

# Aeromonas spp. som indikatorbakterie for ozonbehandling av inntaksvann til settefiskanlegg.

Av Erik Wahl

Erik Wahl er veterinær og ansatt ved Næringsmiddelkontrollen i Trondheim

## Sammendrag

Når inntaksvann til settefiskanlegg desinfiseres, er det behov for å kontrollere effekten av dette bl.a. ved hjelp av bakteriologisk indikator. For anlegg som bruker ozon anvendes i dag indikatormetoden *totalkim*. Denne metoden har imidlertid store svakheter. Artikkelen beskriver en undersøkelse med formål å utprøve alternative bakteriologiske indikatormetoder.

I første del av undersøkelsen ble 17 ulike medier/metoder utprøvd på inntaksvann fra ett settefiskanlegg. Prinsippet bestod i å registrere bakterieinnhold i inntaksvann før og etter ozonering og beregne %-vis reduksjon av bakterieinnhold for hver enkelt metode. Resultatene ble vurdert i forhold til bestemte generelle kriterier for indikatorbakterier. Metoden *Aeromonasmedium m/supplement/ 37 °C/ grønne kolonier* kom ut som beste metode med 98,9 % reduksjon.

I andre del av undersøkelsen ble denne ene metoden testet på inntaksvann fra 4 settefiskanlegg. Det ble fun-

net varierende %-vis reduksjon. I undersøkelsens andre del ble også utplukkede bakteriekolonier, som vokste på dette mediet, diagnostisert på artsnivå. Det ble funnet relativt homogen oppvekst dominert av arter innen *genus Aeromonas*.

Konklusjonen er at metoden *Aeromonasmedium m/supplement/ 37 °C/ grønne kolonier* som indikatormetode for ozonering er den beste av de undersøkte metodene, og at den er vesentlig bedre enn metoden kimtall.

## Summary

**Aeromonas spp. as indicatorbacteria used for ozone disinfection of the inlet water to fishfarms.** When the inlet water of fishfarms is disinfected, the effect should be monitored, among other methods, by means of a bacteriological indicator. For fishfarms using ozone as disinfectant, the method *total viable count* is presently used as indicator method. This method has however big disadvantages. A survey is conducted

with the purpose to test alternative bacteriological indicator methods.

In the survey's first part, 17 different media/methods were tested on inlet water collected from one fish farm. The principle used was, for each one of the tested methods, to record bacterial count in inlet water, prior to -, and following ozone treatment; and then to calculate the per cent reduction of bacterial count. Results were validated against defined general criteria of indicator bacteria. The method *Aeromonas* medium/with supplement/37 °C/green colonies proved to be the best method showing 98,9 % reduction.

In the survey's second part this one method was tested on inlet water collected from 4 fishfarms. Perc cent reduction recorded varied between the different fishfarms. In the survey's second part, bacterial colonies selected from this media were also diagnosed on species-level. Colonies proved to be relatively homogenous, dominated by species within the genus *Aeromonas*.

The conclusion is that *Aeromonas* medium/with supplement/ 37 °C/green colonies is the best one among the methods tested in this survey, and that this method is far better than the method *total viable count*.

## Innledning

Settefiskanlegg for laks trenger store mengder ferskvann. Dersom inntaksvann til slike anlegg tas fra vassdrag med oppgang av laksefisk, vil dette medføre stor smitterisiko. For å begrense denne risikoen kreves det i For-

skrift om desinfeksjon av inntaksvann til og avløpsvann fra akvakulturrelatert virksomhet (§10.1) at inntaksvannet desinfiseres slik at *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* reduseres med 99,9% (1). Denne bakterien er årsak til den svært smittsomme og tapsbringende laksesykdommen furunculose, en sykdom som oppdrettsnæringen og offentlige myndigheter bruker svært store ressurser på å beskytte seg mot.

I Norge er det de to metodene UV-bestråling og ozonering som har vært benyttet som desinfeksjon for dette formål. En grunn til å velge ozon framfor UV-bestråling som desinfeksjonsmiddel er at IPN-virus (årsak til laksesykdommen Infeksiøs Pankreas Nekrose ) er forholdsvis resistent mot UV-bestråling (2). Det er (pr. des 1995) 4 settefiskanlegg i Norge som har ozoneringsanlegg for inntaksvann.

Den nevnte forskrift stiller videre krav om at det skal foretas analyser som dokumenterer desinfeksjonseffekt (§ 14). På grunn av at de aktuelle patogene mikrobenes normalt ikke finnes i inntaksvann, kan en ikke analysere direkte mhp disse; en er avhengig av å bruke indikator (indikatorbakterie).

Hittil er det parameteren kimtall v/20 °C som har vært bruk som indikator til dette formålet. Næringsmiddeltilsynet i Orkdalsregionen har foretatt slike kimtalls-analyser av inntaksvann til settefiskanlegg (før og etter ozonering) over en periode på 3 år. Her har en funnet gjennomsnittlig %-vis reduksjon på bare 96,4 %; altså vesentlig mindre reduksjon enn forskriftens krav.

Parameteren kimtall omfatter et uoversiktlig mangfold av mikroorganismer, og med stor variasjon i ozonfølsomhet. Disse forhold tilsier at denne parameteren er dårlig egnet som indikator på desinfeksjonseffekt. En har altså i dag ikke egnet analysemetode for å oppfylle dette kravet i forskriften. En antar at dette må føles som en uheldig situasjon både for forvaltningsmyndighet og oppdrettsnæringen. Det er dermed behov for å utvikle et mer spesifikt indikatorsystem til dette formålet.

Så langt en kjenner til (bl.a. etter litteratursøk i databaser ved Norges Veterinærhøgskole, biblioteket) har en ikke funnet at det hittil er utviklet noen spesiell indikatorbakterie for å kontrollere effekt av ozonbehandling av ferskvann til settefiskanlegg. Storset har prøvd ut Vibriobakterier som indikator for UV-desinfeksjon av sjøvann (7). Han konkluderer med at dette er en egnet metode for sjøvann. Denne metoden vil imidlertid ikke være brukbar på ferskvann fordi Vibriobakterier ikke forekommer i tilstrekkelig antall i ferskvann.

Næringsmiddeltilsynet i Orkdalsregionen har i samarbeid med NIVA gjennomført et prosjekt med sikte på å utvikle en egnet indikatorbakterie for å kontrollere effekt av ozonbehandling av inntaksvann til settefiskanlegg. Denne undersøkelsen kan sees på som en parallell for ferskvann til det Storset har gjort for sjøvann

I henhold til generell teori for indikatorbakterier (3), ble det i dette prosjektet valgt å formulere følgende 5 krav til slik indikatorbakterie:

1. Bakterien må være til stede i de aktuelle vannkilder i et så stort antall at påvisning blir rimelig enkel (dvs > 1/ml)
2. Bakterien må kunne la seg påvise relativt enkelt i rutinediagnostikk, kommersielle medier bør være tilgjengelig.
3. Metoden bør avspeile en spesifikk taksonomisk gruppe på f.eks. genus-nivå; eller være veldefinert på andre måter (f.eks. etter funksjonelle egenskaper)
4. Bakterien bør ha en %-vis reduksjon etter ozonering som er i samme størrelsesorden som forskriftens krav til reduksjon av *A. salmonicida. subsp. salmonicida*.
5. Bakterien bør ha følsomhet for ozon som er mindre eller lik ozonfølsomheten til *A. salmonicida. subsp. salmonicida*.

Målsetningen for prosjektet var å finne en indikatorbakterie for ozonering av inntaksvann til settefiskanlegg som i størst mulig grad møter disse kravene.

## **Materiale og metoder**

Undersøkelsene ble foretatt i to deler:  
Del A: screeningtest av mange metoder  
Del B: videre utprøving av beste metode fra del A

### **Materiale og metode, del A, screeningstest: utprøving av 17 medier/metoder.**

I denne delen av undersøkelsen ble vannprøver hentet inn fra ett av settefiskanleggene med ozonering av inntaksvann (benevnt som anlegg 1).

Prøveinnhenting foregikk i perioden 06.07.1995 - 25.10.1995.

Hver prøveserie bestod av råvann og ozonert vann, begge som parallellprøver. Prøveinnhenting for øvrig ble foretatt i samsvar med NS 4789: Prøvehenting for bakteriologisk undersøkelse av drikkevann. (4). Prøveflasker for ozonert vann var på forhånd tilsatt 0,1 % tiosulfat. Tid fra prøvetaking til analysestart var max 4 timer.

Prøvene ble analysert på i alt 17 medier/metoder med sikte på å registrere %-vis reduksjon etter ozonering for de respektive bakterier / bakteriegrupper. Av tabell I framgår det hvilke medier, inkubasjonstid og -temperatur samt avleste kolonityper som inngikk i de 17 metodene.

For følgende medier/metoder ble det foretatt 2 prøveserier:

- Mac Conkey agar
- Kings Agar B
- *Aeromonas medium m/ampicillin-supplement*

For de øvrige medier/metoder ble det foretatt bare en prøveserie.

All utsæd ble gjort etter membranfiltermetode (5). Det ble brukt membranfilter med porediameter 0,45µm. Følgende volum ble filtrert:

- Råvann: 10 og 100 ml (for Kings Agar B; i tillegg også: 1,0 ml)
- Ozonert vann: 100 og 500 ml

Det ble videre foretatt gramfarging/mikroskopering og oksidasetesting av et representativt utvalg av typiske kolonier. Dette ble gjort for å fastslå i hvor stor grad floraen som vokste opp var homogen.

## **Materiale og metode, del B: videre utprøving av den beste metoden fra del A**

I undersøkelsen del B ble det innhentet prøver fra alle 4 settefiskanlegg i Norge med ozonbehandling av inntaksvann. Anleggene er benevnt 1 - 4. (Dette inkluderte altså anlegg 1 som inngikk i undersøkelsens del A) Prøveinnhenting foregikk i perioden 28.11. 1995 - 05.12.1995. I denne delen ble det hentet inn bare en prøveserie fra hvert av de 4 anleggene.

Tid fra prøveinnhenting til analysestart var max 24 timer. For øvrig ble prøvehenting og utsæd gjennomført som beskrevet under del A.

På bakgrunn av resultatene fra del A ble prøvene i del B undersøkt bare etter metoden *Aeromonasmedium m/supplement / 37°C/ grønne kolonier*.

Et representativt utvalg av grønne kolonier fra dette mediet ble diagnostisert videre på følgende måte:

- gramfarging/mikroskopering
- oksidasetesting

Kulturer som viste seg å være gram +, oxidase + stavbakterier ble testet videre på testsystemet API 20 NE (testsysteem inrettet mot oxidase+, gram+, stavbakterier)

Utplukkete kolonier fra denne delen av undersøkelsen (bare fra *Aeromonasmediet*) ble sendt til NIVA for testing for ozonfølsomhet.

## **Resultater**

### **Del A: resultater fra screeningtest**

Resultater fra undersøkelsens del A; screeningtest er oppført i tabell I. Der

**Tabell 1. Metoder og resultat, screeningtest av 17 metoder.**

Medium/metode	Koloni-typer avlest	Resultat, CFU/100ml		% -vis reduksjon
		råvann	ozonert	
Mac Conkey agar (Oxoid), (6) 20 °C, 3 døgn	transparente	535	6	98,9
	røde	12	0	100
Pseudomonas agarbase med CFC-supplement (Oxoid), (6) 20 °C 3 døgn	alle kolonier	320	17	94,7
	fluorescerende	107	1,5	98,6
Kings Agar B (NS 4713) 20 °C, 3 døgn	fluorescerende	11.000	536	95,1
Aeromonasmedium uten supplement (Oxoid), (6) 20 °C, 3 døgn	grønne	21	1,4	93,3
	gule	47	0,6	98,7
	ufargete	0	5	-
Aeromonasmedium uten supplement (Oxoid), (6) 30 °C, 1 døgn	grønne	119	2,5	97,9
	gule	3	0	100
	ufargete	19	100	-
Aeromonasmedium uten supplement (Oxoid), (6) 37 °C, 1 døgn	grønne	280	200	28,6
	gule	5	0	100
	ufargete	180	100	44,4
Aeromonasmedium med supplement (Oxoid), (6) 37 °C, 1 døgn	grønne	90	1	98,9
	gule	1	1	94,1
	ufargete	45	15	66,7

hvor det er foretatt 2 serier er det i tabellen oppgitt gjennomsnitt av resultatene for disse 2 seriene.

Gramfarging og oxidasetesting av et representativt utvalg av kolonier fra de enkelte mediene ga følgende resultat: Mac Conkey agar:

Heterogen gram+ flora

Pseudomonas-agar og Kings Agar B:

Her var det sterk overvekst av ikke-fluorescerende kolonier. Det lot seg ikke gjøre å isolere rene fluorescerende kolonier; videre diagnostikk av fluorescerende kolonier var derfor ikke mulig.

Aeromonas medium:

Kolonier fra dyrking *uten ampicilinsupplement*: (20, 30 og 37 °C; grønne, gule og ufargete kolonier) ga alle et heterogent bilde sammenlagt av:

\* trådformete gr+ staver

\* gr+, oxidase+ staver

\* gr+, oxidase+ staver

Kolonier fra dyrking med *ampicilinsupplement*; gule og ufargete kolonier ga en likende heterogen gr+ flora.

Kolonier fra dyrking med *ampicilinsupplement*, grønne kolonier viste derimot et forholdsvis homogent bilde dominert av gr+, oxidase+, stavbakterier.

### Del B: Resultater fra videre utprøving av beste metode fra del A

I undersøkelsens del B ble metoden Aeromonasmedium m/supplement/ 37 °C/ grønne kolonier utprøvd på vann fra alle 4 settefiskanlegg med ozonbehandling av inntaksvann.

Resultatene herfra er oppgitt i tabell II.

**Tabell II. Resultat, Metoden Aeromonasmedium m/supplement/ 37 °C/ grønne kolonier utprøvede på vann fra 4 anlegg.**

Anlegg nr	Resultat CFU/100 ml		
	råvann	ozonert	%-vis reduksjon
1	7,2	0,08	98,9
2	29	0,33	98,9
3	7,7	0,58	92,5
4	0	0	-

Det ble videre gjort et tilfeldig utvalg på 11 kolonier fra denne dyrkingen (alle 4 anlegg var representert i utvalget). Fra disse koloniene ble det foretatt videre

diagnostikk med følgende resultat: alle kulturene var gr+, oxidase+ stavbakterier.

Disse 11 koloniene ble testet videre

på testsystemet API 20 NE med følgende resultat:

- 7 kolonier ga svar: genus *Aeromonas*; species fordelte seg slik:
  - A. hydrophilia*: (5 kolonier)
  - A. sobria*: (1 koloni)
  - A. salmonicida*: (1 koloni)
- 1 kolonier ga svar: genus *Vibrio*
- 3 kolonier ga svar genus *Vibrio*/*Aeromonas* (kunne ikke skille mellom disse genera).

## Diskusjon

Ved utvalg av metoder som skulle testes i screeningdelen tok en utgangspunkt i bakteriegrupper som normalt er til stede i naturlig, ubehandlet overflatevann, og valgte selektive/indikative metoder tilpasset disse bakteriegruppene:

- Enterobakterier: Mac Conkey agar
- *Pseudomonas*: Kings Agar B
- *Aeromonas*: *Aeromonas*medium

Resultatene fra undersøkelsens del A, screening viser at følgende medier/metoder ga %-vis reduksjon etter ozonering på > 98%:

- Mac Conkey agar
- *Pseudomonas* agar/fluorescerende kim
- *Aeromonas* medium/ uten supplement/ 20 °C/ gule kolonier
- *Aeromonas* medium/ uten supplement/ 30 °C/ grønne kolonier
- *Aeromonas* medium/ uten supplement /37 °C/gule kolonier
- *Aeromonas* medium/ med supplement/ 37 °C/ grønne kolonier

Alle disse metodene har bedre %-vis reduksjon enn indikatormetoden kimtall 20 °C (96,4%)

Av disse metodene var det likevel bare én metode som viste homogen oppvekst av bakterier: metoden *Aeromonas*medium *m/supplement/ 37 °C/ grønne kolonier*. De øvrige metodene ga heterogen oppvekst. Dette var grunnen til at en i undersøkelsens del B valgte å gå videre med bare denne metoden.

Resultater fra undersøkelsens del B viste varierende %-vis reduksjon for metoden *Aeromonas*medium *m/supplement/ 37 °C/ grønne kolonier*. Det ble funnet sterk reduksjon (98,9%) på prøver fra to anlegg (nr 1 og 2), og lav reduksjon (92,5%) på prøven fra ett anlegg (nr 3). Fra ett anlegg (nr 4) ble det ikke funnet vekst i det hele tatt på dette mediet.

Videre diagnostikk av kolonier fra metoden *Aeromonas*medium *m/supplement/ 37 °C/ grønne kolonier* viste dominans av bakterier innen genus *Aeromonas*. Dette skyldes trolig at supplementet, ampicillin, hemmer det meste av gram+ flora med unntak av bakterier innen genus *Aeromonas* (8).

Undersøkelsen som er referert her ble utført ved Næringsmiddeltilsynet i Orkdalsregionen, og var en del av et NIVA-prosjekt. En annen del av dette NIVA-prosjektet gikk ut på å teste en del av de isolerte koloniene fra *Aeromonas*mediet for ozonfølsomhet. Denne delen av prosjektet ble utført ved Fiskehelselaboratoriet ved Havbruks-tjenesten i Tromsø. Kulturur fra 13 kolonier ble testet, i tillegg også en laboratoriestamme av *Aeromonas salmonicida* *subsp. salmonicida*. Resultatene fra undersøkelsene foretatt ved

Havbrukstjenesten er beskrevet utfyllende i den aktuelle NIVA-rapporten (8). Resultatene viste at 12 av de 13 kulturene isolert fra undersøkelsens del B hadde lik eller høyere ozonfølsomhet enn den aktuelle stammen av *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. Dette er ikke optimalt med tanke bruk av de testede kulturene som indikator. Deres overlevelsessevne burde være noe høyere enn overlevelsesgraden til den patogene målmikroben (*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*); jfr nr 5 av de oppførte krav for indikatorbakterier.

Resultatene fra foreliggende undersøkelse må vurderes med stor forsiktighet; først og fremst på grunn av følgende usikkerhetsmoment:

- Det er foretatt svært få prøver/serier; eventuelle variasjoner mellom f.eks. årstid og mellom vannkildetype er ikke vurdert
- Der det er foretatt flere serier for samme metode, forekommer det til dels stor variasjon mellom resultat innen den enkelte metode
- For noen av de utprøvde metodene var avlesning og videre diagnostikk vanskelig

Av de utprøvde metodene er det åpenbart at *Aeromonasmedium m/supplement/ 37 °C/ grønne kolonier* er den metoden som i størst grad imøtekommer de 5 oppførte kravene til god indikatormetode for testing av ozonerings-effekt; dette på grunn av følgende:

- Høy %-vis reduksjon etter ozonering sammenliknet med de andre utprøvde metodene.

- Flora som vokser opp er homogen (domineres av *genus Aeromonas*); de andre metodene viste langt mer heterogen flora.
- Metoden er enkel å gjennomføre, kommersielt medium er tilgjengelig.

Metoden svikter i likevel forhold til 2 av de 5 opplistede kravene:

- Fra ett av de fire anleggene i del B fikk en ikke oppvekst i det hele tatt (med de aktuelle prøvevolum)
- Kulturer på dette mediet har høyere ozonfølsomhet enn ozonfølsomheten til *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*.

I denne undersøkelsen “fungerte” indikatormetoden likevel for 3 av de 4 utprøve anlegg (med unntak av kravet om ozonfølsomhet). Dersom disse resultatene viser seg å ha generell gyldighet, vil innføring av denne indikatormetoden bety vesentlig forbedret kontrollfunksjon for 3/4 av de aktuelle anlegg. Dette vil samlet sett bety en vesentlig forbedring av kontrollmulighetene sammenliknet med dagens situasjon.

Dersom denne metoden innføres som grunnlag for overvåking av inntaksvann til settefiskanlegg, og det forekommer tilfeller som anlegg 4, der en ikke får noe vekst, hverken før eller etter ozonering; er det naturlig å tenke seg følgende modifikasjoner for slike anlegg:

- Større utsædvolum for å “fange opp” mindre konsentrasjoner av bakterien
- Bruk av alternative indikatorsystem

Det er naturlig å trekke sammenlikning til problemstillingen ved valg av indikatorbakterie for hygienisk overvå-



king a drikkevann (spesielt mhp forurenning med avføring fra mennesker eller dyr). Det finnes heller ikke her noen enkel indikatorbakterie/metode som gir fullstendig svar. Flere indikatorbakterier er i bruk. Selv den mest brukte indikatoren; koliforme bakterier, gir ingen sikker indikasjon på de mest aktuelle fekale patogener. For eksempel er Norwalkvirus (en av de viktigste vannbårne sykdommene) mer resistent mot klor, det vanligste desinfeksjonsmiddel, enn koliforme bakterier

For alle indikatorsystem er det avgjørende at den aktuelle forvaltningsmyndighet har god kunnskap om metoden styrker og svakheter. På samme måte er det også nødvendig å skaffe seg betydelig mer kunnskap om indikatormetode for ozonering av inntaksvann til settefisk, dersom denne metoden skal anvendes av forvaltningen ved kontroll av settefiskanlegg. For å komme videre vil en her foreslå:

- Videre utvikling av metoden *Aeromonasmedium m/supplement/ 37 °C/ grønne kolonier*. Eventuelle variasjoner mellom årstid, geografi og vannkilde type bør undersøkes
- Ytterligere utprøving av alternative metoder
- Mer omfattende kartlegging av flora som vokser på aktuelle indikator medier; herunder selektiv bakteriologisk diagnostikk.

## Konklusjon

På bakgrunn av denne undersøkelsen kan en trekke følgende konklusjon: Av de utprøvde metodene er det åpenbart

metoden *Aeromonasmedium m/supplement/ 37 °C/ grønne kolonier* som utpeker seg som den beste indikatormetode for ozonering av inntaksvann til settefiskanlegg i henhold til de krav som lovverket gir. Denne metoden bør utredes videre med sikte på å inngå som grunnlag for godkjenning og kontroll av inntaksvann til settefiskanlegg.

## Referanser

1. Landbruksdepartementet: Forskrift om desinfeksjon av inntaksvann til, og avløpsvann fra akvakulturrelatert virksomhet. 20.2.1997
2. Liltved, H., Hektoen, H., Efraimsen, H. 1995: Inactivation of Bacterial and Viral Fish Pathogens by Ozonation or UV Irradiation in Water of Different Salinity. *Aquacultural Engineering*. 107 - 121.
3. Hellesnes, I., Joner, P. E., Østenvik, Ø. 1978: Aktiv tjeneste i vannhygiene. Kompendium. Norges Veterinærhøgskole.
4. Norges Standardiseringsforbund 1989: Prøvetaking for bakteriologisk undersøkelse av drikkevann. NS 4789.
5. Norges Standardiseringsforbund 1989: Teknikker for kvantitative bestemmelser av mikroorganismer fra vann, sedimenter og slam. Membranfiltreringsteknikk. NS 4790-4.
6. The Oxoid Manual. 7th edition. 1995.

7. Storset, A. 1991: Desinfeksjon av sjøvann - metode for bakteriologisk kontroll, Norsk Veterinærtidsskrift, 1025 - 1027.

8. Liltved, H., Wahl, E. 1996: Indikatorsystem for ozonbehandling av ferskvann til oppdrettsanlegg. Nivå-rapport 3405-96. 16 s.

MFT  
Miljø- og Fluidteknikk A/S



## Leveringsprogram

**Prefabrikerte overløp  
og utstyr til avløpsnett.**

FluidSep, høyt sideoverløp, tverroverløp, virveloverløp, FluidBend, FluidSip, Fluid-Screen, FluidGate, FluidVortex, FluidCon, FluidVertic, FluidHose, FluidTurbo, Fluid-Vortex-E, FluidFlap, FluidCasca, Fluid-Swing, FluidSlot, FluidFlex, FluidFlush, Heimstad-lokket, Profa-kummen. **Vi skreddersyr for lokal tilpasning. Effektivt og nøyaktig.**

Ledende europeisk teknologi. Kontroll over utslipp fra ledningsnett.

Nye Vakåsvei 8C  
N-1360 Nesbru

Tlf. 66 84 88 44  
Fax 66 84 88 42