metoder (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE) som kunne skille mellom stammer/genotyper innenfor en og samme serotype. Retrospektive PFGE-studier på det oppsparte materialet fra 1986 og fremover viser at det er svært mange genotyper av *P. aeruginosa* i Nordsjøen. Det viste seg at det kun er noen svært få genotyper som forekommer i infeksjonene, og at disse gir infeksjon om og om igjen til tross for regelmessige desinfeksjonstiltak. Arbeidene er presentert i et doktorgradsarbeid fra 2003: Ahlén: "Skin infections in occupational saturation diving in the North Sea and the impact of the environment".

3 Hypotese

Vi har en hypotese om at infeksjonsbildet man ser i enkelte settefiskanlegg kan ha lignende natur som det man oppdaget i miljøet for dykkere i Nordsjøen. Dette kan bety at det kun er få genotyper av bakterien *P. fluorescens* som kan skape problemer for fisk, men at disse er representert med en kontinuerlig smittepool i form av bakteriepopulasjoner i biofilm som finnes i vannfordelingssystemet til settefiskanleggene.

Dette er kjernen i hypotesen: *P. fluorescens* er en vanlig vannlevende bakterie. Bakterien overlever i biofilm i vannrørene, og der er den meget godt skjermet mot de fleste vaske- og desinfeksjonstiltak som måtte settes inn. Bakterien adherer lett til PVC, og noen stammer kan også bruke PVC som karbonkilde. Den lever både i oksygenholdige (aerobe) og oksygenfrie (anaerobe) forhold og har derfor mulighet for å befinne seg i alle deler av vannsystemet. Patogenitet for bakterien kan oppstå i biofilmen fordi den der kan endre seg på ulike måter.

Settefiskanleggenes vannfordelingssystem består i hovedsak nettopp av PVC-rør. Ved mange anlegg har disse ikke vært skiftet eller rengjort siden anleggene ble startet. Bakteriens evne til å bruke PVC som "mat" og i tillegg være en del av biofilmen, kan bety at den dermed mer eller mindre kontinuerlig representerer en potensiell stor risiko for dødelighet. Hvis også fisken blir utsatt for stress (som ved vaksinerings) kan man da få massiv dødelighet.

Undersøkelser av vannprøver fra settefiskanlegg vil gi grunnlag for å vurdere riktigheten av hypotesen.

SINTEFs tidligere omfattende arbeid med den beslektede vannbakterien *P. aeruginosa* avslørte at ved å forhindre at denne bakterien lett kunne danne biofilm i dykkerkamrene, hadde man gjort mye av det forebyggende arbeidet. Dette innebar blant annet å se på materialvalg samt andre tekniske løsninger i dykkerkamrene for å holde biofilmen borte. I denne sammenheng ble alle vannsystemer og andre ting som bestod av PVC fjernet. Det var et meget viktig steg mot å få kontroll med de gjentatte Pseudomonas-infeksjonene!

Vår hypotese går ut på at det er en helt tilsvarende kobling mellom gjentatte problem i settefiskanleggene og systemtekniske forhold (herunder plastmaterialer i rørsystemer) i vannsystemene på settefiskanleggene som muliggjør vekst av bakterien i biofilm. Finner vi slike sammenhenger, kan det være at man med rent tekniske tiltak kan forhindre bakterien å etablere seg og skape et dødelig problem.

Siden biofilmen i vannsystemene også kan inneholde andre typer bakterier som er et gjentakende problem i noen anlegg, kan det være at denne hypotesen også er mer generell, men ikke nødvendigvis ha sammenheng med PVC som undrelagsmateriale for biofilmen. Vi vil derfor også lete etter bakteriene *Flavobacterium* sp i ferskvann og *Moritella* sp i sjøvann.

Forekomst av en patogen bakterie i et anlegg er ikke ensbetydende med utbrudd av sykdom. Stressende forhold i driften (f eks vaksinasjon og/eller sortering) vil alltid øke sannsynligheten for at man kan få negative ettervirkninger av slik håndtering. Vaksinasjon vil dessuten muliggjøre at infektive organismer introduseres i fisken gjennom selve stikksåret. Har man kombinasjonen av

den opportunistisk patogene typen *P. fluorescens* i vannsystemet og stress (f eks vaksinasjon) er sannsynligheten stor for problemer.

Denne vinklingen av problemstilling i forhold til patogene bakterier – dvs biofilmdannelse og eventuell kobling med uheldige materialer i vannsystemene - er helt ulik den man vanligvis ser i sykdomsforskning og vil være meget nyttig å undersøke. Dette med bakgrunn i den erfaringen som ble gjort for dykkere i Nordsjøen.

Hvis det er substans i denne hypotesen, må man i neste omgang vurdere målrettede tekniske tiltak som kan gi akseptabel kontroll med smitteproblemet i anleggene.

Kort formulert betyr dette:

- 1) Hvor i anlegget kommer smitten fra?
- 2) Hvorfor etablerer den seg?
- 3) Hvilke tiltak kan gjøres for å kontrollere problemet?

Foreliggende dokument er beskrivelse av et forprosjekt med mål å besvare pkt. 1 ovenfor. Det videre arbeidet med dette materialet vil bli koblet inn i et hovedprosjekt der man undersøker hva som ligger til grunn for etableringen av bakterien i systemene og evt bekjempelse av denne. Deler av denne koblingen er klar (se nedenfor) men mye av det videre arbeidet betinges av hva man finner i dette forprosjektet.

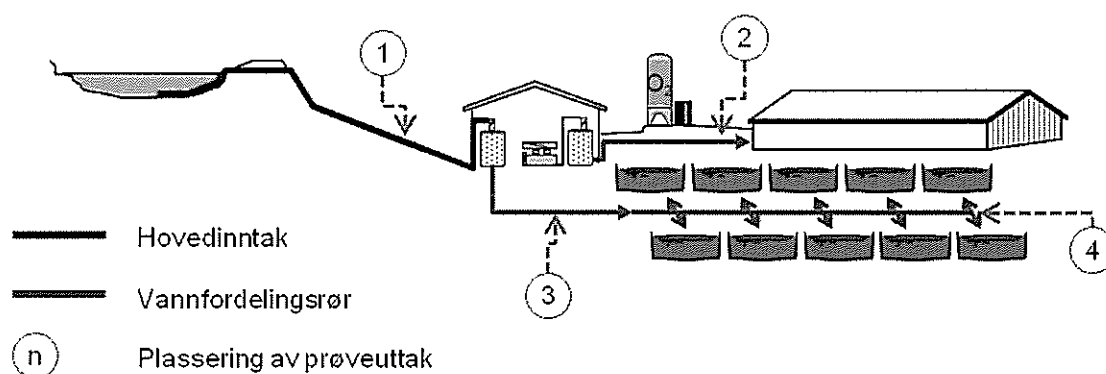
4 Målsetting

I dette prosjektet ønsker vi å foreta en screening av vannsystemene for forekomst av *Pseudomonas*-bakterier i så mange settefiskanlegg som mulig i Norge. På bakgrunn av dataene fra en slik screening, kan man vurdere utbredelse av *Pseudomonas fluorescens*, og få et bilde av mulig risiko som denne bakterien representerer. Også forekomsten av andre patogene bakterier vil kunne påvises i dette materialet.

5 Arbeidsbeskrivelse

Første del av denne screeningen vil bestå i innsamling av vannprøver fra flest mulig settefiskanlegg for produksjon av laks og ørret i Norge. Sammen med denne prøveinnsamlingen vil det bli registrert et sett av data som har sammenheng med vannkilden og hvordan vanddistribusjonen i anleggene er konstruert, samt om det er opplysninger om mulige forekomster av problemer som kan tilskrives bakterier i vannkildene.

Vannprøver for bakteriologisk analyse må tas ut etter en strengt fastlagt prosedyre for at de skal være representative og gi pålitelige data mht bakterieinnhold. Selve prøveinnsamlingen vil derfor bli gitt mye fokus og vil kreve relativt mye ressurser i prosjektet. Vi må i tillegg til å foreta noe av innsamlingen selv, også få hjelp av kompetent personell som er tilknyttet settefisknæringen til å gjøre dette arbeidet.



Figur 1. Skisse av settefiskanlegg med punkter for prøveuttak.

Hvor i anleggene uttak av vannprøver skal skje, må avgjøres i hvert enkelt tilfelle. Som hovedprinsipp vil det bli tatt ut prøver fra vannrør som kommer direkte fra vannkilden samt et sett av prøver som velges fra distribusjonsnettet for vann i anleggene. Antall prøver fra hvert anlegg kan variere, men vil normalt ligge i området 2 – 4. Vannprøvene tas på spesielt behandlede flasker og oppbevares kjølig før sending til laboratoriet.

Figur 1 angir i prinsippet hvor vannprøvene vil bli hentet fra i settefiskanleggene.

Vannprøver vil bli analysert mhp forekomst av *Pseudomonas*-arter, samt *Flavobacterium* og *Moritella* i den grad det lar seg gjøre ut fra ressurser i prosjektet. Forekomst av *P. fluorescens* vil bli fulgt opp med genotyping.

Resultatene fra bakterieanalyser vil siden bli sammenholdt med innsamlede data om vannkilder og vannfordelingssystem i de anleggene vannprøvene er tatt fra, samt med data om den patogene *P. fluorescens* fra Veterinærinstituttet. Det er gjort avtale om å få oversendt virulent referansebakterie av *P. fluorescens* fra VI. Så kan man gå videre med undersøkelser i de anleggene der det er mistanke om fiskedødelighet som kan tilskrives bakterier i vannsystemet.

Dataene vil danne grunnlag for vurderinger av substans i arbeidshypotesen om at det er spesielle forhold mht konstruksjon og materialvalg i inntaks- og fordelingssystemet for vann som kan tilskrives spesielle infeksjonstilfeller av virulent bakterie. I denne sammenheng kan man videre vurdere om det med tekniske tiltak er mulig å forebygge mot gjentatte infeksjoner av *Pseudomonas fluorescens*.

6 Relevant kompetanse og kobling mot hovedprosjekt

Foruten dette avsnittet henvises til beskrivelsen gitt i innledningen.

I et konsernsatsingsprosjekt i SINTEF 2008-2011: SINTEF Konsernsatsing "Industriell Biovitenskap – Biofilm" og prosjektet: "En systembiologisk tilnærming til forståelse av mikrobielle prosesser i biofilmer", med tre SINTEF-institutter som deltakere, er miljø- og infeksjonsstammene av *P. aeruginosa* fra Nordsjø-biobanken modellorganismer. I inneværende år

blir våre eksperimentelle biofilm-system utvidet med organismer fra havbruksrelaterte problemstillinger og der *P. fluorescens* ville være en meget naturlig kandidat.

SINTEF Materialer og kjemi, avd. Bioteknologi har i samarbeid med NTNU arbeidet med *Pseudomonas fluorescens* i mer enn 20 år. Arbeidet med denne organismen startet fordi den bl a er interessann i sammenheng med syntese av spesielle biopolymerer. En fullstendig modell av metabolismen er til denne bakterien er nå tilgjengelig. Dette bakgrunns materialet vil også bli meget viktig i en videreføring av dette prosjektet knyttet til akvakultur.

7 Prosjektets forventede nytteverdi

Prosjektet omhandler et tema som representerer en betydelig risiko ifm produksjon av settefisk av laks og ørret – nemlig infeksjoner som følge av vanlig forekommende vannbakterier. Varianter av *Pseudomonas fluorescens* har vist seg å være en slik risiko.

Prosjektet tar utgangspunkt i en grunnleggende hypotese om at bakterien finnes i biofilm i vannsystemet (vannkilde og rørsystem), og at den her kan befinne seg som en mer eller mindre konstant kilde til smitte i anlegget. Kunnskap om bakterienes tilholdssted og overlevelse i miljøet, kan gi oss muligheter for å bekjempe og forebygge mot eventuelle infeksjoner av vannbakterier sannsynligvis uten bruk av vaksine. Kunnskapen som prosjektet frembringer, kan også tenkes å ha overføringsverdi til andre vanlig forekommende vannbakterier som kan medføre smitterisiko.

8 Organisering

Prøvetakingen i dette forprosjektet vil planlegges og utføres av Byggforsk v/ Yngve Ulgenes og F&H v Jorunn Skjermo i samarbeid med den aktuelle industrien.

De mikrobiologiske analysene av vannprøvene vil utføres ved SINTEF Teknologi og samfunn v. Catrine Ahlen.

Referansegruppe for forprosjektet:

- Klemet Steen, Lerøy Midnor AS og Lerøy Hydrotech AS
klemet.steen@midnor.com , tlf 97032856
- Bjarte Sævareid, Marine Harvest Norway AS
bjsa@marineharvest.com, tlf 90893518
- Renate Johansen, Veterinærinstituttet,
Renate.johansen@vetinst.no, tlf 23216136

Et framtidig hovedprosjekt vil omfatte videreføring av analysene av vannprøvene, til å omfatte kartlegging av andre patogene bakterier av analysene, studier av *P. fluorescens* i biofilm og tiltak for å redusere biofilmrelaterte problemer i settefiskanlegg. Til å utarbeide og gjennomføre hovedprosjektet, samt bidra i dette prosjektet, er det dannet en prosjektgruppe med representanter fra kompetansemiljøene ved SINTEF, hvorav tre miljøer deltar i Biofilm-prosjektet beskrevet under pkt 6:

SINTEF Teknologi og samfunn, Helse:	Catrine Ahlen (Prosjektleder Biofilmprosjektet)
SINTEF Byggeforsk, vann og miljø:	Yngve Ulgenes
SINTEF Fiskeri og havbruk:	Jorunn Skjermo og Stine Wiborg Dahle (Biofilm)
SINTEF Materialer og kjemi:	Inga Marie Aasen, Anne Tøndervik m.fl.(Biofilm)

9 Kvalitetssikring

Prosjektets kvalitetssikring baseres på SINTEF-gruppens kvalitetssikringssystem som beskrevet i SINTEF-gruppens Kvalitetssikringshåndbok.

Prosedyrer som er relevante for å sikre en forsvarlig gjennomføring vil bli benyttet.

10 Tidsplan

Vannprøver må innhentes fra settefiskanleggene så snart prosjektet kan startes opp. Varighet for dette innsamlingsarbeidet anslås til 30 – 40 dager og må foregå på flere steder samtidig. Bearbeiding av vannprøver og analyser av bakteriologi vil bli gjort parallelt under innsamlingen og beregnes til å ta ca 3 måneder.

Til å bistå i bearbeiding av innsamlede vannprøver, vil man leie student er tilknyttet SINTEF Helse. De vil da under kyndig veiledning få nyttig opplæring og erfaring i bearbeiding av prøvemateriale av denne typen. Denne bistanden i prosjektet vil ikke ha noen innvirkning på kostnader i dette forprosjektet.

Total varighet for forprosjektet vil bli i overkant av et halvt år fra oppstart.

Vannprøvene bør innhentes før man får oppblomstring i vassdragene som følge av temperaturstigning i mai. Tidlig vannprøvetaking sammen med at man må få bistand fra studenter i bearbeiding av prøver, gjør at rask vurdering av mulig finansiering av projektrammen er derfor meget viktig. Med de gitte forutsetningene er tidsplanene:

Startdato: 21. mars 2011.

Sluttdato: 15. desember 2011.

Milepæler/leveranser:

15. juni 2011:	Statusrapport mht framdrift i prosjektet
10. oktober 2011:	Ferdig bearbeidede data – statusrapport.
15. desember 2011:	Rapport, Faktaark

11 Budsjett og finansiering

Direkte kostnader for dette forprosjektet er 300 000,- kr, med

Innhenting av vannprøver og grunnlagsdata fra anlegg:	175 000,-
Analyser og databearbeiding:	75 000,-
Presentasjon av resultater og rapport:	50 000,-

I tillegg kommer egenfinansiering i form av støtte fra Biofilm-prosjektet på SINTEF. Dette sikrer oppstarten av prosjektet og tilgang på analyseverktøy, samt en videre bearbeiding av prøvetakingsmaterialet; dvs mer enn det som dekkes av et forprosjekt. Biofilm-prosjektet sikrer dessuten at en større kompetansegruppe kan delta i prosjektet og dermed høy faglig kvalitet på arbeidet.

Se for øvrig tabell med oppsatt budsjett i tabellform nedenfor.

Deltaker	År	Tilskudd	Egeninnsats	Lønnskost.	Reisekost.	Andre kost.	Kommentarer
FHF	2011	300					
SINTEF F&H	2011		600	600	0	0	<i>Egeninnsats:</i> Verdi på SFH's aktivitet finansiert av SINTEF's konsernsatsning Biofilm/Systembiologi. <i>Lønnskost.:</i> 110 timer Forsker 1 (timepris kr 1795), 250 timer Forsker 2 (timepris kr 1625)
SINTEF Teknologi og samfunn	2011		200	200			Verdi på aktivitet finansiert av SINTEF's konsernsatsning Biofilm/Systembiologi. <i>Lønnskost.:</i> 110 timer, timepris 1810,-
SINTEF Materialer og kjemi	2011		200	200			Verdi på aktivitet finansiert av SINTEF's konsernsatsning Biofilm/Systembiologi. <i>Lønnskost.:</i> 110 timer, timepris 1810,-
SINTEF Byggforsk	2011			240	50	10	"Andre kostnader" er knyttet til innkjøp av utstyr for prøvetaking. Timepriser forsker 1 Byggforsk: lønnskost: 145 timer, timepris 1650,-
Sum		300	1000	1240	50	10	

Forekomst av bakterien *Pseudomonas fluorescens* i settefiskanlegg.

Innsamling av vannprøver og opplysninger om vannkilde og vannforsyningsystem i settefiskanlegg.

NB! Alle opplysninger som gis i denne sammenheng skal behandles konfidensielt. Data fra undersøkelsen skal anonymiseres i sammenheng med rapportering.

Bakgrunn.

SINTEF har fått midler fra Fiskeri og havbruksnæringens Forskningsfond (FHF) til å undersøke forekomst av *Pseudomonas*-bakterier i vann som brukes i settefiskanlegg. En kort beskrivelse av prosjektet kan dere finne på FHF's hjemmesider (www.fiskerifond.no).

Bakterien *Pseudomonas fluorescens* er en vanlig forekommende vannbakterie som vi antar finnes i de aller fleste vannkilder til settefiskanlegg i Norge. Normalt anses bakterien som ufarlig, og den skaper ikke noen problemer for drift av anleggene, men det finnes unntak.

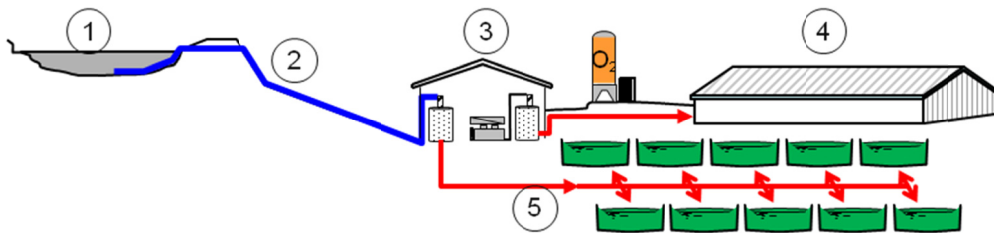
Bakterien kan i enkelte settefiskanlegg skape gjentatte infeksjoner på yngel og smolt med påfølgende stor dødelighet. Dette kan man bl. a. lese om i nyhetsoppslaget på www.kyst.no den 25. januar i år (http://www.kyst.no/index.php?page_id=54&article_id=90409). Det er sannsynligvis bare enkelte varianter av bakterien som er forbundet med slike problemer. Det nye i situasjonen er at bakterien nå kan mistenkes å være en større plage enn hva man tidligere har antatt.

Gjennom et prosjekt der vi ønsker å registrere forekomst av denne bakterien i norske settefiskanlegg, vil vi samle inn vannprøver fra anleggene og analysere disse for innhold av bakterien. Det er den potensielt farlige varianten av bakterien *Pseudomonas fluorescens* vi er på leting etter.

Ved anlegg som har hatt erfaring med den farlige varianten av bakterien, har man gjerne gjennomført spesifikke tiltak for å forhindre at det oppstår lignende problemer senere. Dette kan bestå i ekstra vask og desinfeksjon av rørsystemer samt kar og avløp. Ved mange anlegg har man imidlertid aldri spylt vannforsyningsystemene; simpelthen fordi man ikke ser behovet - eller kanskje verre – fordi man ikke kjenner behovet. Ved gjennomføring av en slik registrering av denne bakterien i vannprøver fra anlegg, kan vi bedre få en pekepinn om bakterien representerer en risiko og eventuelt hvilke tiltak man kan sette inn.

I sammenheng med denne innhenting av vannprøver fra anlegg, ber vi dere også om en del tekniske opplysninger som kan være til hjelp i vurderingen av resultatene fra analyser av vannprøvene.

Skissen av et settefiskanlegg viser i prinsippet hvordan vi deler inn de ulike delene av rørsystemet. **Vi ønsker vannprøver fra punktene 1, 2,4 og 5 (se nedenfor) - i alt 4 prøver fra hvert anlegg.**



Skisse av settefiskanlegg.

1. Vannkilde (elv, innsjø eller grunnvann)
2. Hovedvannledning fra vannkilde til anlegg
3. Avdeling for behandling av vann (f eks lufting / oppvarming etc). Kan være eget hus eller rom i hovedanlegget
4. Hus for klekkeri og startforing. Mellom vannbehandling og klekkeri/startforing er et rørsystem angitt med rød strek.
5. Uteavdeling for påvekst. Mellom vannbehandlingsavdeling og uteavdeling går et rørsystem angitt med rød strek og fordeling til hvert kar.

Anleggets utforming trenger ikke stemme med den skissen som er angitt her, men den angir prinsippene for vannforsyning mellom vannkilden og karene i anlegget.

Kontaktpersoner

Yngve Ulgenes
SINTEF Vann og miljø
7465 Trondheim

yngve.ulgenes@sintef.no

Tlf: 73592381
Mob: 92422713

Jorunn Skjermo
SINTEF Fiskeri og havbruk
7465 Trondheim

jorunn.skjermo@sintef.no

Mob: 98245040

Spørsmål i sammenheng med screeningen:

Anleggets navn: _____

Konsesjonsnr.: _____

Kontaktperson i anlegget: _____ Mob.nr: _____

A. Type vannkilde som forsyner anlegget med vann.

- Innsjø, elv, grunnvann, annet (hvis annet, hva _____)
- Inntaksdybde _____ meter
- Vannkildens nærhet til sjø (ca meter) _____
- Virksomhet i vassdragets nedslagsfelt (jordbruk, industri, bebyggelse, annet _____)

B. Vannkvalitet i vannkilden

- pH _____
- humusfarge(evt TOC) _____
- alkalitet (der man har målt det) _____

C. Hovedvannledning til anlegget

- Type rør (polyetylen (PE), polypropylen (PP), PVC, annet (hva? _____))
- Er vannledningen noen gang rengjort eller spylt _____
- Alder på vannledningen _____
- Evt spyling/vasking av hovedrørene (når ble det foretatt sist) _____

D. Vannbehandlingsrom

- Er det luftebasseng i eget vannbehandlingsrom? _____
- Evt hvilke avdelinger i anlegget får vann fra et slikt vannbehandlingsrom?

E. Vannfordelingsrør i anlegget (fra evt vannbehandlingrom til de ulike avdelingene)

- Type rør (polyetylen (PE), polypropylen (PP), PVC, annet (hva? _____))
- Alder på rør _____
- Er det gjennomført spyling/vasking av rørsystemet? _____

F. Oppdrettskar og avløp

- Materiale i kar _____
- Materiale i avløpsrør _____

G. Forekomst av infeksjoner som kan være forårsaket av vannbakterier

- Pseudomonas, Flavobacterium, andre? _____
- I hvilken sammenheng oppstår problemene? _____
- Har problemet oppstått flere ganger? _____
- I hvilken del av året oppstår (vanligvis) problemet? _____
- Eventuelle tiltak som er gjennomført? _____

