

RAPPORT LNR 3405-96

Indikatorsystem
for ozonbehandling
av ferskvann til
oppdrettsanlegg

NIVA - RAPPORT

Norsk institutt for vannforskning  NIVA

Prosjektnr.: 0-96141	Undernr.:
Løpenr.: 3405-96	Begr. distrib.:

Hovedkontor

Postboks 173, Kjelsås
0411 Oslo
Telefon (47) 22 18 51 00
Telefax (47) 22 18 52 00

Sørlandsavdelingen

Televeien 1
4890 Grimstad
Telefon (47) 37 04 30 33
Telefax (47) 37 04 45 13

Østlandsavdelingen

Rute 866
2312 Ottestad
Telefon (47) 62 57 64 00
Telefax (47) 62 57 66 53

Vestlandsavdelingen

Thormøhlensgt 55
5008 Bergen
Telefon (47) 55 32 56 40
Telefax (47) 55 32 88 33

Akvaplan-NIVA A/S

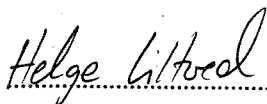
Søndre Tollbugate 3
9000 Tromsø
Telefon (47) 77 68 52 80
Telefax (47) 77 68 05 09

Rapportens tittel: Indikatorsystem for ozonbehandling av ferskvann til oppdrettsanlegg	Dato:	Trykket: NIVA 1996
	Faggruppe:	Akvakultur
Forfatter(e): Helge Liltved (NIVA) Erik Wahl (Næringsmiddeltilsynet i Orkdalsregionen)	Geografisk område:	
	Antall sider:	Opplag: 16

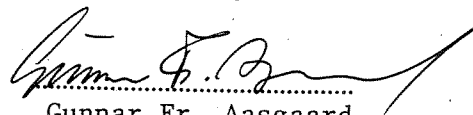
Oppdragsgiver: Norges Forskningsråds TEFT-program og Birger Christensen A/S.	Oppdragsg. ref.:
---	------------------

Ekstrakt: Gjennom utprøving av medier og forsøk har vi kommet fram til et indikatorsystem for kontroll av ozoneringseffekten ved oppdrettsanlegg.	
4 emneord, norske	4 emneord, engelske
1. Akvakultur	1. Aquaculture
2. Inntaksvann	2. Inlet water
3. Ozonering	3. Ozonation
4. Indikator	4. Indicator

Prosjektleder


.....
Helge Liltved

For administrasjonen


.....
Gunnar Fr. Aasgaard

ISBN 82-577-2936-1

Forord

Birger Christensen A/S og Norsk institutt for vannforskning (NIVA) har ved hjelp av samarbeidspartnere gjennomført et prosjekt for å komme fram til et egnet indikatorsystem for kontroll og dokumentasjon av effekten ved ozonering av inntaksvann til settefiskanlegg.

Prosjektet er gjennomført innenfor Norges forskningsråds TEFT-program. Teknologiatteche for Oslo og Akershus, Per Schølberg-Henriksen, bidro til realiseringen. Ved siden av TEFT-bevilgningen har Birger Christensen A/S bidratt til finansieringen og stilt en ozongenerator til disposisjon for gjennomføring av laboratorieforsøk.

Prosjektarbeidet ble utført i løpet av 1995. Næringsmiddeltilsynet i Orkdalsregionen ved Erik Wahl har stått for den praktiske utprøvingen av de ulike mediene med tilhørende analyser og diagnostisering. Norske Fiskeoppdretteres Avlstasjon, Kyrksæterøra, har stått for prøvetaking ved eget anlegg og innsending av prøver. Ellers har Fitjar Laks A/S, Kongsmoen Settefisk A/S og Mauranger Laks A/S vært aktivt med i gjennomføringen.

Forsøkene med utprøving av de ulike isolatenes ozonfølsomhet er gjort ved Fiskehelselaboratoriet ved Havbrukstasjonen i Tromsø.

INNHOLDSFORTEGNELSE

	Side
Forord	1
Sammendrag	3
1. Innledning	4
1.1 Generelt om ozon	4
1.2 Indikatorer	5
2. Materialer og metoder	6
2.1 Testing av selektive og indikative medier	6
2.2 Prøveuttak og analyse	7
2.3 Testing av ozonfølsomhet	8
3. Resultater og diskusjon	10
3.1 Testing av selektive og indikative medier	10
3.2 Testing av ozonfølsomhet	12
4. Referanser	15

Sammendrag

Ved flere norske settefiskanlegg ozoneres ferskvannsinntaket for å hindre tilførsler av fiskepatogene mikroorganismer. Dagens system med bruk av kimtall for kontroll av desinfeksjonseffekten har åpenbare mangler. Det ble derfor initiert et prosjekt hvor målsettingen var å finne fram til et bedre indikatorsystem ved ozonering av ferskvannsinntak til settefiskanlegg.

Under prosjektgjennomføringen er det prøvd ut ulike medier og dyrkingsbetingelser for selektering av fluorescerende pseudomonader og aeromonas-arter fra råvann og ozonert vann ved Norske Fiskeoppdretteres Avlstasjon (NFA) på Kyrksæterøra. Det ble i tillegg tatt ut enkle prøveserier ved de øvrige 3 norske settefiskanleggene som ozonerer inntaksvannet. Av de ulike kombinasjonene som ble testet synes Aeromonas medium base med ampicillin supplement ved 37 °C å gi det mest homogene bilde på genus nivå. Grønne kolonier som ble plukket fra dette mediet viste seg å tilhøre *Aeromonas/Vibrio*-gruppen. Ved å benytte testsystemet API 20 NE ble hoveddelen av de testede kulturene (9 av 15) bestemt til *Aeromonas hydrophila*.

Totalt 13 renkulturer fra Aeromonas-mediet ble testet for ozonfølsomhet og sammenliknet med følsomheten til en virulent *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* stamme. Det ble benyttet en naturlig ferskvannstype med en initiell ozon konsentrasjon på 0.12 mg/l, synkende til 0.08 og 0.06 mg/l etter henholdsvis 30 og 60 sekunders eksoneringstid. En kultur viste relativt liten følsomhet for denne doseringen (94.2 % inaktivering). De øvrige kulturene ble redusert med 99.9 % (3 log) eller mer. Reduksjonen i den virulente *A. salmonicida* stammen synes å være noe lavere enn gjennomsnittet.

Bruk av membranfilterteknikk og opptelling av grønne kolonier på Aeromonas medium base med ampicillin supplement inkubert ved 37°C synes å gi et brukbart bilde på ozoneringseffekten ved settefiskanlegg. Det kan imidlertid bli et problem å påvise indikatoren i stort nok antall i enkelte råvannskilder, spesielt vinterstid. Problemet kan reduseres ved å filtrere større vannvolumer enn de som ble benyttet i denne undersøkelsen. Det anbefales å prøve metoden over lengere tid ved flere anlegg for å vinne erfaringer og evaluere nytteverdien.

1. Innledning

For å begrense risikoen for sykdomsutbrudd i norske settefiskanlegg, har det i lengere tid vært restriksjoner på bruk av sjøvann og ferskvann fra kilder med oppgang av anadrom fisk. Imidlertid gir *Forskrift om desinfeksjon av inntaksvann til oppdrettsanlegg for akvatiske organismer*, fastsatt av Landbruksdepartementet 04.02.91, åpning for bruk av slikt vann dersom godkjent desinfisering benyttes. UV-bestråling og ozonering er de to desinfeksjonsmetodene som benyttes.

Det er i første rekke aktuelt å ozonere ferskvannsinntak i norske oppdrettsanlegg. Dette fordi det dannes en rekke oksiderte forbindelser (spesielt bromforbindelser) ved ozonering av sjøvann. Disse kan være toksiske for oppdrettsfisken. Før man vet noe mer om skadeeffektene av forbindelsene, samt forhold omkring detoksifisering, frarådes bruk av ozonert sjøvann til oppdrett av laksefisk.

1.1 Generelt om ozon

Ozon er en spesiell form av oksygen, sammensatt av tre oksygenatomer. Forbindelsen kan genereres ved å la tørr luft eller oksygen passere gjennom et felt med elektriske utladninger eller ved å UV-bestråle luft eller oksygen. I begge tilfellene blir oksygenmolekyler splittet. De resulterende oksygen-atomene reagerer med intakte oksygenmolekyler til ozon.

Ozon har et høyt oksidasjonspotensiale og regnes som et effektivt middel for desinfeksjon av vann. Normalt sett tilsettes ozon vann ved å bobble gassen gjennom en vannsøyle i en kontakttank. I fiskeoppdrettsammenheng har metoden vært tatt i bruk i forbindelse med desinfeksjon av inntaksvann og avløpsvann, samt for behandling av vann i resirkuleringsanlegg. I likhet med klor er ozon giftig for fisk. En viss holdetid eller fysisk/kjemisk deozonering kan derfor være nødvendig før ozonert vann ledes til fiskekar.

Ozon er svært reaktivt og vil oksydere en rekke organiske og uorganiske forbindelser. Dette gjør at det kan være vanskelig å etablere og måle restkonsentrasjoner i naturlige vann typer og avløpsvann. I laboratorieforsøk er det vist at mange fiskepatogene bakterier og virus raskt inaktiveres i konsentrasjonsområdet 0.1 - 0.2 mg/l i naturlige vann typer (Sugita og medarb. 1992 og Liltved og medarb. 1995). I buffere laget av destillert vann synes følsomheten til de samme organismene å være langt høyere. Rask desimering ved så lave konsentrasjoner som 0.01 mg restozon pr. liter er rapportert (Wedemeyer og Nelson 1977, Wedemeyer og medarb. 1978). Det er imidlertid demonstrert at andre grupper av bakterier tilhørende den naturlige vannflora overlever 4 minutters eksponering ved 1.0 mg/l i avløpsvann fra oppdrettsanlegg (Austin 1983). Ved norske oppdrettsanlegg forlanges det en rest-ozon konsentrasjon på 0.1 mg/l etter 3 minutters kontakttid.

1.2 Indikatorer

Ett av kravene fra Landbruksdepartementet for godkjenning av desinfeksjonsanlegg er at bakterien som forårsaker furunkulose hos laksefisk, *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, inaktiveres med 99.9 % (3 log enheter). Siden denne bakterien normalt ikke forekommer i inntaksvannet, er en henvist til å bruke andre indikatororganismer for å dokumentere desinfeksjonseffekten.

For inntaksvann til settefiskanlegg bør et godt indikatorsystem ha følgende egenskaper:

- Indikatororganismene må være tilstede i de aktuelle vannkildene i et så stort antall at det dannes et tilstrekkelig antall kolonier på vekstmediet.
- Indikatororganismene må kunne påvises i rutinediagnostikk. Utsæd og avlesning bør være enkelt.
- Metoden bør avspeile en spesifikk taksonomisk gruppe eller være definert etter biokjemiske kriterier.
- Følsomheten ovenfor desinfeksjonsmiddelet bør være i samme størrelsesorden som for patogene målorganismer (her *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*).
- Kommersielle medier bør være tilgjengelige.
- Analysen bør gi reproducerbare resultater.

For desinfeksjon av sjøvannsinntak til settefiskanlegg er det tatt i bruk en metode med selektivt vibriemedium som beskrevet av veterinær Arne Storset (Storset 1991). Ideen bak metoden var at marine vibrio som vokser på det selektive mediet har en følsomhet ovenfor desinfeksjonsmiddelet som er tilnærmet lik følsomheten til de fiskepatogene bakterier tilhørende slekten *Vibrionaceae* (*Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida*). NIVA har utført laboratorietester for å sammenlikne UV-følsomheten til bakterier isolert på det selektive vibrio-mediet med patogener i slekten *Vibrionaceae* (Hektoen 1992). Det ble funnet sammenliknbare doser for 99.9 % inaktivering.

Ved desinfeksjon av ferskvann med UV eller ozon har man benyttet kimtallstillinger på Nutrient Agar ved 20°C for evaluering av effekt. Ved Norske Fiskeoppdretteres Avlstasjon (NFA), Kyrksæterøra, ozoneres ferskvannsinntaket til settefiskanlegget. Næringsmiddeltilsynet i Orkdalsregionen (NTO) har de tre siste årene gjennomført regelmessige analyser av kimtall i råvann og ozonert vann ved dette anlegget. I løpet av denne perioden er det tatt ut i alt 52 prøvepar (råvann + ozonert vann) med en gjennomsnittlig reduksjon i kimtall på 96.4 %. Dette innebærer at en fraksjon av råvannets flora overlever ozoneringen. Det er vanskelig å påvise sammenhenger mellom inaktiveringsgrad og ozondose. Det er også vanskelig å relatere

kimtallreduksjon til reduksjon av *A. salmonicida* som skal inaktiveres med 99.9 % i.h.t. forskriftene.

Det er åpenbart at parameteren kimtall ved 20°C representerer en svært heterogen gruppe mikroorganismer. Den omfatter tydeligvis et stort mangfold bakteriegrupper med varierende følsomhet for ozon. Det er også grunn til å tro at sammensetningen vil variere mellom vannkilder og mellom årstider. På denne bakgrunn vurderes kimtall på Nutrient Agar ved 20°C en lite spesifikk indikator for å måle desinfeksjons-effekt, og dermed dårlig egnet som kontrollparameter for driftsoppfølging og for fastsetting av grenseverdi for forvaltningsmyndighetene. Det er derfor et ønske om å utvikle et indikatorsystem som gir mer informasjon om den reelle effekten i forhold til fiskepatogene mikroorganismer.

Arbeidet som rapporteres her har vært todelt. Første delen ble konsentrert om å prøve ut aktuelle selektive og indikative dyrkningsmedier ved settefiskanlegg som ozonerer inntaksvannet. Målsettingen var å komme fram til ett eller flere medier som gir tilstrekkelig selektering og vekst av en spesifikk taksonomisk gruppe i råvann, samt reflekterer en rimelig grad av inaktivering i forhold til de aktuelle ozonkonsentrasjonene. I andre del av arbeidet ble typiske kolonier plukket fra de utvalgte mediene og diagnostisert v.h.a. biokjemiske tester samt API-systemer. Fra de ulike isolatene ble det laget renkulturer som ble testet for ozonfølsomhet og sammenliknet med følsomheten til en virulent stamme av *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*.

2. Materialer og metoder

Aktuelle dyrkings-medier ble valgt ut fra kunnskaper om forekomster av spesifikke bakteriegrupper i naturlige ferskvannskilder og deres forbindelse til fiskepatogene bakterier. Arbeidet ble konsentrert om medier for isolering av fluorescerende pseudomonader og aeromonas-bakterier.

2.1 Testing av selektive og indikative medier

Medier for påvisning av fluorescerende pseudomonader

Genus *Pseudomonas* omfatter arter som er av vannhygienisk interesse, deriblant arter som er angitt å være fiskepatogene (Håstein 1990). En av disse er *P. fluorescens* som forekommer normalt i ferskvann over hele verden. Den er bare sjeldent rapportert som primærpatogen. Sykdomsutbrudd har imidlertid vært observert blant karpefisk og laksefisk, og kan være svært vanskelig å skille fra tilsvarende utbrudd forårsaket av *Aeromonas* sp.

P. fluorescens er Gram negativ, bevegelig og vokser ikke anaerobt. Den vokser godt på standard medier, deriblant Kings Agar B. Bakterien produserer fluorescein som diffunderer ut i mediet, og fluorescens påvises v.h.a. UV-lys ved 365 nm bølglengde.

Det er verdt å merke seg at arter som *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. aureofaciens* og *P. chlororapis* også er fluorescerende og kan forekomme i ferskvann.

For påvisning av fluorescerende pseudomonader ble **Pseudomonas agar base** (Oxoid) med CFC-supplement ved 20°C i 3 døgn og **Kings Agar B** ved 20°C i 1 døgn benyttet. Metoden med Kings Agar B er standardisert for vannundersøkelser (Norges Standardiseringsforbund 1990).

Medium for påvisning av aeromonas

Genus *Aeromonas* innen familien *Vibrionaceae* omfatter både bevegelige mesofile og ubevegelige psykrofile aeromonasbakterier (Myhr 1990). Flere av de bevegelige, mesofile artene utgjør en vesentlig del av den akvatiske mikrofloraen. Dette gjelder alle typer vann, fra rent kildevann til forurenset ferskvann, brakkvann og sjøvann. Gruppen utgjør også en viktig del av den normale bakterieflora i og på fisk i ferskvann og brakkvann. De er potensielt patogene bakterier med et bredt vertsspektrum, men lite smittsomme. Et eksempel er *Aeromonas hydrophila* som er rapportert å være primær eller sekundær sykdomsårsak hos mange fiskeslag fra alle deler av verden. De bevegelige mesofile aeromonasbakteriene har imidlertid liten betydning for fiskehelsen i norske oppdrettsanlegg.

Den nevnte bakterie-gruppen vokser godt på alle vanlig brukte medier og har ingen krav til spesielle vekstfaktorer. Kulturer inkuberes vanligvis ved 22 - 25°C, men de vokser også ved 37°C.

I våre forsøk ble **Aeromonas medium base** (Oxoid) med og uten ampicillin-supplement benyttet for selektering av *Aeromonas*-arter, primært *A. hydrophila*. Disse vil kunne påvises som grønne kolonier. Inkubering ble forsøkt ved 20, 30 og 37°C fra 1 til 3 døgn.

I tillegg ble til de overnevnte ble **Mac Conkey agar** (Oxoid) ved 20°C i 3 døgn benyttet i de innledende testene.

2.2 Prøveuttak og analyse

I perioden 06.07.95 til 25.10.95 ble det tatt ut 5 prøveserier fra Norske Fiskeoppdretteres Avlstasjon (NFA), 7200 Kyrksæterøra, for testing av medier. Hver prøveserie bestod av parallelle prøver av råvann og vann etter ozonering. Prøvene ble tatt på autoklaverte glassflasker som på forhånd var tilsatt natrium-tiosulfat for nøytralisering av restozon. Analyse ble påbegynt samme dag som prøvene ble tatt ut.

For bestemmelse av antall kolonier på de ulike mediene ble det benyttet membranfiltrerteknikk (Norsk Standardiseringsforbund 1989). 10 og 100 ml (for Kings agar B også 1 ml) råvann ble filtrert, mens 100 og 500 ml ozonert vann ble filtrert. Hver prøve ble filtrert i duplikat og inkubert på mediene.

For videre diagnostisering er det benyttet gramfarging, mikroskopering, oksidase og katalase-test, pluss API 20 E og API 20 NE testsystemer (Medinor A/S). API 20 NE er spesielt utviklet for identifisering av bakterier som ikke tilhører familien Enterobacteriaceae. Systemet omfatter 8 biokjemiske tester (enzymaktivitet) og testing av 12 ulike karbohydrater for å avgjøre om bakterien kan nyttegjøre disse som eneste karbonkilde. Test-resultatene ble behandlet v.h.a. tilhørende programvare på en PC.

Med bakgrunn i resultatene fra NFA ble *Aeromonas* medium base med ampicillin supplement ved 37°C og Kings agar B ved 20°C valgt for videre utprøving. I tillegg til NFA ble prøver tatt ved Fitjar Laks A/S, 5419 Fitjar, Kongsmoen Settefisk A/S, 7696 Kongsmoen, Mauranger Laks A/S, 5476 Mauranger.

I perioden 28.11.95 - 05.12.95 ble det tatt ut en prøveserie av råvann og ozonert vann fra hvert av disse anleggene. Prøvene ble behandlet og analysert som tidligere angitt.

2.3 Testing av ozonfølsomhet

Grønne kolonier fra *Aeromonas* medium base med ampicillin og en virulent stamme av *A. salmonicida* (AL2017) ble testet for ozonfølsomhet. Det ble plukket 8 kolonier fra råvannet ved NFA (A,C,F,G,H,I,J,K), 3 kolonier fra Kongsmoen Settefisk (L fra råvann og M,N fra ozonert vann) og 2 kolonier fra Fitjar Laks A/S (O fra råvann og P fra ozonert vann). Det ble gjort to etterfølgende utstryk på blodagar (Oxoid) for å sikre renkultur.

Bakterier ble overført fra skålene med blodagar til kolber med 20 ml steril Tryptone Soya Broth (Oxoid) for vekst på ristebrett i 20 timer ved ca. 20°C. Bakterie-cellene ble høstet ved sentrifugering (4500 omdr./min i 5 min) og vasket to ganger i steril 0.9 % NaCl-løsning. Suspensjonene ble fortynnet med 0.9 % NaCl-løsning til OD₆₀₀ på ca. 1. Pipetterte volumer fra denne suspensjonen ble benyttet i ozoneringsforsøkene.

Erlenmeyerkolber ble fylt med 250 ml naturlig ellevann og autoklavert. Vannets fysiske og kjemiske egenskaper er vist i tabell 1. Etter autoklaving ble vannet kjølt ned til 4 - 5°C i kjøleskap, noe som også var temperaturen ved ozoneringen.

For ozon produksjon ble en generator av type Sorbios GSG 020.2 benyttet. Rent oksygen ble ledet gjennom generatoren med en hastighet på 100 l/time. Spenningen ble innstilt til 40 volt v.h.a. en regulator. Ifølge datablad for generatoren er konsentrasjonen ved denne innstillingen ca. 3 mg ozon pr. liter oksygen. Ozon ble tilsatt vannet via en luftestein under omrøring (magnetomrører) til ønsket rest-konsentrasjon. Rest-ozon ble målt med indigo-metoden (APHA-AWWA-WPCF 1989) ved start og etter 30 og 60 sekunders eksponering.

I forsøkene ble det benyttet en bakterietetthet på ca. 10⁵ CFU/ml. Parallell prøver ble tatt ut ved start og etter 30 og 60 sekunders eksponering og tilsatt natrium-tiosulfat (10 % løsning) for nøytralisering av restozon. Bakterietall i parallell ble bestemt ved

spredeplateteknikk (Norges Standardiseringsforbund 1989) og membranfilterteknikk på Tryptone Soya Agar (Oxoid) ved 20°C i 2 til 4 døgn.

Tabell 1. Fysisk og kjemisk karakterisering av ellevannet som ble benyttet i undersøkelsen.

Parameter							
UVabs/cm 254nm	Temp °C	Farge mgPt/l	Kond. mS/m	Turb. FTU	KOF-Mn mgO/l	NH ₄ -N µg/l	pH
0.013	4-5	<5	4.8	0.06	<1	<4	6.9

3. Resultater og diskusjon

3.1 Testing av selektive og indikative medier

Resultatene fra de innledende testene med ulike medier ved NFA er vist i tabell 2. Der hvor det er gjennomført 2 prøvetakingsserier, er gjennomsnittsverdien av de to seriene angitt. Ved analyse av råvannsprøvene ble et brukbart antall kolonier pr. 100 ml registrert på alle mediene ved de benyttede dyrkingsbetingelsene. Best vekst ble observert på Kings Agar B ved 20°C.

Tabell 2. Resultater fra NFA ved bruk av ulike medier og dyrkingsbetingelser. Antall kolonier pr. 100 ml før og etter ozonering (0.2 - 0.3 mg/l etter ca. 1 min), samt prosentvis inaktivering er angitt. Inkubasjonstemperaturen var 20°C der hvor denne ikke er spesifisert.

medium/ metode	kolonitype	antall serier	råvann	ozonert	prosentvis reduksjon
Mac Conkey	transparente	2	535	6	98,9
	røde	2	12	0	100
Pseudomonas agar	fluorescerende	1	107	1,5	98,6
	totalantall	1	320	17	94,7
Kings agar B	fluorescerende	2	11.000	536	95,1
Aeromonas- medium, 20 °C (uten supplement)	grønne	1	21	1,4	93,3
	gule	1	47	0,6	98,7
	ufargete	1	0	5	-
Aeromonas- medium, 30 °C (uten supplement)	grønne	1	119	2,5	97,9
	gule	1	3	0	100
	ufargete	1	19	100	-
Aeromonas- medium, 37 °C (uten supplement)	grønne	1	280	200	28,6
	gule	1	5	0	100
	ufargete	1	180	100	44,4
Aeromonas- medium, 37 °C, med ampicillin- supplement	grønne	2	90	1,0	98,9
	gule	2	17	1	94,1
	ufargete	2	45	15	66,7

Med de ozondoseringene som ble oppgitt ved NFA (0.2 til 0.3 mg/l etter ca. 1 min kontakttid), var det forventet å finne høy grad av inaktivering av fluorescerende pseudomonader og arter tilhørende aeromonas gruppen på henholdsvis Pseudomonas Agar/Kings Agar B og Aeromonas-mediet. Imidlertid viste det seg at også andre bakterie-grupper vokste på mediene, noe som kompliserte bildet og ga tildels lave reduksjoner i kimtall mellom råvann og ozonert vann.

For Pseudomonas Agar og Kings Agar B var det vanskelig å telle fluorescerende pseudomonader på grunn av sammenvokste kolonier og et betydelig antall ikke fluorescerende kolonier. Det var vanskelig å plukke enkeltkolonier for videre diagnostikk og testing av ozon-følsomhet.

Aeromonas-mediet uten ampicillin-supplement ved 20, 30 og 37 °C ga et heterogent bilde. Videre diagnostikk av grønne kolonier viste en blanding av oksidase negative og oksidase positive Gram negative staver. Dyrking med ampicillin-supplement (bare foretatt ved 37 °C), ga også variasjoner i kolonimorfologi. Videre diagnostikk av grønne kolonier viste seg imidlertid å gi et forholdsvis homogent bilde dominert av oksidase positive, Gram negative staver. Dette tyder på at disse tilhører Aeromonas/Vibrio-gruppen.

Med bakgrunn i resultatene oppnådd i den innledende delen, ble det besluttet å teste Aeromonas-mediet med ampicillin ved 37 °C og Kings Agar B ved 20 °C med vann fra alle de 4 norske settefiskanleggene som ozonerer inntaksvannet. Resultatene er vist i tabell 3.

Tabell 3. Antall kolonier pr. 100 ml på Aeromonas medium med ampicillin (37°C) og Kings agar B (20°C) før og etter ozonering ved de 4 settefiskanleggene som ozonerer inntaksvannet. Følgende ozonkonsentrasjoner ble oppgitt: Fitjar Laks 0.10 mg/l i holdetanken, Kongsmoen 0.15 - 0.20 etter 3 min, Mauranger 0.13 mg/l i holdetanken, NFA 0.36 mg/l etter ca. 1 min.

	Aeromonas/grønne kolonier			Kings agar B/fluor. kim		
	råvann	ozonert	prosentvis reduksjon	råvann	ozonert	prosentvis reduksjon
Fitjar Laks	29	0,33	98,9	1.200	80	93,3
Kongsmoen	7,7	0,58	92,5	39	3	92,3
Mauranger	0	0	-	10	0,4	96,0
NFA	7,2	0,08	98,9	11	0,83	92,5

Råvannsprøvene ga liten oppvekst av kolonier på *Aeromonas*-mediet ved 3 av anleggene (29, 7.7 og 7.2 kolonier pr. 100 ml), og ingen oppvekst ved ett anlegg. Etter ozonering var tallet <1 for alle anleggene. Råvannets innhold av fluorescerende *pseudomonas* som vokste på Kings Agar B var også lavt, bortsett fra ved Fitjar Laks hvor antallet var 1200 pr. 100 ml. Her var det også et betydelig antall igjen etter ozonering. Ved å filtrere større råvannsmengder enn 100 ml vil talte kolonier bli høyere, og utgangspunktet for beregning av effekt tilsvarende bedre.

Fra de 4 anleggene ble det plukket i alt 15 grønne kolonier fra *Aeromonas*mediet (11 fra råvann og 4 fra ozonert vann) for videre diagnostikk. Alle kulturene besto av Gram negative staver som var oksidase positive. De fleste ga hemolyse på blodagar. Ved testing på API 20 NE systemet ble 11 kulturer bestemt til genus *Aeromonas*, 1 til genus *Vibrio*, mens 3 kulturer ga svaret *Vibrio/Aeromonas* (kunne ikke skille mellom disse). De 11 som ble bestemt til genus *Aeromonas* fordelte seg på følgende species: *A. sorbia* (1), *A. hydrophila* (9) og *A.* (1) (ikke nærmere bestemt). *A. hydrophila* blir betegnet som godt egnet for karakterisering på API 20 NE systemet.

Forsøk på å isolere og identifisere kulturer fra Kings Agar B var ikke vellykket på grunn av rik bakgrunnsflora.

3.2 Testing av ozonfølsomhet

For testing av ozonfølsomhet ble naturlig ferskvann ozonert til en startkonsentrasjon på 0.12 mg/l (maks 0.13, min 0.10 mg/l). Den benyttede rest-ozonkonsentrasjonen ble valgt ut fra tidligere erfaringer med inaktivering av fiskepatogener i naturlige vannkvaliteter (Liltved og medarb. 1995). Som forventet sank konsentrasjonen i løpet av eksponeringstiden. Etter 30 sekunder var middelveidien 0.08 mg/l, og etter 60 sekunder 0.06 mg/l. Ozontapet tilskrives i første rekke reaksjoner med vannets løste organiske og reduserte uorganiske forbindelser. Tap via avdrivning til atmosfæren ble søkt minimalisert ved å sørge for forsiktig omrøring under eksponeringen. Det var ingen signifikant forskjell i ozontap med eller uten bakterier tilsatt. Direkte reaksjoner med bakterie-celler synes derfor ikke å bidra til ozon-reduksjon med de tetthetene som ble benyttet.

I tabell 4 er ozonfølsomheten til ulike kulturer fra *Aeromonas* medium med ampicillin ved 37°C vist. Kulturene M, N og P er isolert fra ozonert vann, de øvrige fra råvann. Alle isolatene i tillegg til den virulente stammen av *A. salmonicida* (AL 2017) viste følsomhet for den benyttede rest-ozon konsentrasjonen. Dette er i samsvar med tidligere undersøkelser av ozon-følsomheten til *A. salmonicida* i naturlige vanntyper. Nødvendig rest-ozon konsentrasjon for en viss grad av inaktivering synes imidlertid å være avhengig av vannkvalitet, da det er vist at lavere konsentrasjoner er effektivt i buffere laget fra destillert vann (Wedemeyer og Nelson 1977), mens høyere konsentrasjoner er nødvendig i avløpsvann (Austin 1983, Liltved og Landfald 1995).

Tabell 4. Antall kolonier pr. ml etter 0, 30 og 60 sekunders eksponering til en opprinnelig ozonkonsentrasjon på 0.12 mg/l. Kulturene ble isolert på Aeromonas medium med ampicillin (37°C) fra råvann og ozonert vann ved de 4 settefiskanleggene. Identifikasjonen er utført med API 20 NE system.

Tid	Antall kolonier pr. ml av de ulike kulturene													
	A A. hydr.	C A. hydr.	F A. hydr.	G II	H A. hydr.	I A. hydr.	J A. sorb.	K II	L A. hydr.	M* A. hydr.	N* A. hydr.	O A.	P* V./A.	AL 2017 A. salm.
0 sek.	6.9× 10 ⁴	3.4× 10 ⁵	2.6× 10 ⁵	4.6× 10 ⁵	3.6× 10 ⁵	1.6× 10 ⁵	9.8× 10 ⁴	3.5× 10 ⁵	5.8× 10 ⁵	4.9× 10 ⁵	3.2× 10 ⁵	4.3× 10 ⁴	3.4× 10 ⁵	2.9× 10 ⁵
30 sek.	4000	16	<1	4.5	280	220	250	110	230	62	21	<1	5.4	410
60 sek.	4000	9.2	<1	1.6	36	79	49	14	8.7	8.3	2.1	<1	<1	370
Red. %	94.2	> 99.9	> 99.9	> 99.9	> 99.9	> 99.9	> 99.9	> 99.9	> 99.9	> 99.9	> 99.9	> 99.9	> 99.9	99.9

* isolert fra ozonert vann

A. - Aeromonas

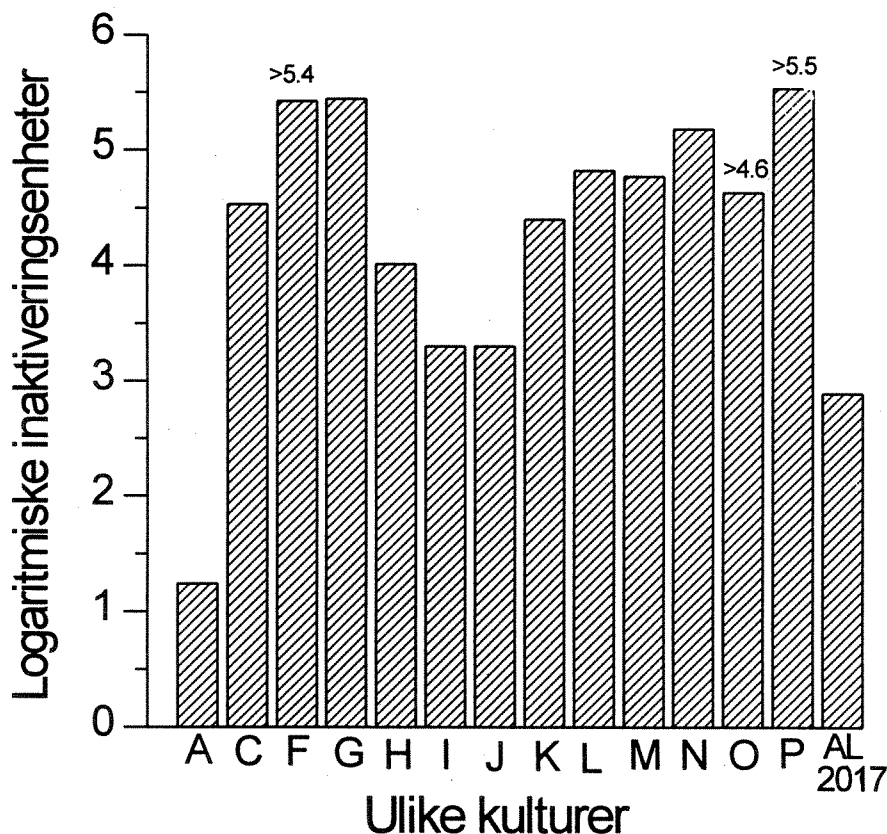
V. - Vibrio

II - Ikke identifisert

Hoveddelen av inaktiveringen foregikk i løpet av de første 30 sekundene. Forholdsvist små endringer ble observert ved å øke eksponeringstiden til 60 sekunder. Redusert inaktiverings-hastighet ved økende eksponeringstid er observert i en rekke studier hvor ozon er benyttet som desinfeksjonsmiddel. I vårt tilfelle er det nærliggende å forklare dette forløpet med redusert mengde restozon tilgjengelig, fra 0.12 mg/l opprinnelig til 0.08 og 0.06 etter henholdsvis 30 og 60 sekunder.

Det er verdt å merke seg den lave følsomheten til den virulente *A. salmonicida* stammen (AL 2017) i det lave konsentrasjonsområdet (0.08 til 0.06 mg/l). Da flere fullskala anlegg har kontakt-kammere med tilnærmet stempelstrøm, er redusert ozonkonsentrasjon med økende kontakttid representativt for inaktiveringsprosessen i settefiskanlegg. Imidlertid skal rest-konsentrasjonene i disse anleggene være høyere etter 30 og 60 sekunders eksponering enn de som ble benyttet her.

Inaktiveringsgraden for alle de testede kulturene var 99.9 % (3 log enheter) eller høyere, bortsett fra kultur A som synes mindre følsom enn de øvrige (tabell 4 og figur 1). Selv om forskjellene er små, synes den virulente stammen av *A. salmonicida* å være noe mer resistent enn gjennomsnittet. Dette er ikke optimalt med tanke på de testede kulturene som indikatorer. Deres overlevelsesgrad burde være noe høyere enn overlevelsesgraden til den virulente målorganismen for å innebygge en viss grad av sikkerhet. Tilsvarende problem er kjent i drikkevanns-desinfeksjon der indikatorene (koliforme bakterier ved 37°C) ofte er mer følsomme enn målorganismene. Her har man imidlertid beholdt eksisterende indikatorsystem ut fra totale vurderinger av fordeler og ulemper.



Figur 1. Logaritmisk inaktivering av de ulike kulturene og den virulente *A. salmonicida*-stammen (AL 2017) etter 60 sekunders kontakttid. Ozonkonsentrasjonen var 0.12 mg/l ved start.

I tillegg til de overnevnte konsentrasjonene ble noen av kulturene (A, C, F og G) testet med høyere ozonkonsentrasjon og lengere eksponeringstid (0.19 mg/l synkende til 0.08 mg/l etter 120 sek.). Kultur A var den eneste som viste noe grad av overlevelse i forhold til utgangspunktet på ca. 10^5 kolonier pr. ml. Det ble her registrert i gjennomsnitt 11 kolonier pr. ml etter 120 sek. eksponering. For de øvrige var det

tilnærmet total desimering (< 10 kolonier pr. ml etter 30 sek. og < 1 pr. ml etter 120 sek.). Dette korresponderer med de overstående testene som også viser at kultur A var mest resistent.

I likhet med de fleste andre kulturrene ble A identifisert som *A. hydrophila*. Imidlertid var identifikasjonen tvilsom ("doubtful profile") i motsetning til de øvrige *A. hydrophila* som i hovedsak fikk karakteristikken "very good identification". A viste avvik på en av de 20 testene, noe som tyder på forskjeller mellom isolatene.

Bruk av membranfilterteknikk og opptelling av grønne kolonier på *Aeromonas* medium base med ampicillin supplement inkubert ved 37°C synes å kunne gi et brukbart bilde på ozoneringseffekten ved settefiskanlegg. Det kan imidlertid bli et problem å få tilstrekkelig vekst i enkelte råvannsprøver. Det anbefales derfor å filtrere større volumer (500 - 1000 ml) enn de som ble benyttet i vår undersøkelse (10 og 100 ml). For råvann er antall kolonier som dannes på mediet trolig avhengig av sted og årstid. For å vinne erfaring og evaluere nytteeffekten bør metoden testes over lengere tid ved flere anlegg.

4. Referanser

APHA-AWWA-WPCF 1989. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 17th edition. Ozone s. 4-162 - 4-165.

Austin B. 1983. Effectiveness of ozone for the disinfection of laboratory effluent. FEMS Microbiology Letters 19, 211-214.

Hektoen H. 1992. Indikatorbakterier for kontroll av desinfeksjonsanlegg for inntaksvann til settefiskanlegg. NIVA notat. 5 s.

Håstein T. 1990. Infeksjoner med *Pseudomonas*. I Fiskehelse. Sykdommer - behandling - forebygging (Red. av T.T. Poppe), s. 161-163.

Liltved H., Hektoen H. and Efraimssen H. (1995). Inactivation of bacterial and viral fish pathogens by ozonation or UV irradiation in water of different salinity. Aquacultural Engineering 14, 107-122.

Liltved H. and Landfald B. (1995). Use of alternative disinfectants, individually and in combination, in aquacultural wastewater treatment. Aquaculture Research 26, 567-576.

Myhr E. 1990. Infeksjoner med bevegelige *aeromonas*bakterier. I Fiskehelse. Sykdommer - behandling - forebygging (Red. av T.T. Poppe), s. 147-151.

Norges Standardiseringsforbund 1990. Vannundersøkelse. Fluorescerende *pseudomonader*, membran- og spredeplatemetoder. NS 4713, 6 s.

Norges Standardiseringsforbund 1989. Vannundersøkelse. Teknikker for kvantitativ bestemmelse av mikroorganismer fra vann, sedimenter og kloakkslam. Generelt utstyr, valg av analyseteknikk, lagring av data. NS 4790 del 1. 27 s.

Storset A. 1991. Desinfeksjon av sjøvann - metode for bakteriologisk kontroll. Norsk Veterinærtidsskrift 103, 1025-1027.

Sugita H., Asai T., Hayashi K., Mitsuya T., Amanuma K., Maruyama C. and Deguchi Y. 1992. Application of ozone disinfection to remove *Enterococcus seriolicida*, *Pasteurella piscicida*, and *Vibrio anguillarum* from seawater. Appl. and Environ. Microbiology 58, 4072-4075.

Wedemeyer G.A. and Nelson N.C. 1977. Survival of two bacterial fish pathogens (*Aeromonas salmonicida* and Enteric redmouth bacterium) in ozonated, chlorinated, and untreated waters. Jour. Fish. Res. Board Can. 34, 429-432.

Wedemeyer G.A., Nelson N.C. and Smith C.A. 1978. Survival of the salmonid viruses infectious hematopoietic necrosis (IHNV) and infectious pancreatic necrosis (IPNV) in ozonated, chlorinated, and untreated waters. Jour. Fish. Res. Board Can. 35, 875-879.

Norsk institutt for vannforskning

Postboks 173 Kjelsås
0411 Oslo

Telefon: 22 18 51 00
Telefax: 22 18 52 00

Ved bestilling av rapporten,
oppgi løpenummer 3405-96

ISBN 82-577-2936-1