

**Postsmolt – Del E:
Effekter på helse, sykdom og velferd ved optimalisert
postsmoltproduksjon i lukkede og semi-lukkede anlegg**

Undersøkelser i tre ulike systemer

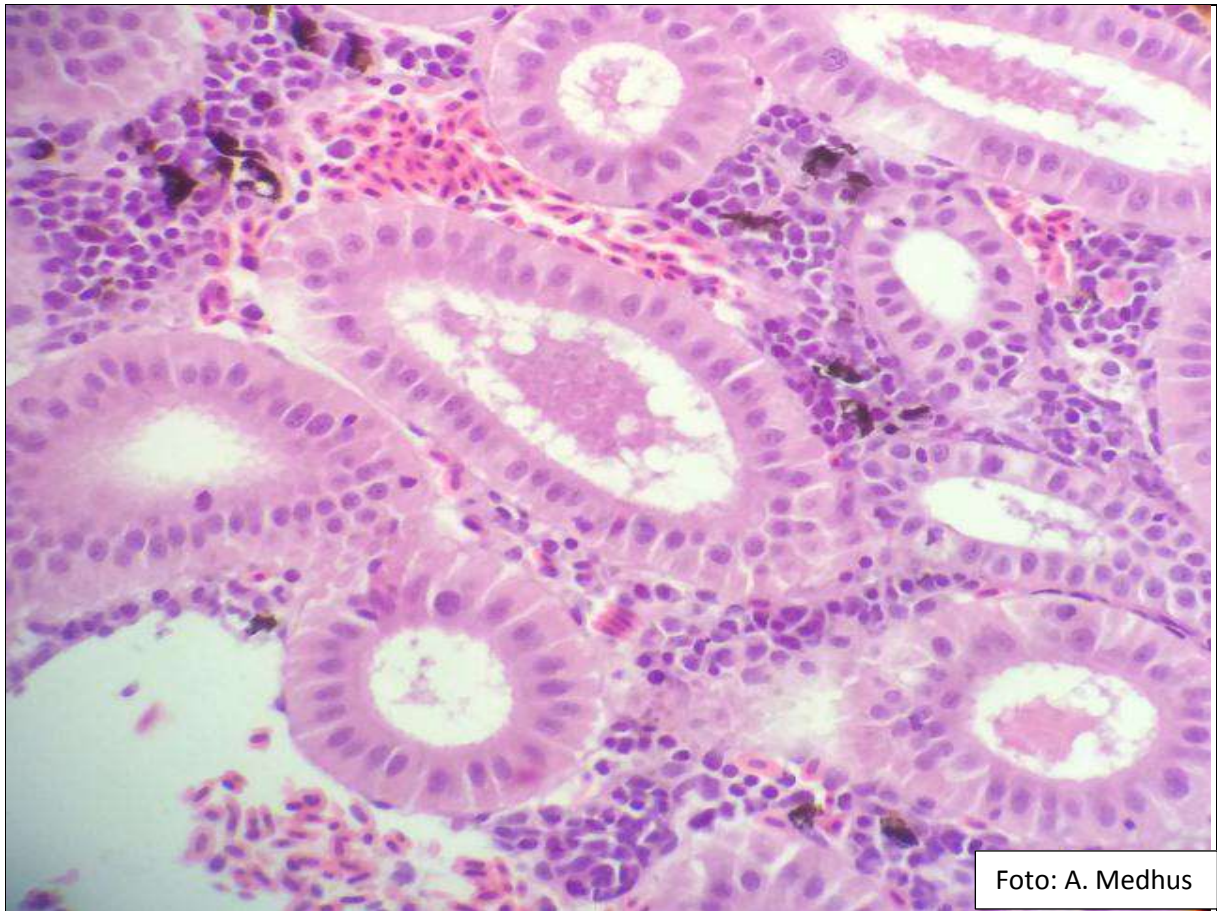
FHF-Prosjektnr. 900826

Agathe Medhus, Ida Rud, Merete Rusås Jensen, Øyvind Vågnes, Jelena Kolarevic, Bendik Fyhn Terjesen, Kari Norheim

Til: Fiskeri- og Havbruksnæringens Forskningsfond (FHF), prosjekt nr. 900826

Fra: Veterinærinstituttet

Dato: 23.3.2015



Sammendrag

Det er gjennomført et FHF-finansiert prosjekt med produksjon av stor smolt i tre anlegg, med ulike lukkede systemer. Ved å forlenge tiden fisken holdes under kontrollerte betingelser i en postsmoltfase, ønsket man å produsere en større og mer robust smolt før utsett i åpne merder i sjø. Dette kan gi kortere total produksjonstid, kortere eksponeringstid i sjøfasen og dermed totalt sett mindre svinn. Oppdrett av større og mer robust smolt i denne type lukkede systemer med kontrollert vanninntak og skjerming mot ytre miljø, er basert på ny teknologi. Det er behov for mer kunnskap om effekter denne teknologien har på helse, sykdom og velferd. Veterinærinstituttets deltakelse i prosjektets Del E («Postsmolt Del E») har hatt fokus på helseutviklingen i de tre ulike systemene. I løpet av testperioden er det undersøkt prøver fra fisk, vann og biofilm fra de tre anleggene. Veterinærinstituttet og Nofima har undersøkt prøvene.

Prosjektet har vært utført i løpet av storskalaproduksjoner i driftsformer med ny teknologi. Det kan derfor finnes faktorer som kan ha spilt en rolle for resultatene, uten at dette kunne fanges opp av undersøkelser Veterinærinstituttet og Nofima har utført i testperioden. På bakgrunn av resultatene fra undersøkelsene alene, kan det ikke trekkes noen sikre konklusjoner når det gjelder hvordan og i hvilken grad de ulike driftsformene har virket inn på helseutvikling hos fisken. Prosjektet vurderes likevel å gi bidra til ny kunnskap på området.

Innledning

Prosjektet Postsmolt Del E, «Effekter på helse, sykdom og velferd ved optimalisert postsmoltproduksjon i lukkede og semi-lukkede anlegg», er en del av et NFR-finansiert prosjekt innen optimalisert postsmoltproduksjon («OPP», NFR-prosjekt 217502/E40). Postsmolt Del E er finansiert av Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF). Prosjektet Postsmolt Del E er tilknyttet en gruppe andre prosjekter som også er en del av «OPP»-prosjektet, og som tar for seg effekt på ytelse og velferd i lukkede anlegg. Prosjektene har blant annet til dels hatt felles prøveuttak og utført målinger på samme individ.

Ny teknologi med utvikling av lukkede systemer som har kontrollerte vanninntak og skjerming mot ytre miljø, er en respons på smitteproblematikk og svinn i produksjon av oppdrettsfisk. Driftsformen gir behov for mer kunnskap både for driftsplaner og regelverksutvikling.

Del E følger helseutviklingen i storskalaproduksjon av atlantisk laks (*Salmo salar*) i tre ulike typer lukkede/semi-lukkede anlegg: Ett RAS («Recirculating Aquaculture System»)-anlegg, lokalitet Adamselv, Lebesby kommune, ett delvis lukket anlegg, lokalitet Smøla i Aure kommune og ett delvis lukket anlegg, lokalitet Molnes, Etne kommune. Planen var å produsere fisk på minst 1 kg, før overføring til konvensjonell matfiskproduksjon.

I en utredning for FHF (Rosten et al., 2011) gir Sintef en oppsummering av ulike løsninger for lukkede anlegg og kommer med forslag til klassifisering av disse i forhold til hvor stor grad av kontroll anlegget gir på rømming, inntaksvann/avløpsvann og vannkvalitet. For å oppnå full grad av lukket anlegg, må det være en form for rensing/desinfeksjon av inntaksvann og avløpsvann. Slike muligheter finnes i dag kun på land. Anlegg i sjø er derfor per i dag ulike typer delvis lukkede anlegg.

Organiseringen av prosjektet

Veterinærinstituttet har vært prosjektleder for det FHF-finansierte prosjektet Postsmolt - Del E «Effekter på helse, sykdom og velferd ved optimalisert postsmoltproduksjon i lukkede og semi-lukkede anlegg» (FHF-prosjektnr. 900826). Dette prosjektet har i organiseringen vært en del av det NFR-finansierte innovasjonsprosjektet «Optimalisert postsmolt-produksjon» («OPP», NFR-prosjekt 217502/E40). Blant andre FHF-finansierte prosjekter som har vært organiserte og samkjørte med OPP-prosjektet kan nevnes

- FHF-900895: PostSmolt - del D: Grenseverdier for karbondioksid for postsmolt i lukkede oppdrettsanlegg.
- FHF-900816: Effekter på helse, sykdom og velferd ved postsmoltproduksjon i semi-lukkede anlegg - Del A: Tetthetstoleranse og vannforbruk.

Involverte i prosjektet

Styringsgruppen: Harald Sveier (Lerøy Seafood Group ASA), Rolv Haugarvoll (Lingalaks AS), Frode Mathisen (Grieg Seafood ASA), Svein Martinsen (Smøla Klekkeri og Settefisk AS), Olav Breck (Marine Harvest ASA).

Observatør: Merethe Bjørgan Schrøder (FHF)

Prosjektleder under planlegging: Øyvind Brune Vågnes (Veterinærinstituttet)

Prosjektleder ved gjennomføring og oppsummering: Reidunn Agathe Medhus (Veterinærinstituttet)

Prosjektleder ved avslutning: Kari Norheim (Veterinærinstituttet)

Prosjektkoordinator: Bendik Fyhn Terjesen (Nofima)

Prøveuttak: Veterinærinstituttet, Nofima, Fiske-Liv, Per Anton Sæther (Marin Helse), Øystein Staveland (Marine Harvest).

Analysar: Veterinærinstituttet i Bergen har vært hovedansvarlig for bakteriologiske og histopatologiske undersøkelser samt PCR-analysar. Nærmere identifisering av bakterier bl.a. ved 16s sekvensering, har vært utført ved Veterinærinstituttet Oslo. PatoGen analyse A/S har på oppdrag fra Veterinærinstituttet Bergen, utført analysar mhp. to agens. Nofima har vært hovedansvarlig for mikrobiota-undersøkelser av prøver fra vann og biofilm (16S rRNA dybdeseqvensering) og har beskrevet undersøkelser og resultatlar av vannprøver og biofilm i rapporten.

Anleggene i prosjektet

I prosjektet beskrives informasjonar knyttet til hvert av de tre anleggene i tre ulike «arbeidspakker»: Anlegget med lokalitet Smøla er beskrevet i arbeidspakke 1 (AP1). Anlegget med lokalitet Molnes er beskrevet i arbeidspakke 2 (AP2). Anlegget med lokalitet Adamselv er beskrevet i arbeidspakke 3 (AP3).

Tabell 1 gir en oversikt over noen utvalgte viktige momenter ved anleggene.

Tabell 1. Oversikt over anleggene i arbeidspakkene.

	Arbeidspakke 1 (AP1)	Arbeidspakke 2 (AP2)	Arbeidspakke 3 (AP3)
Eier	Smøla Klekkeri og Settefisk AS	Marine Harvest ASA	Grieg Seafood ASA
Lokalitet for testanlegg	Smøla	Molnes	Adamselv
Kommune	Aure	Etne	Lebesby
Settefiskanlegg	Sagafoss	Vågafossen	Adamselv
Type anlegg	Delvis lukket	Delvis lukket	RAS
Type vegger	Fleksible vegger	Avstivede vegger	Landbasert
Vanninntak	12 meters dybde	30 meters dybde	Renset
Vannavløp	Via ventiler	Via ventiler/bunnavløp	Renset
Salinitet	Sjøvann/35 ppt	Sjøvann/35 ppt	12 ppt og 22 ppt
Volum	1720 m3	21.000 m3	4 kar á 400 m3
Antall fisk	62.000	200.000	4 x 56.000 +/-6000
Testperiode	16.5.2014 til 27.8.2014	11.11.2013 til 13.5.2014	30.7.2013 til 6.11.2013
Prøveuttaksdato	16.5.2014 16.7.2014 27.8.2014	11.11.2013 24.2.2014 13.5.2014	30.7.2013 2.10.2013 4.11.2013 6.11.2013 (ktr)
Ekstra prøveuttak	Nei	3.2.2014	29.4.2014

Materiale og metode

Prøvetakingsplan for de tre arbeidspakkene

De tre arbeidspakkene var med noen justeringer lagt opp etter samme mal: Totalt antall prøver er prøveantall per prøveuttak multiplisert med antall prøveuttak. En organpakke bestod av prøver fra følgende organer: Hud/muskel, gjelle, hjerte, nyre, pankreas-tarm, milt og lever.

Hvert testanlegg hadde i utgangspunktet tre prøvetakings-tidspunkt: 0-uttak ved utsett til testanlegget, 1-uttak midtveis i testperioden og slutt-uttak i forbindelse med utsett til tradisjonelt, åpent sjøanlegg. Ved hvert prøveuttak ble det tatt prøver fra 30 individer. Prøvene skulle undersøkes ved hjelp av bakteriologisk undersøkelse (prøver fra hud og nyrer) og histopatologisk undersøkelse (prøver fra indre organer, gjeller, hud og muskel). Fra 100 individ (inkludert de første 30 prøvetatte), ble det tatt 100 nyreprøver til PCR-undersøkelser med hensyn på pancreas disease-virus (PD-virus/SAV) og piscint orthoreovirus (PRV). Fra de samme 100 individene ble det også tatt 100 gjelleprøver, hvorav minst 25 ble undersøkt med hensyn på *Paramoeba perurans* og *Branchiomonas cysticola*.

Nofima har vært ansvarlig for prøveuttak, undersøkelser og resultater fra undersøkelser av vannprøver og biofilm (fra ulike overflater) med hensyn på mikrobiota. Nofima har også stått for alle figurene i rapporten. Veterinærinstituttet har stått for tabellene.

Tabell 2 gir en oversikt over felles prøvetakingsplan og planlagte analyser i arbeidspakkene.

Tabell 2. Felles prøvetakingsplan for arbeidspakkene.

	Bakteriologi	Histopatologi	PCR-undersøkelser	Biofilm og vann
Uttak av prøver, totalt antall	30 x 3	30 x 3	100 x 3	5 x 8
Vev/materiale	Hud og nyre	Organpakke	Gjelle og nyre	Biofilm og vann*
Behandling	Utsæd og dyrking på vekstmedier	Formalinfiksering	Fiksering i RNA- <i>later</i> ®	Frysing
Metodikk	Bakteriologi	Histopatologi	PCR	PCR, 16S
Undersøkelser	Generell bakteriologi, fenotypisk og genotypisk analyse	Generell histopatologi	Analyse mhp. PDV, PRV, <i>P. perurans</i> , <i>B. cysticola</i>	Dybdesequensering

* Nofima tok prøver fra vann og biofilm i anlegget på Molnes også utover høsten 2014, etter at selve prosjektperioden var avsluttet.

Tabellene 3, 4 og 5 gir oversikt over prøvetakingene utført i hver arbeidspakke.

Tabell 3. Prøvetaking AP1, Smøla.

Settefiskanlegg	Testperiode i lukket sjøanlegg					Åpent anlegg	
Smolt ferskvann	0-uttak 16. mai 2014	Sjø	1. uttak 16. juli 2014	Sjø	2. uttak 27. august 2014	Sjø	slakting
Tidslinje							

Tabell 4. Prøvetaking, AP2, Molnes.

Settefiskanlegg	Testperiode i lukket sjøanlegg						Sjø	slakting
Smolt 17 ppt, 12 okt til 15. nov	0-uttak 11. november 2013	Sjø	Ekstra uttak 3. februar 2014	Sjø	uttak 24. februar 2014	Sjø		
							Jevnlig prøvetaking biofilm	
Tidslinje								

Tabell 5. Prøvetaking AP3, Adamselv-Loppa.

Smolt	Testperiode i RAS				I sjø		planlagt slakting jan 2015
	400 K 70 g	0-uttak 30. juli	12 ppt RAS 2 x 50 K 70 til 200 g	uttak 2. oktober	12 ppt RAS 2 x 50 K 70 til 200 g	uttak 4. november	
	22 ppt RAS 2 x 50 K 70 til 200 g		22 ppt RAS 2 x 50 K 70 til 200 g		Merd 1 300 g til slakting		
	kontrollgruppe i sjø				uttak 6 nov	Merd 5 og 7	
Tidslinje							

Alle prøver fra fisk ble registrert på individnivå.

For å kunne sette resultatene fra undersøkelsene inn i et noe større perspektiv, var det ønskelig med informasjon om hvordan det gikk med fisken i de tre anleggene etter at testperioden var over. Anleggenes eiere har selv eller vha sine fiskehelsetjenester, på oppfordring fra prosjektleder, bidratt med muntlige og skriftlige opplysninger om dette. Denne informasjonen gjengis under punktet «Spesielle forhold» for anleggene på Smøla og Adamselv og som eget punkt for anlegget på Molnes. Deler av denne informasjonen omtales også i diskusjonen.

Bakteriologisk undersøkelse av prøver fra fisk

Veterinærinstituttets rutiner for bakteriologisk analyse ble fulgt (ME02_0005).

Generell bakteriologisk undersøkelse inkluderte dyrkning på blodagar (22 °C) og blodagar med 2 % salt (15 °C) i totalt sju døgn. For påvisning av bakterier som krever næringsfattige medier, ble det brukt spesialmedier; marine-agar for *Tenacibaculum sp.*, og modifisert Anacker og Ordals-medium (Anacker, Ordal 1959) for *Flavobacterium sp.* Inkubasjonstemp 15 °C i 10 døgn. Alle prøver ble undersøkt to til tre ganger i inkubasjonsperioden.

Prøver fra fisk i kar med redusert salinitet i forhold til sjø, ble dyrket på alle fire forskjellige medier, mens prøver fra fisk i sjø ikke ble dyrket på Anacker og Ordals medium da *Flavobacterium sp* ikke forventes ved så høy salinitet. Vekst av bakterier på blodskåler og blodskåler med 2% salt, ble vurdert etter antall synlige bakteriekolonier, diversitet i kolonityper og grad og type hemolyse. Hemolytiske kolonier og kolonier som gikk igjen i materialet, ble beskrevet og identifisert etter vurdert relevans. Utvalgte kolonier ble i tillegg til fysiologiske og biokjemiske undersøkelser også testet ved hjelp av 16S rRNA-sekvensering. Funn av *Tenacibaculum sp* i prøver fra sår påvist ved histopatologi, ble bekreftet ved hjelp av immunhistokjemi.

Undersøkelse av mikrobiota

Undersøkelsene av mikrobiota er til dels også foretatt utenfor selve testperioden.

Analyse av mikrobiota-sammensetning i Postsmolt E ble utført på totalt 90 utvalgte prøver, fordelt mellom semilukket anlegg ved Smøla Klekkeri og Settefisk (5 prøver), semilukket anlegg ved Marine Harvest Molnes (70 prøver) og fra resirkuleringsanlegg (RAS) ved Adamselv (15 prøver). Ved Molnes ble det samlet inn svaberprøver med svaberkluter fra fire ulike steder langs karveggen ved hvert tidsuttak (februar til mai 2014, og ett uttak i oktober), inklusiv en vannprøve. Noen ekstra vannprøver ble også samlet inn i september og oktober fra sentrum av tanken, perifert i tanken, fra innløp til tanken, og fra sjø utenfor tanken (overflate). Ved Adamselv ble det analysert mikrobiota fra biomedie tatt fra de to Moving Bed Bioreactors (MBBR) og fra vannprøver fra tre ulike tidspunkt (juli, oktober og november). De to RAS-gruppene i forsøket ble kjørt med to forskjellige saltholdigheter (12 ppt eller 22 ppt). Fra Smøla Klekkeri og Settefisk ble det samlet inn fem vannprøver av Nofima ved to uttak, mens svabere sendt fra Veterinærinstituttet til Smøla, ikke ble returnert. Derfor består materialet herfra kun av fem prøver. Alle prøvene ble fryst og lagret etter innsamling. DNA-isolering med MP FastDNA-96 fecal kit med Matrix E (MP Biosystem) ble utført på bakteriell pellet opparbeidet etter stomacher behandling og/sentrifugering. Mikrobiota-analysene baserte seg på dybdesekvensering av bakterienes 16S rRNA gen (variabelt område 4) med protokoll fra Caparaso et al. (2010a). Forarbeid før dybdesekvensering innebar triplikate PCR'er med barkedede primere, gelelektroforese, rensing av PCR-produktene (AMPure XP Agencourt, kvantifisering (Picogreen, Invitrogen) og tillaging av en ekvivalent samleprøve, rensing, samt kvantifisering. Dybdesekvenseringen ble utført på Miseq (Illumina) med "paired ends" (2X150 bp). Dataprosesseringen ble gjort med programmet Quantitative insight into microbial ecology (QIIME) versjon 1.7 og 1.8 (Caparaso et al., 2010b).

Etter kvalitetsfiltrering ($q > 30$) ble over 7 millioner sekvenser taksonomisk bestemt i Operational Taxonomic Units (OTUs) basert på mer enn 97 % sekvenslikhet med OTUs i Greengenes database (gg_13_8) eller *de novo*. Totalt >50 000 unike OTU'ider (unike bakterier) ble detektert, hvor de gruppene som utgjorde <0.05 % av totalen ble filtrert vekk. Beta diversitet (forskjell i mikrobiell sammensetning) ble analysert i Qiime, mens videre analyser på taksonomi ble utført i Excel og Unscrambler X 10.2 (hovedsakelig Principal Component Analyse, PCA). Det skal spesifiseres at påvisning av mikrobenes kun er relative (%) i forhold til total mikrobiota, og ikke forteller noe om absolutte mikrobetall.

Histopatologisk undersøkelse av vevsprøver fra fisk

Veterinærinstituttets rutiner for prosessering av vevssnitt ble fulgt.

Biter av gjelle, muskel, hud, hjerte, lever, pankreas-tarm, milt og nyre ble fiksert på formalin og senere fremført til HE-fargede histologiske snitt som ble undersøkt med lysmikroskop for histopatologiske vevsforandringer. Enkelte funn ble fulgt opp vha immunhistokjemi eller PCR-analyser av nyre/gjelleprøver.

Analyse av prøver fra fisk ved hjelp av PCR

Gjelle- og nyrevev ble samlet inn fra ca. 100 fisk i hver gruppe og lagret på RNA-later®. Prøvene ble undersøkt mhp. forekomst av PD-virus og piscint orthoreovirus (PRV). I tillegg ble prøver fra hver gruppe undersøkt mhp. amøben *Paramoeba perurans* og gjellebakterien *Branchiomonas cysticola*. Det ble vurdert som tilstrekkelig å undersøke 25 prøver pr. gruppe mhp. sistnevnte agens.

Prøvekvalitet ble testet med elongeringsfaktor EF1A_B:

FP: TGCCCCTCCAGGATGTCTAC

RP: CACGGCCCACAGGACTG

Probe FAM MGB: CCAATACCGCCGATTTT

Piscint orthoreovirus (PRV)

Etter preparering av prøvemateriale, ekstraheres RNA, og et definert fragment av PRV-genomet på 59 basepar amplifiseres ved hjelp av to spesifikke primere i en sanntids ett-trinns RT-PCR der cDNA syntese og oppformering av PCR-produkt foregår i et lukket system. Dannelse av PCR-produkter måles på slutten av hver PCR-syklus (sanntid) ved hjelp av en MGB-probe merket med FAM som reporter og NFQ som quencher. Proben binder seg mellom de to spesifikke primerne.

Det målte signalet vil etter et visst antall sykluser overstige bakgrunns-signalet (baseline), forutsatt at prøven inneholder templat.

Antall sykluser som må til for å passere denne grensen kalles Ct-verdi. Prøver med Ct-verdier lavere eller lik 38 er regnet som positive, men i området større enn 38 og mindre enn 40 er prøvene definert som inkonklusive og det blir utført ny RNA-ekstraksjon og ny PCR-undersøkelse.

Forward primer: 5' - TGCTAACACTCCAGGAGTCATTG - 3'

Reverse primer: 5' - TGAATCCGCTGCAGATGAGTA - 3'

MGB-probe: 5'FAM - CGCCGGTAGCTCT -NFQ3'

Pancreas diseasevirus (PD-virus/SAV)

Denne metoden fanger opp alle kjente subtyper.

Etter preparering av prøvemateriale, ekstraheres RNA. Deretter amplifiseres QnsP1-genet som er et definert fragment av SAV på 107 basepar. Det brukes to spesifikke primere i en sanntids ett-trinns RT-PCR der cDNA-syntese og oppformering av PCR-produkt foregår i et lukket system.

Dannelse av PCR-produkter måles på slutten av hver PCR-syklus (sanntid) ved hjelp av en MGB-probe merket med et fluoriserende FAM-molekyl i 5'-ende og MGB i 3'-ende. Proben binder seg mellom de to spesifikke primerne. Det målte signalet vil etter et visst antall sykluser overstige bakgrunnssignalet (baseline), forutsatt at prøven inneholder templat. Det antall sykluser som må til for å passere denne grensen kalles Ct-verdi.

Forward primer, QnsP1-F: 5'-CCG-GCC-CTG-AAC-CAG-TT-3' (17)

Reverse primer, QnsP1-R: 5'-GTA-GCC-AAG-TGG-GAG-AAA-GCT-3' (21)

QNSp1-PROBE: 5'FAM-CTG-GCC-ACC-ACT-TCG-A-3'-MGB (16)

Paramoeba perurans («gjelleamøbe»)

Etter preparering av prøvemateriale, ekstraheres RNA. Det brukes to spesifikke primere i en sanntids ett-trinns RT-PCR der cDNA-syntese og oppformering av PCR-produkt foregår i et lukket system.

Dannelse av PCR-produkter måles på slutten av hver PCR-syklus (sanntid) ved hjelp av en MGB-probe merket med et fluoriserende FAM-molekyl i 5'-ende og MGB i 3'-ende. Proben binder seg mellom de to spesifikke primerne. Det målte signalet vil etter et visst antall sykluser overstige bakgrunnssignalet (baseline), forutsatt at prøven inneholder templat. Det antall sykluser som må til for å passere denne grensen kalles Ct-verdi.

Nperu Forward primer: 5` - GTTCTTTCGGGAGCTGGGAG- 3'

Nperu Reverse primer: 5` - GAACTATCGCCGACAAAAG- 3'

Nperu MGB probe: 5` - FAM - CAATGCCATTCTTTTCGGA-NFQ- 3'

De fleste gjelleprøvene er undersøkt ved Veterinærinstituttet i Bergen og Oslo. Inntil 25 gjelleprøver pr. sak i åtte saker er undersøkt ved PatoGen Analyse AS.

Branchiomonas cysticola

PCR-analyser av gjelleprøver med hensyn på *Branchiomonas cysticola* ble utført av PatoGen Analyse A/S, etter oppdrag fra Veterinærinstituttet.

Resultater

Mikrobiota ved de ulike anleggene, samlet.

Mikrobiotaen ved de ulike anleggene og i de ulike prøvematerialene ble sammenlignet med beta diversitets analyse (Fig. 1). Mikrobiotaen ved det semilukkede anlegg på Molnes (AP2) skilte seg klart fra mikrobiotaen påvist i RAS ved Adamselv (AP3) (Fig. 1A). Mikrobiotaen i vannprøvene fra det semilukkede anlegget på Smøla (AP1) overlappet noe med mikrobiotaen til noen av vannprøvene fra samme klasse anlegg på Molnes. Det var også en klar forskjell i mikrobiota mellom vannprøver og biofilmprøver vist i Fig. 1B.

Denne forskjellen var mer utpreget i de semi-lukkede anleggene, enn i RAS hvor forskjellen mellom prosessvannet og biofilmen i biofilteret var mindre. En forskjell i biofilm mikrobiota fra oktober kontra tidligere i forsøksperioden ved Molnes er indikert.

Fig. 1A)

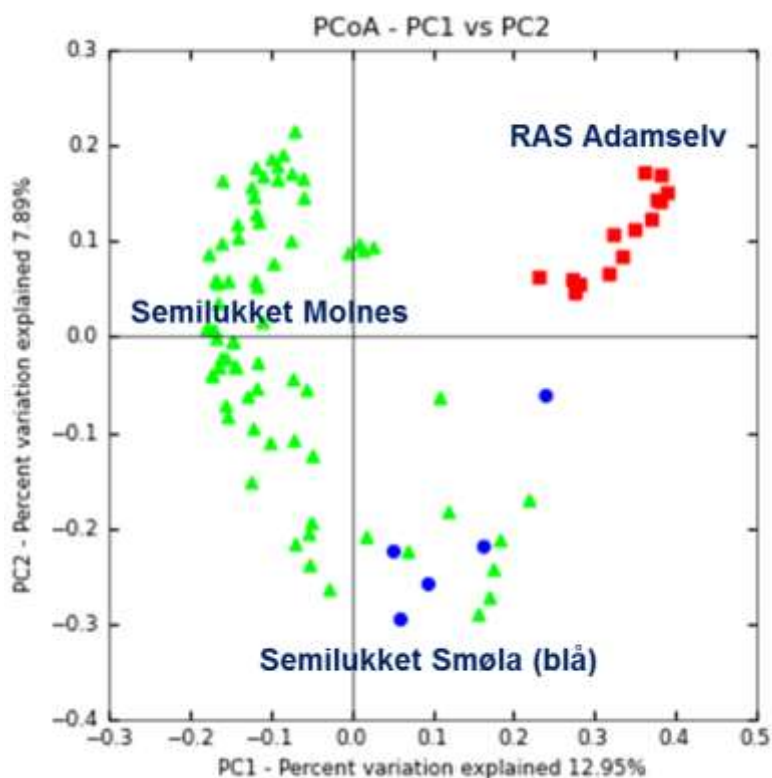


Fig. 1B)

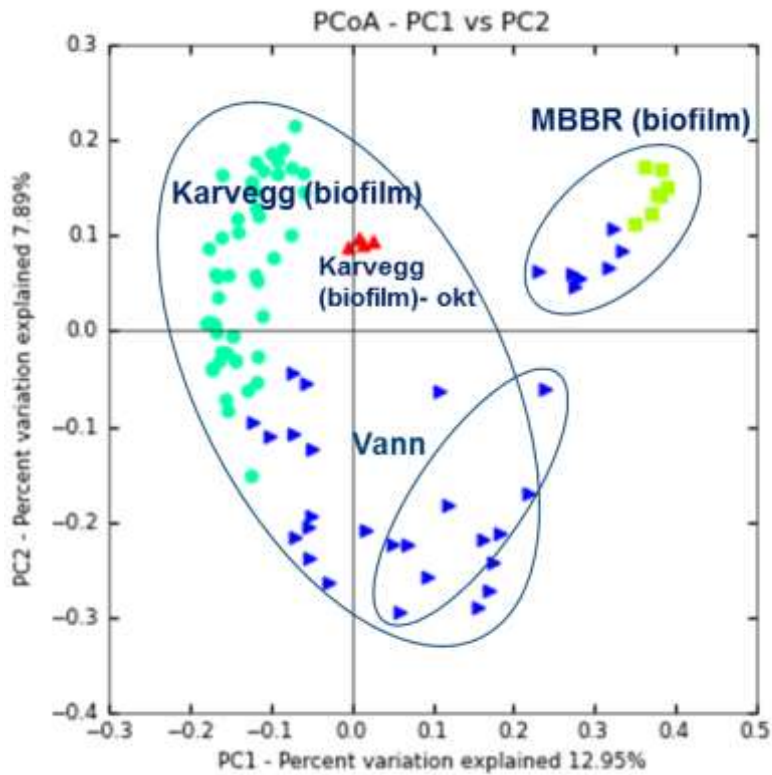


Fig.1: Variasjon i mikrobiota mellom ulike lokaliteter (A) og ulike prøvemateriale (B) basert på beta diversitets analyse (uvektet). A) Semilukket Molnes (grønn), RAS Adamselv (rød), Semilukket Smøla (blå). B) Lokalitet som i A er ringet ut, mens prøvemateriale er farget: karvegg biofilm semi-lukket anlegg i Molnes februar-mai (turkis) og oktober (rød), Adamselv RAS MBBR biofilm (grønn) og alle vannprøver (blå).

AP1: Smøla Klekkeri og Settefisk, Smøla.

Forsinket utsett av fisk i forhold til opprinnelig plan ga en kortere testperiode enn planlagt og sluttuttaket ble utsatt fra 6.8. 2014 til 27.8.2014. Undersøkellesperiode ble derfor fra 16. mai til 27. august, 2014. Det ble i forkant av utsett påvist hemorragisk smoltsyndrom (HSS) hos individer i settefisk-populasjonen.

Spesielle forhold

Testlokaliteten på Smøla ligger i et område med relativt grunt vann, og det var ikke mulig å få til et vanninntak dypere enn 12 meter. Det var også en utfordring å sikre ønskelig grad av oksygenering av vannet.

Eier har selv bidratt med opplysninger om hvordan det gikk med fisken etter at testperioden ble avsluttet 27.8.2014. Noe av denne informasjonen oppsummeres her:

Testfisken i posen fikk påvist AGD i slutten av august 2014, etter å ha stått i posen siden juni. I løpet av kort tid etter AGD-påvisingen, ble all fisken i posen behandlet med ferskvann og satt tilbake på lokaliteten. Det ble søkt om å flytte fisken fra lokaliteten på Smøla til lok. Gaustad på Eide. Det ble etter hvert innvilget. På flyttetidspunktet var fisken fri for AGD etter et omfattende screeningprogram, fisken hadde ikke da og hadde heller ikke tidligere under hele oppholdet i posen hatt lakselus.

Det opplyses videre at det av ulike grunner likevel ikke lot seg gjøre å flytte «posefisken» til en ny lokalitet og det ble derfor besluttet å slakte fisken. Fisken var «frisk og fin» med en slaktevekt på ca 400g. En omfattende screening forut for slaktingen viste ingen funn av AGD eller PD-virus.

Tabell 6 viser en oversikt over antall undersøkte prøver i testperioden i AP1, Smøla.

Tabell 6: Oversikt over antall undersøkte prøver i testperioden, AP1, Smøla.

Del av forsøket		Salinitet	Antall prøver til bakteriologisk undersøkelse	Antall prøver til histopatologisk undersøkelse	Antall prøver til molekylærbiologisk undersøkelse
16.05.2014	0-uttak	ferskvann	30	30	100
16.07.2014	1. uttak	sjøvann	30	30	30
27.08.2014	2. uttak	sjøvann	30	30	100

Spesielle tilpasninger

Forsinket utsett i forhold til plan ga en kortere testperiode enn planlagt selv om sluttuttaket også ble utsatt. Antall undersøkte gjelleprøver vha PCR mhp. *Branchiomonas cysticola* ble begrenset til 25 prøver pr. uttak.

Bakteriologisk undersøkelse

Det første prøveuttaket («0-uttaket») ble utført 16.5.2014. Tredve settefisk ble prøvetatt i ferskvannsanlegget. Av spesifikke bakterier ble det i hudprøvene identifisert bevegelige *Aeromonas* sp i 2 /30 prøver, *Pseudomonas* sp i 1/30 prøver og *Vibrio logei* i 1/30 prøver.

Det neste prøveuttaket ble utført to måneder senere, den 16.7.2014. Det ble tatt prøver fra fisken som nå var overført til sjøvann. I prøvene ble det funnet *Vibrio* sp i 1/30 undersøkte hudprøver.

Det siste prøveuttaket i testperioden ble utført den 27.8.2014. Det ble tatt prøver fra 30 fisk. Bakteriologiske undersøkelser viste funn av *Vibrio splendidus* i 5/30 prøver og *Vibrio sp* i 5/30 prøver. Det ble ikke påvist bakterievekst i noen av nyreprøvene gjennom hele testperioden. Resultatene fra bakteriologisk undersøkelse av prøvene i AP1 er oppsummert i tabell 7.

Tabell 7. Bakteriologiske resultater for arbeidspakke 1: Smøla Klekkeri og Settefisk, Smøla

Resultater fra undersøkelse av prøver fra hud		Settefiskanlegg	Testanlegg		
		Prøveuttak 16.5.2014 Sak 2014-50-788/F293	Prøveuttak 16.7.2014 Sak 2014-50- 1045/F450	Prøveuttak 27.8.2014 Sak 2014-50- 1155/F525	
			0- uttak ferskvann	1. uttak sjø	2. uttak sjø
			N=30	N=30	N=30
Ikke påvist kolonier		23 %	0 %	7 %	
Påvist 3-10 kolonier		70 %	10 %	37 %	
Påvist 10-25 kolonier		7 %	47 %	30 %	
Påvist >25 kolonier		0 %	43 %	27 %	
Vurdering av vekst					
		N=23	N=30	N=28	
Variasjon kolonier	1	4 %	0 %	4 %	
	2	35 %	13 %	14 %	
	3+	61 %	87 %	82 %	
Grad av hemolyse	ingen	70 %	3 %	21 %	
	svak	13 %	17 %	7 %	
	klar	17 %	80 %	71 %	
Nærmere identifiserte bakterier					
		N=30	N=30	N=30	
Hud	Bevegelig <i>Aeromonas sp</i>	2 av 30	Ikke påvist	Ikke påvist	
	<i>Pseudomonas sp</i>	1 av 30	Ikke påvist	Ikke påvist	
	<i>Shewanella sp</i>	Ikke påvist	Ikke påvist	Ikke påvist	
	<i>Vibrio logei</i>	1 av 30	Ikke påvist	Ikke påvist	
	<i>Vibrio sp</i>	Ikke påvist	1 av 30	5 av 30	
	<i>A. wodanis</i>	Ikke påvist	Ikke påvist	Ikke påvist	
	<i>V. splendidus</i>	Ikke påvist	Ikke påvist	5 av 30	
	<i>Tenacibaculum sp</i>	Ikke påvist	Ikke påvist	Ikke påvist	
Nyre	Individ med funn	Ikke påvist	Ikke påvist	Ikke påvist	

Tabell 7. I tabellen beskrives koloniers vekstintensitet og hemolysegrad: Vekstmedier med påvist primærvekst er blitt videre vurdert i forhold til variasjon av type kolonier og total grad av hemolyse på vekstmedier. Variasjon i type kolonier på primært vekstmedium er inndelt i kategoriene 1,2 og 3+, hvorav 1 betyr minst grad av variasjon og 3+ størst. Den nederste delen av tabellen beskriver de endelige diagnosene.

Tabell 8. Resultater fra PCR-analyse av prøver fra Smøla.

Prøveuttak lokalitet/sak nr	Agens	Agens	Agens	Agens
Smøla	PD-virus	PRV	<i>Paramoeba perurans</i>	<i>Branchiomonas cysticola</i>
0-uttak/F293/14	Ikke påvist	Ct-verdier 19,9-34,8	Ikke påvist	Ikke påvist
1.uttak/F450/14	Ikke påvist	Ct-verdier 24,0-30,0	Ikke påvist	Påvist
2.uttak/F525/14	Ikke påvist	Ct-verdier 25,6-31,1	Påvist	Påvist

AP2: Marine Harvest ASA, Molnes, Skånevik.

Undersøkellesperiode var fra 11.november 2013 til 13. mai 2014. Settefisken som skulle settes ut i tanken på Molnes hadde noe sår og finne-erosjoner ved 0-uttaket. Dette ble ikke funnet igjen i sjøfasen. I løpet av vinteren ble det påvist *Paramoeba perurans* i dette anlegget gjennom helsetjenestens screening. Dette medførte et ekstra oppfølgings-prøveuttak den 3.2.2014 (ikke detaljert beskrevet i denne rapporten).

Tabell 9 gir en oversikt over prøver tatt i de ulike prøveuttakene.

Tabell 9: Oversikt over planlagte prøveuttak i AP2, Molnes.

Del av forsøket		Salinitet	Antall prøver til bakteriologisk undersøkelse	Antall prøver til histopatologisk undersøkelse	Antall prøver til molekylærbiologisk undersøkelse
11.11.2013	0-uttak	17 ppt	30	30	98
24.02.2014	1. uttak	sjø	30	30	100
13.05.2014	2. uttak	sjø	30	30	100

Spesielle tilpasninger

Ferdigstillingen av det semi-lukkede anlegget på lok. «Molnes» i Skånevik, Etne kommune, ble noe forsinket. Derfor ble kontrollgruppen satt i sjø den 12. oktober 2013, noe som var ca en måned før testgruppen kunne overføres til sitt anlegg 15. til 17.november. I perioden før utsett mellom 12. oktober og 17. november, ble testgruppen holdt på 17 ‰ i settefiskanlegget på Vågafossen. Kontrollgruppe og testgruppe er derfor mindre sammenlignbare enn det man i utgangspunktet ønsket. Mot slutten av denne perioden gikk fisken noe tettere enn planlagt. Det ble tatt prøver fra vann og biofilm mhp. mikrobiota også etter at testperioden for fisken ble avsluttet den 13.5.2014.

Bakteriologisk undersøkelse

Generelt ble det påvist lite vekst av andre bakterier enn normalflora i de undersøkte hudprøvene i AP2 lok. Molnes.

Det ble ikke påvist vekst av bakterier i noen av de undersøkte nyreprøvene.

I 0-uttaket av settefiskene ble det sett finne-erosjoner og sår hos noen av de 30 prøvetatte fiskene. I dette uttaket, som ble utført den 11.11.2013, ble det påvist hhv. *Vibrio splendidus* i prøver fra 2 av 30 fisk, *Tenacibaculum* sp i prøver fra 10 av 30 fisk og *Shewanella* sp i prøver fra 3 av 30 fisk.

Det andre prøveuttaket i testperioden ble utført den 24.2.2014. Det ble tatt prøver fra 31 fisk. Det ble ikke påvist bakterier i noen av nyreprøvene. I prøvene fra hud ble det påvist *Shewanella* sp i prøver fra 8 av 31 fisk, *Pseudoalteromonas* sp i prøver fra 21 av 31 fisk og *Tenacibaculum* sp i prøve fra 1 av 31 fisk.

Det tredje og siste prøveuttaket i testperioden ble utført den 13.5.2014. I dette uttaket ble det tatt prøver fra 30 fisk. I dette prøveuttaket ble det påvist bakterievekst i hudprøve fra 1 av 30 fisk. I denne prøven ble det påvist *Shewanella* sp. Det ble ikke funnet bakterier i noen av de undersøkte nyreprøvene.

En oversikt over resultatene fra bakteriologisk undersøkelse av fisk i de tre prøveuttakene gis i tabell 10. I tabellen beskrives koloniers vekstintensitet og hemolysegrad: Vekstmedier med påvist primærvekst er blitt videre vurdert i forhold til variasjon av type kolonier og total grad av hemolyse på vekstmediet. Variasjon i type kolonier på primært vekstmedium er inndelt i kategoriene 1,2 og 3+, hvorav 1 betyr minst grad av variasjon og 3+ størst. Den nederste delen av tabellen beskriver de endelige diagnosene.

Tab. 10: Resultater fra bakteriologisk undersøkelse av prøver i AP 2, lok. Molnes.

Resultater fra undersøkelse av prøver	Settefiskanlegg	Testanlegg	
	Prøveuttak 11.11.2013 Sak 2013-50- 2134/F577	Prøveuttak 24.2.2014 Sak 2014-50- 352/F119	Prøveuttak 13.5.2014 Sak 2014-50- 757/F280
	0- uttak 17ppt	1. uttak sjø	2. uttak sjø
	N=30	N=31	N=30
Ikke påvist kolonier	17 %	0 %	90 %
Påvist 3-10 kolonier	53 %	23 %	10 %
Påvist 10-25 kolonier	13 %	57 %	0 %
Påvist >25 kolonier	17 %	20 %	0 %

Vurdering av vekst		N=25	N=31	N=30
Variasjon kolonier	1	24 %	3 %	33 %
	2	24 %	27 %	67 %
	3+	52 %	70 %	0 %
Grad av hemolyse	ingen	68 %	43 %	33 %
	svak	0 %	57 %	67 %
	klar	32 %	0 %	0 %
Nærmere identifiserte bakterier		N=30	N=31	N=30
Hud	<i>Shewanella</i> sp	Påvist 3 av 30	Påvist 8 av 31	Påvist 1 av 30
	<i>Pseudoalteromonas</i> sp	Ikke påvist	Påvist 21 av 31	Ikke påvist
	<i>Vibrio splendidus</i>	Påvist 2 av 30	Ikke påvist	Ikke påvist
	<i>A. wodanis</i>	Ikke påvist	Ikke påvist	Ikke påvist
	<i>Tenacibaculum</i> sp (T2)	Påvist 10 av 30	Påvist 1 av 31	Ikke påvist
Nyre	Individ med nyrefunn	0 av 30	0 av 31	0 av 30

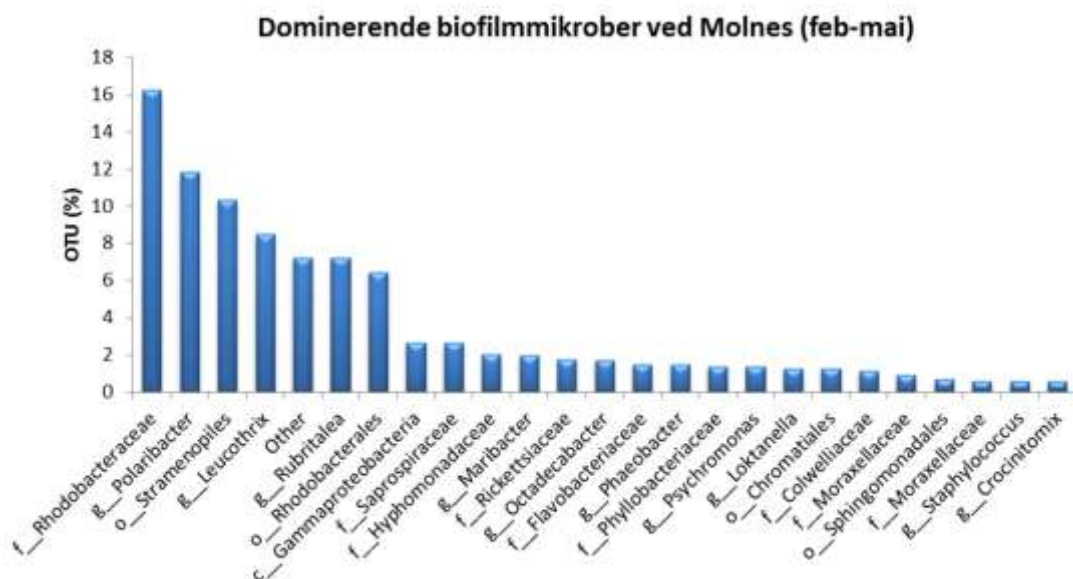


Fig. 4. Dominerende biofilm-mikrober (OTU) ved Marine Harvest Molnes i tidsrommet februar til mai. OTU med relativ gjennomsnittlig andel >0.5 % av totalen, er inkludert. Taksonomisk nivå er indikert: g, genus; f, familie, o, orden.

Mikrobiota i vannprøver fra det semi-lukkede anlegget på Molnes ble analysert med PCA og viste også endringer over tid (Fig. 5). PC1 skilte hovedsakelig mellom prøver fra perioden februar-mai og september-oktober. En rekke bakterier ble påvist i prøver fra siste perioden, deriblant *Flavobacterium* som har patogene arter (f.eks. *Flavobacterium psychrophilum*). Dette må eventuelt undersøkes nærmere, da med andre metoder.

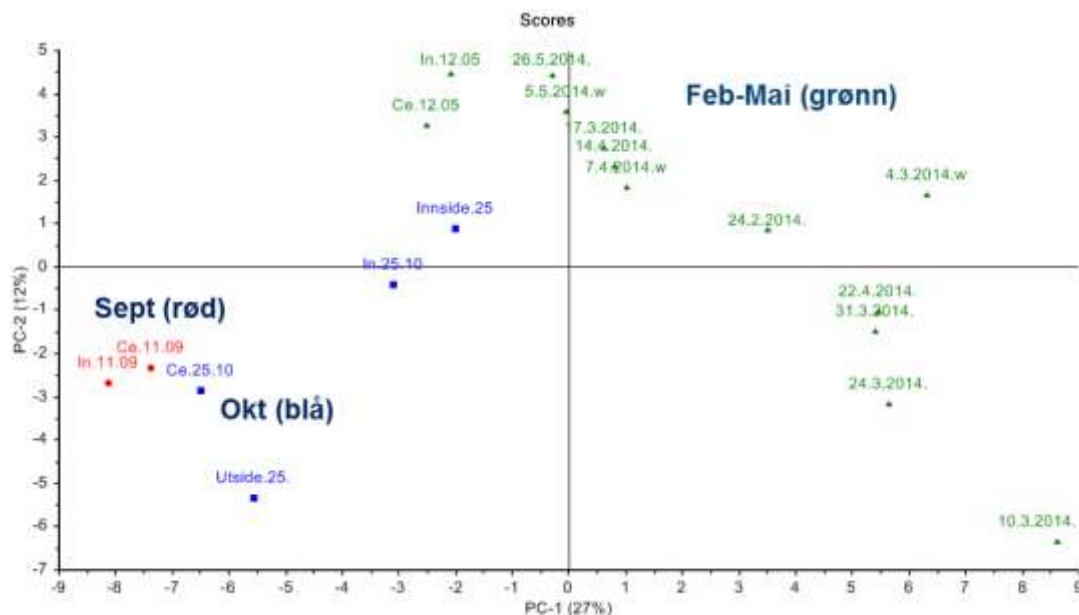


Fig. 5. PCA score plott av vannmikrobiota i prøver fra Molnes. Vektet PCA er utført på genus nivå. Måned/dato er indikert. In: Inløp, Ce: senter i tanken, Inside: perifert inne i tanken, Utside: vannprøve tatt fra overflate utenfor tanken.

Potensielle patogener i Molnes anlegget ble selektivt undersøkt basert på deres betydning for fiskehelse (Fiskehelserapporten fra 2013, Veterinærinstituttet): *Moritella viscosa* og *Tenacibaculum sp* (vintersår), *Yersinia ruckeri*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Photobacterium*, *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Psychrobacter*, *Polaribacter*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas salmonicida* og *Pasteurella sp*. *Shewanella* ble i tillegg også inkludert. Relative nivåer av potensielle patogener påvist i Molnes anlegget er vist i Fig. 6. *Polaribacter* var stort sett dominerende gjennom hele forsøksperioden, men ble redusert i september og oktober. *Flavobacterium* ble i all hovedsak detektert i vannprøver i september og oktober. *Tenacibaculum* ble påvist i flere vannprøver, men ble påvist til å utgjøre ca 6 % av biofilmen i oktober. *Vibrio sp* var dominerende i en vannprøve i oktober.

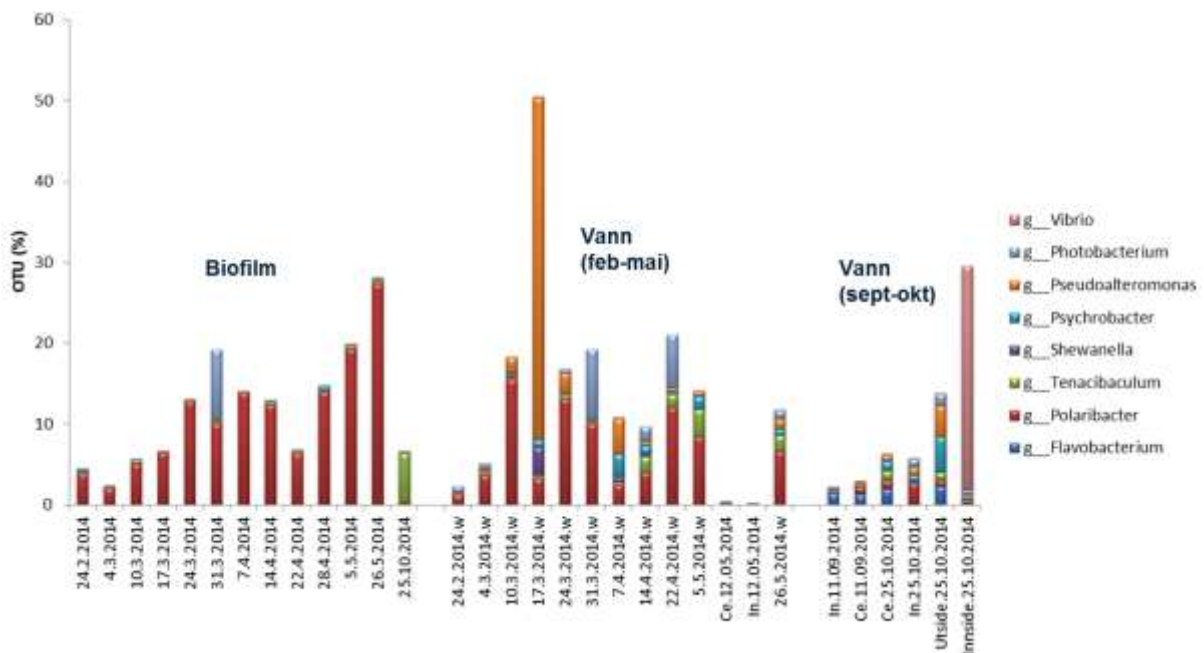


Fig. 6. Potensielle patogener i biofilm og vannprøver fra Molnes anlegget. Biofilmprøvene er basert på gjennomsnittet av fire svaberprøver per tidsuttak. Taksonomisk nivå er genus (g).

Histopatologisk undersøkelse

Undersøkelse av gjelleprøver i 0-uttaket viste bare ubetydelige vevsforandringer. I prøvene som ble gjort i et ekstra prøveuttak i begynnelsen av februar i forbindelse med påvisning av AGD tidligere på vinteren, var det AGD-typiske endringer i 70 % av de undersøkte prøvene. Ved ordinært uttak tre uker senere, var andelen slike endringer sunket til 33 %. I prøvene fra sluttuttaket i mai ble det også påvist slike vevsforandringer, men kun i sparsom grad. Undersøkelse av nyreprøver viste et svakt stigende antall prøver med røde blodlegemer i nyretubuli fra 0-uttak til første og andre uttak i sjø. Histopatologisk undersøkelse ga resultater som sammenligningsvis muligens kan indikere en svakt økende grad av proteinholdig materiale i nyrets ekskresjonssystem utover i testperioden. Det ble påvist granulomatøs peritonitt som med svært stor sannsynlighet er vaksineindusert.

Analyse ved hjelp av PCR

Det ble ikke påvist PD-virus i prøvene fra Molnes.

Ct-verdiene for PRV var høyere i prøvene i 0-uttaket enn i prøvene fra de to påfølgende prøveuttakene.

Det ble påvist *Paramoeba perurans* i prøvene i første ordinære prøveuttak den 24.2.2014.

Det ble ikke påvist *Branchiomonas cysticola* i noen av de undersøkte prøvene.

En oversikt over PCR-resultatene fra ordinære uttak er gitt i tabell 11.

Tabell 11. Resultater fra PCR-analyser av prøver fra lok. Molnes, Skånevik.

Prøveuttak lok/sak nr	Agens	Agnes	Agens	Agens
Molnes	PDV	PRV	<i>Paramoeba perurans</i>	<i>Branchiomonas cysticola</i>
0-uttak/F577/13	Ikke påvist	Ct-verdier 37,1-37,8	Ikke påvist	Ikke påvist
1.uttak/F119/14	Ikke påvist	Ct-verdier 18,9-38,9	Påvist	Ikke påvist
2.uttak/F280/14	Ikke påvist	Ct-verdier 19,9-34,4	Ikke påvist	Ikke påvist

Hvordan gikk det med fisken på lok. Molnes etter testperioden?

Fra eier er det gitt følgende kommentarer til hvordan det gikk med testfisken på Molnes etter at testperioden var avsluttet: «Etter avsluttet prosjektperiode holdt dødeligheten seg svært lav. Noe innslag av lus ble registrert utover vinteren og våren 2014 og det ble tilsatt rensefisk for å holde nivåene under maksimal grense på 0,5 voksne hunnlus. Medio september oppstod det en episode med akutt dødelighet, trolig relatert til påvirkning av toksiske alger som skadet gjellene til fisken. Det ble etter hvert påvist ulike gjelleagens, samt sykdommen AGD, og dødeligheten tiltok igjen. Forsøksvis behandling med redusert dose vannstoffhyperoksyd medførte ytterligere tap av fisk, trolig grunnet svært påkjente gjeller. Det ble derfor besluttet å ta ut fisken (størrelse ca. 2 kg), primært utfra velferdshensyn».

AP3: Grieg Seafood ASA, Adamselv.

Testperioden varte fra 30.7. 2013 til 6.11.2013.

Denne arbeidspakken inkluderte to testgrupper på forskjellig salinitet/saltkonsentrasjon, hhv. 12 ppt og 22 ppt. Arbeidspakken inkluderte også en kontrollgruppe som ble prøvetatt i forbindelse med sjøsettingstidspunkt for fisken i RAS-anlegget.

Spesielle tilpasninger

På grunn av stor biomasse og høy utforing ble det i det nye anlegget på Adamselv en utfordring å justere CO₂-konsentrasjonen. Testfisken ble eksponert for stigende salinitet opp til hhv. 12ppt og 22 ppt, i tiden 10.8 til 16.8.2013.

Den 29. april 2014 ble det gjort et ekstra prøveuttak utenom den planlagte testperioden, som en del av oppfølgingen av et sykdomsutbrudd på lok. «Olaneset» i Loppa. Det ble i dette uttaket tatt organprøver som ble fiksert i formalin samt prøver til bakteriologisk undersøkelse av fisken, for å følge opp forøket dødelighet av testfisken. Det ble ikke tatt prøver til PCR-analyse eller prøver fra vann og biofilm i dette ekstrauttaket. Det ble ikke tatt ut prøver til analyser av biofilm og vann i dette prøveuttaket.

Spesielle forhold

Testfisken fra RAS-anlegget ble transportert med båt fra Adamselv i Lebesby kommune, til lok. Olaneset i Loppa kommune. Sjøsetting av testfisken fra RAS-anlegget ble fremskyndet til hhv. 10. og 22. november 2013, for å håndtere et utbrudd av *Yersinia ruckeri* i anlegget. På grunn av uvær gikk det 12 dager mellom de to utsettene på lokaliteten i Loppa. Det var dårlig vær både under transport og utsett. Fisken som ble transportert fra RAS-anlegget var i gjennomsnitt ca 400 g. Gruppen av fisk som hadde gått på 12 ppt salinitet i RAS-anlegget ble satt i sjøen i merd nr. 3. Gruppen av fisk som hadde gått på 22 ppt salinitet i RAS-anlegget ble satt i sjøen i merd nr. 4. Gruppen med kontrollfisk hadde stått sjøen i merd nr. 5 fra 15. august året før.

Fisken som stammet fra RAS-anlegget utviklet sår. Kort tid etter utsett i sjø begynte den å dø. I begge de to merdene som inneholdt fisk fra RAS-anlegget, ble dødeligheten høy relativt kort tid etter utsett. I følge anleggseier døde det «betydelig mer» fisk i gruppen av fisk som hadde gått på 22 ppt salinitet, enn i gruppen som hadde gått på 12 ppt salinitet i RAS-anlegget. I de to merdene med RAS-fisk døde det etter hvert så mange at de gjenlevende fiskene ble satt sammen i en merd. Dødeligheten i kontrollgruppen som var satt i sjøen ca tre måneder før, var svært liten i forhold. Det ble ikke sett sår hos fisken i kontrollgruppen.

Etter hvert har vektforskjeller mellom de gjenlevende RAS-fiskene og kontrollfisken jevnet seg ut. Fiskehelsetjenesten regner med at vektforskjellene mellom fisk fra RAS-anlegget og fisk i kontrollgruppen vil være liten på slaktetidspunkt.

Tabell 12 viser en oversikt over prøveuttak, AP3, Adamselv/Loppa i testperioden.

Tabell 12: Oversikt over prøveuttak i AP3, lok. Adamselv, Lebesby +lok. Olaneset, Loppa.

Del av forsøket		Salinitet	Antall prøver til bakteriologisk undersøkelse	Antall prøver til histopatologisk undersøkelse	Antall prøver til molekylærbiologisk undersøkelse
30.07.2013	0-uttak Sak 2013-50-1403/F298	Ferskvann	31	31	120
02.10.2013	1. uttak RAS Sak 2013-50-1792/F437	12 ppt	13+12	12+13	12+13
		22 ppt	12+13	12+13	12+13
04.11.2013	2. uttak RAS Sak 2013-50-2125/F572	12 ppt	15+15	15+15	25+25
		22 ppt	15+15	15+15	25+25
06.11.2013	Uttak kontrollgruppe (Loppa) Sak 2014-50-2126/F573	Sjø	30	30	100
29.04.2014	Ekstra uttak som del av oppfølging av sykdomsutbrudd Loppa Sak 2014-50-698/F248	Sjø	10+10+10	10+10+10	Ingen

Bakteriologisk undersøkelse

Den 30. juli 2013 ble det første prøveuttaket («0-uttaket») utført. Det ble tatt prøver fra 31 settefisk. Resultatene fra bakteriologisk undersøkelse av hudprøver fra 0-uttaket viste vekst av *Shewanella* sp i prøver fra 8 av 31 fisk, samt *Vibrio (Listonella) anguillarum* uten kjent serotype i prøver fra 7 av 31 fisk.

Det første uttaket etter at fisken var blitt fordelt og hadde gått en tid i to ulike salinitetsgrupper (hhv. 12 ppt og 22 ppt salinitet) i RAS-anlegget, ble utført den 2.10.2013. Det ble tatt prøver fra 25 fisk i hver av de to gruppene.

I hudprøver fra 25 fisk i 12 ppt-gruppen ble det påvist *Shewanella* i alle prøvene, ellers ingen funn. I hudprøver fra 25 fisk i 22 ppt-gruppen ble det påvist *Shewanella* i prøver fra 9 fisk, *Vibrio splendidus* i prøver fra 8 fisk og *Vibrio anguillarum* uten kjent serotype i prøver fra 4 fisk. Det ble ikke påvist bakterier i noen av nyreprøvene, begge grupper.

Det andre og etter opprinnelig plan siste prøveuttaket etter at testfisken i RAS-anlegget hadde gått en tid i vann med ulike saliniteter, ble utført den 4.11.2013. Det ble tatt prøver fra 30 fisk i hver av de to gruppene.

I hudprøver fra fisk i 12 ppt-gruppen ble det påvist *Shewanella* sp i prøver fra 5 av 30 fisk og *Tenacibaculum* sp i prøver fra 3 av 30 fisk. I hudprøver fra fisk i 22 ppt-gruppen ble det påvist *Tenacibaculum* sp i prøver fra 6 av 30 fisk.

I nyreprøvene ble det påvist *Yersinia ruckeri* i 3 av 30 prøver fra fisk i 12 ppt-gruppen og 3 fisk fra 22 ppt-gruppen.

To dager etter prøveuttaket i RAS-anlegget den 4.11.2013 ble det den 6.11.2013 tatt prøver fra fisk i kontrollgruppen i Loppa. Det ble tatt prøver fra 30 kontrollfisk. Det ble påvist *Tenacibaculum* sp i hudprøve fra 1 av 30 fisk. Det ble ikke påvist bakterier i noen av nyreprøvene fra kontrollfisken.

Fisken i de to salinitetsgruppene i RAS-anlegget ble fraktet til lok. «Olaneset» i Loppa kommune og sjøsatt på to ulike dager i november 2013. Som oppfølging av sykdomsutbrudd på lokaliteten ble det utført et ekstra prøveuttak den 29.4.2014. Det ble undersøkt 10 fisk som kom fra 12 ppt-gruppen i RAS-anlegget, 10 fisk fra 22 ppt-gruppen i RAS-anlegget og 10 fisk fra kontrollgruppen. Det ble påvist *A. wodanis* i alle nyreprøver og alle hudprøver fra fiskene i begge salinitetsgruppene. I tillegg ble det påvist *Tenacibaculum* sp i hudprøver fra 3 av 10 fisk i hver av salinitetsgruppene. I prøvene fra de 10 undersøkte kontrollfiskene ble det påvist *Moritella viscosa* i hudprøve fra 1 av 10 fisk, *Vibrio splendidus* i hudprøve fra 1 av 10 fisk, *A. wodanis* i hudprøver fra 2 av 10 fisk samt *Tenacibaculum* sp i hudprøver fra 3 av 10 fisk.

Det ble ikke påvist bakterier i noen av nyreprøvene fra kontrollfisken.

Det ble ikke påvist *Yersinia ruckeri* i noen prøver fra fisken på lok. Olaneset i Loppa.

Tabell 13 viser en oversikt over resultater fra bakteriologiske undersøkelser av hud- og nyreprøver i AP3, Adamselv/Loppa. I tabellen beskrives koloniers vekstintensitet og hemolysegrad: Vekstmedier med påvist primærvekst er blitt videre vurdert i forhold til variasjon av type kolonier og total grad av hemolyse på vekstmediet. Variasjon i type kolonier på primært vekstmedium er inndelt i kategoriene 1,2 og 3+, hvorav 1 betyr minst grad av variasjon og 3+ størst. Den nederste delen av tabellen viser forekomsten av identifiserte bakterier.

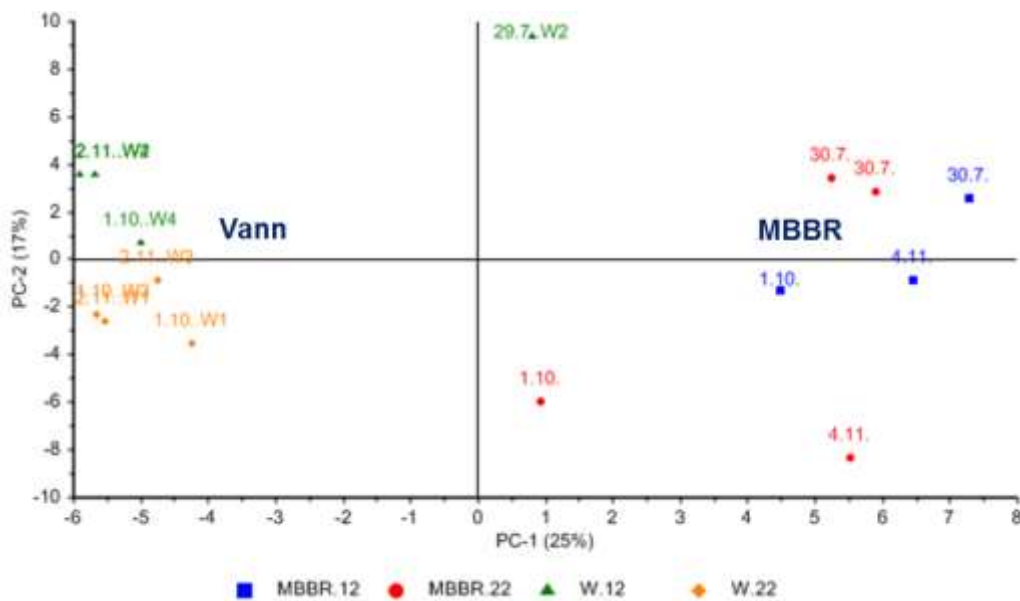
Tabell 13. Bakteriologiske resultater for AP3, Grieg Seafood, Adamselv og kontrollgruppe Loppa.

		0-uttak	Individer testfase RAS-anlegg						Kontrollgruppe		
		Ferskvann	Gruppe: 12 ppt			Gruppe: 22 ppt			Gruppe:Sjø		
		30.juli 13	2.okt 13	4.nov 13	29.apr 14	2.okt 13	4.nov 13	29.apr 14	6.nov 13	29.apr 14	
Bakterieflora hud			12 ppt	12 ppt	Utbrudd i sjø	22 ppt	22 ppt	Utbrudd i sjø		Utbrudd i sjø	
Mengde vekst, andel av undersøkte fisk	Antall undersøkte fisk	N =31	N=25	N=30	N=10	N=25	N=30	N=10	N=30	N=10	
	ingen vekst	16 %	4 %	0 %	0 %	12 %	0 %	0 %	7 %	10 %	
	3-10 kolonier	71 %	20 %	20 %	10 %	68 %	10 %	0 %	23 %	40 %	
	10-25 kolonier	13 %	44 %	33 %	10 %	8 %	27 %	0 %	23 %	20 %	
	>25 kolonier	0 %	32 %	47 %	80 %	12 %	63 %	100 %	47 %	30 %	
Vurdering av vekst		N=26	N=24	N=30	N=10	N=22	N=30	N=10	N=28	N=9	
Variasjon kolonier		1	4 %	38 %	0 %	30 %	27 %	0 %	30 %	18 %	11 %
		2	23 %	50 %	13 %	70 %	41 %	33 %	40 %	39 %	67 %
		3+	65 %	13 %	87 %	10 %	32 %	67 %	30 %	50 %	22 %
Grad av hemolyse		Ingen	27 %	0 %	7 %	0 %	23 %	80 %	0 %	100 %	44 %
		Svak	69 %	25 %	50 %	0 %	32 %	0 %	0 %	0 %	0 %
		Klar	4 %	71 %	43 %	100 %	45 %	20 %	100 %	0 %	56 %
Nærmere identifiserte bakterier		N	31	25	30	10	25	30	10	30	10
Funn i hud		<i>Shewanella</i> sp	Påvist 8 av 31	Påvist alle 25	Påvist 5 av 30	Ikke påvist	Påvist 9 av 25	Ikke påvist	Ikke påvist	Ikke påvist	Ikke påvist
		<i>Moritella viscosa</i>	Ikke påvist	Ikke påvist	Ikke påvist	Ikke påvist	Ikke påvist	Ikke påvist	Ikke påvist	Ikke påvist	Påvist 1 av 10
		<i>Vibrio splendidus</i>	Ikke påvist	Ikke påvist	Ikke påvist	Ikke påvist	Påvist 8 av 25	Ikke påvist	Ikke påvist	Ikke påvist	Påvist 1 av 10
		<i>Vibrio anguillarum</i> ikke kjent serotype	Påvist 7 av 31	Ikke påvist	Ikke påvist	Ikke påvist	Påvist 4 av 25	Ikke påvist	Ikke påvist	Ikke påvist	Ikke påvist
		<i>A. wodanis</i>	Ikke påvist	Ikke påvist	Ikke påvist	Påvist alle 10	Ikke påvist	Ikke påvist	Påvist alle 10	Ikke påvist	Påvist 2 av 10
		<i>Tenacibaculum</i> sp (T2)	Ikke påvist	Ikke påvist	Påvist 3 av 30	Påvist 3 av 10	Ikke påvist	Påvist 6 av 30	Påvist 3 av 10	Påvist 1 av 30	Påvist 3 av 10
Funn i nyre		<i>Yersinia ruckeri</i>	Ikke påvist	Ikke påvist	Påvist 3 av 30	Ikke påvist	Ikke påvist	Påvist 3 av 30	Ikke påvist	Ikke påvist	Ikke påvist
		<i>A.wodanis</i>	Ikke påvist	Ikke påvist	Ikke påvist	Påvist alle 10	Ikke påvist	Ikke påvist	Påvist alle 10	Ikke påvist	Ikke påvist

Undersøkelser mhp. mikrobiota

Mikrobiota har blitt karakterisert i vannprøver og MBBR medie biofilmprøver i de to RAS anleggene til Grieg Seafood ved Adamselv, hvor forsøksbehandlingene var to ulike nivåer av salinitet (12 og 22 ppt S). PCA på genus nivå viser at mikrobiota sammensetningen var forskjellig mellom vannprøver og biofilm i MBBR ved PC1 (Fig. 7A). Forskjell mellom mikrobiota i 12 og 22 ppt S RAS er forklart med både PC2 og PC3 for vannprøvene og med PC3 for biofilmprøvene (Fig. 7A og 7B). PCA vist mindre endringer over tid. Det jobbes videre med å identifisere mikrober som kan forklare forskjellene i mikrobiota. Dominerende mikrober i anlegget ved Adamselv er vist i Fig. 8.

7A)



Potensielle patogener i anlegget ved Adamselv ble selektivt undersøkt som for Molnes anlegget. *Yersinia* ble ikke detektert i vann eller MBBR biofilmprøvene selv om infeksjon med *Yersinia* ble påvist i fisken og kan ha hatt effekt på fiskens overlevelse og tilvekst. De detekterte potensielle patogene bakteriene er presentert i Fig. 9 og utgjorde høyest relativ andel i vannprøvene, deriblant *Polaribacter*. En relativ økning av potensielle patogener ble spesielt påvist i november: I vannprøver fra 12 ppt S RAS ble det påvist *Shewanella* og *Flavobacterium*, mens i vannprøver fra 22 ppt ble det påvist økning av *Pseudoalteromonas* i tillegg til *Polaribacter*.

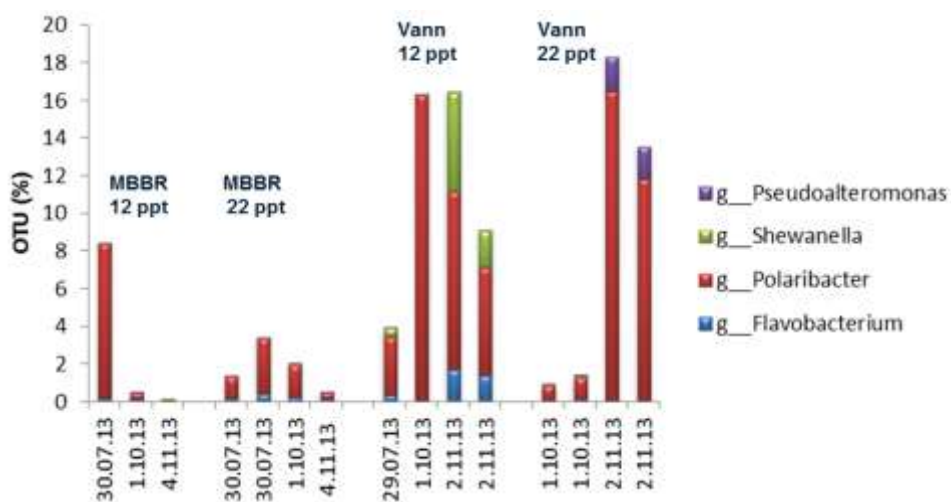


Fig. 9. Potensielle patogener i MBBR biofilm og vannprøver fra Adamselv anlegget ved 12 og 22 ppt. Taksonomisk nivå er genus (g).

Histopatologisk undersøkelse

Ved den histopatologiske undersøkelse av prøver fra individer fra RAS-anlegget og fra sjøfase ble det ikke påvist forskjeller mellom gruppene.

I hjerteprøver fra 0-uttaket og 1-uttaket vurderes ingen påviste vevsforandringer å være av klinisk betydning.

I nyreprøvene fra 0-uttaket ble det påvist høy prevalens av proteinholdig materiale i lumen i nyretubuli. Det kan se ut som om det er flere prøver fra fisken i RAS-anlegget som har proteinholdig materiale i lumen enn hva som er tilfelle for nyreprøvene fra kontrollfisken. Denne type vevsforandringen ses imidlertid også i nyreprøver fra kontrollfisken. Den ses i flere prøver fra det siste uttaket enn fra det første.

I prøver fra bukhule ble det påvist granulomatøs peritonitt, sannsynligvis vaksineindusert.

I prøver fra kontrollgruppen ved uttaket den 29. april ble det påvist sparsom irritasjon (hyperplasi og sammenvoksning av sekundærlameller) i 40 % av de undersøkte gjelleprøvene.

Analyse ved hjelp av PCR

Det ble ikke påvist PD-virus i noen av de undersøkte prøvene fra anlegget i Adamselv/Loppa. PRV-nivåene var lave i alle de undersøkte prøvene.

Det ble ikke påvist *Paramoeba perurans* i noen av de undersøkte prøvene.

Det ble ikke påvist *Branchiomonas cysticola* i prøver tatt fra fisk i RAS-anlegget. Antall prøver undersøkt mhp. *Branchiomonas cysticola* ble redusert til 25 pr. prøveuttak.

Det ble ikke utført PCR-undersøkelser av prøver tatt i RAS-anlegget 4.november 2013.

Branchiomonas cysticola ble påvist i alle de undersøkte prøvene som ble tatt fra kontrollfisken i Loppa den 6.11.2013. I prøveuttaket på lokaliteten i Loppa den 29.4.2014, ble det ikke tatt prøver til PCR-analyse, hverken av testfisken eller kontrollfisken.

Tabell 14 viser en oversikt over PCR-resultater.

Tabell 14: Resultater fra PCR-analyser av prøver fra RAS-anlegget Adamselv og kontrolluttak etter sjøsetting i Loppa.

Prøveuttak lok/sak nr	Agens	Agens	Agens	Agens
Adamselv	PDV	PRV	<i>Paramoeba perurans</i>	<i>Branchiomonas cysticola</i>
0-uttak/F298/13	Ikke påvist	Ct-verdier 19,6-35,7	Ikke påvist	Ikke påvist
1.uttak/F437/13	Ikke påvist	Ct-verdier 27,0-38,1	Ikke påvist	Ikke påvist
2.uttak/F572/13	Ikke påvist	Ct-verdier 27,9-36,9	Ikke prøveuttak gjeller	Ikke prøveuttak gjeller
Kontrolluttak Loppa/F573/13	Ikke påvist	Ct-verdier 27,2-36,9	Ikke påvist	Påvist

Det vises for øvrig også generelt til resultater i delrapportene i NFR-OPP; for anlegget på Molnes (Handeland, S., Calabrese, S., Kolarevic, J., Breck, O., Terjesen, B.F., 2015), for anlegget på Smøla (Kolarevic, J., Martinsen, Iversen, R., S., Terjesen, B.F., 2015) og anlegget i Adamselv (Kolarevic, J., Mathisen, F., Terjesen, B.F., 2015).

Diskusjon

Veterinærinstituttets resultater fra bakteriologiske og histopatologiske undersøkelser samt undersøkelser vha PCR, er utelukkende knyttet til undersøkelser av prøver tatt fra fisken i den opprinnelige testperioden. Unntaket er prøvene tatt 29.4.2014 i forbindelse med sykdomsutbrudd i populasjonen som var blitt flyttet fra RAS-anlegget i Adamselv, til lokaliteten «Olaneset» i Loppa kommune.

Alle undersøkelser av vannprøver og biofilm tatt i de tre anleggene er foretatt og beskrevet av Nofima. I noen anlegg ble det tatt slike prøver også etter at den opprinnelige testperioden var over. Resultatene fra alle undersøkelsene av vann og biofilm, inkludert resultatene fra prøvene som ble undersøkt etter at testperioden egentlig var avsluttet, er beskrevet i denne rapporten. Det siste prøveuttaket for Veterinærinstituttets del var den 26.8.2014, i anlegget på Smøla. Vannprøver og biofilm ble tatt i anlegget dagen etter. Dette er det siste prøveuttaket der man har resultater både fra prøver fra fisk, vann og biofilm, tatt omtrent på samme tidspunkt og derfor er egnet til å kunne sammenlignes. Etter denne dato er resultater fra undersøkelser av vann og biofilm tatt med i rapporten men kan ikke sammenlignes med funn i prøver fra fisk, i og med at testperioden for uttak av fiskeprøver var avsluttet.

Testperioden har funnet sted i en storskalaproduksjon. Man må av den grunn ta høyde for at det kan finnes faktorer som har påvirket prøveresultatene fra testperioden i prosjektet, uten at disse faktorene med sikkerhet kan identifiseres eller effektene vurderes.

Kontrollgruppene har også vært en del av storskalaproduksjonen. De har derfor ikke hatt samme forutsetninger for å kunne fungere som kontrollgrupper gjør i kontrollerte forsøk med bedre muligheter for registrering av faktorer som kan påvirke resultatene. Dette var man imidlertid klar over allerede i planleggingen av prosjektet men valgte likevel de ulike kontrollgruppe-løsningene ut fra det som var praktisk gjennomførbart. Dette kan være en pragmatisk måte å løse behovet for kontrollgrupper på, så lenge man er klar over begrensningene denne type design kan medføre.

Arbeidspakke 1, Smøla Klekkeri og settefisk, Smøla

I forhold til opprinnelig plan ble utsett av testfisken noe forsinket. Dette ga en kortere testperiode enn planlagt og slutt-prøveuttaket ble utsatt fra 6.8. 2014 til 27.8.2014. Undersøkelsesperioden ble derfor fom 16. mai tom 27. august, 2014. Det ble i forkant av utsett påvist hemorragisk smoltsyndrom (HSS) hos individer i settefisk-populasjonen. Undersøkelsene av fisken i etterkant har ikke medført resultater som tyder på at dette har hatt betydning for fiskens helseutvikling.

Settefisken ble satt i sjøen på lokaliteten «Gullklakken». Denne lokaliteten ligger i et område med relativt grunt vann, og det var ikke mulig å få vanninntaket dypere enn 12 meter. Det var en utfordring å sikre ønskelig grad av oksygenering av vannet.

Det første prøveuttaket ble utført den 16.5.2014. Da ble 30 settefisk prøvetatt mens de fortsatt stod i ferskvannsanlegget. Den bakteriologiske undersøkelsen viser få funn av bakterier. Det ble ikke påvist bakterier i nyreprøvene. Bakteriene som er påvist, regnes som vanlige å påvise i hudprøver fra fisk i ferskvannsanlegg. Det ble utført histologisk undersøkelse av prøver fra alle fiskene uten at det ble sett vevsforandringer som vurderes å være av betydning.

Resultatene fra PCR-analysene viste funn av PRV i små mengder i prøver fra anlegget. Dette er vanlig. Det ble ikke påvist PD-virus, *Paramoeba perurans* eller *Branchiomonas cysticola* i noen av prøvene fra det første uttaket. Det ble ikke tatt prøver fra vann og biofilm denne dato.

Testfisken ble flyttet fra ferskvannsanlegget til pose i sjø på lok. «Gullklakken» i juni. Det andre prøveuttaket ble utført den 16.07.2014, altså to måneder etter det første. Bakteriologisk undersøkelse viste vekst av *Vibrio sp* i 1 av 30 undersøkte hudprøver. Det ble ikke påvist bakterier i nyreprøvene. Det ble utført histopatologisk undersøkelse av prøver fra alle fisk. Det ble påvist moderat irritasjon av gjeller.

Resultatene fra PCR-analysene viste funn av svært små mengder PRV samt funn av *Branchiomonas cysticola*. Det ble ikke påvist PD-virus eller *Paramoeba perurans*. Det ble ikke tatt prøver fra vann og biofilm samme dag som det ble tatt prøver fra fisken.

Det siste prøveuttaket i testperioden på Smøla ble utført den 27.8.2014. Bakteriologiske undersøkelser viste funn av vibriobakterier inkludert *Vibrio splendidus* i prøver fra noen få fisk. Det ble ikke påvist bakterievekst i noen av nyreprøvene. Funn av vibriobakterier er ikke uvanlig i prøver fra fiskehud og selv om det påvises slike bakterier i flere prøver fra det siste uttaket enn i de foregående, er antallet likevel så lavt at det ikke regnes å ha sikker klinisk betydning. Histopatologisk undersøkelse av prøver fra alle fiskene viste gjelleforandringer i form av hypertrofi og hyperplasi. Det ble ikke sett gjelleamøber i vevsnittene men det ble påvist *Paramoeba perurans* i prøver analysert vha. PCR. Det er trolig at en del av gjelleforandringene sett i histopatologisk undersøkelse, skyldes amøben. Ved hjelp av PCR ble det også påvist *Branchiomonas cysticola* i prøvene fra fisken. *Branchiomonas cysticola* kan også medvirke til gjelleforandringer som ble sett i den histopatologiske undersøkelsen. PRV ble påvist i svært små mengder. De påviste mengdene av PRV var svært små gjennom hele testperioden. En viss forekomst av PRV er vanlig. PD-virus ble ikke påvist i noen av prøvene.

Mikrobiota ble analysert på kun fem vannprøver, der to var fra dato 15.07 (senter av posen og vanninnløp) og tre fra 26.08 (senter og innløp). På grunn av få prøver og høy mikrobiell diversitet var det vanskelig å tolke om det var forskjeller mellom prøver fra juli og august.

Eier har selv bidratt med opplysninger om hvordan det gikk med fisken etter at testperioden ble avsluttet den 27.8.2014. I følge eier ble det påvist AGD i prøver fra testfisken i slutten av august 2014. I løpet av kort tid etter AGD-påvisingen, ble all fisken i posen behandlet med ferskvann og satt tilbake på lokaliteten. Søknad om å flytte fisken fra lok. «Gullklakken» på Smøla til lok. «Gaustad» på Eide, ble etter hvert innvilget. Av ulike grunner lot det seg ikke gjøre å foreta flyttingen og det ble besluttet å slakte fisken. En omfattende screening forut for slaktingen viste ingen funn av AGD eller PD-virus. På slaktetidspunkt var fisken ca 400 g og ble vurdert som «frisk og fin».

Arbeidspakke 2, Marine Harvet lok. «Molnes»

Ferdigstillingen av det semi-lukkede anlegget på lok. «Molnes» i Skånøvik ble noe forsinket. Kontrollgruppen ble satt i sjøen den 12. oktober 2013, noe som var ca en måned før testgruppen kunne overføres til sitt anlegg 15.-17.november. I perioden før utsett, ble testgruppen holdt på 17 ‰ i settefiskanlegget på Vågafossen. Denne fisken ble gående litt tettere enn planlagt like før utsett, noe som kan ha bidratt til synlige hudlesjoner i form av finneslitasje og sår.

Da man skulle utføre det aller første prøveuttaket i testperioden, ble det sett finne-erosjoner og sår hos noen av de 30 prøvetatte fiskene. I dette uttaket ble det påvist hhv. *Vibrio splendidus* i prøver fra 2 av 30 fisk, *Tenacibaculum* sp i prøver fra 10 av 30 fisk og *Shewanella* i prøver fra 3 av 30 fisk. Dette kan være tilfeldige funn men forekomst av finneerosjoner og sår kan også være en del av årsaken til at det ble funnet *Tenacibaculum* sp i hudprøver fra en tredjedel av den undersøkte fisken. *Tenacibaculum* sp kan påvises i erosjoner og sår i hud hos atlantisk laks i sjø (Olsen et al, 2011). I ettertid er det likevel ingen tegn som tyder på dette funnet har hatt vesentlig betydning for helseutviklingen hos fisken i tanken på Molnes.

Det ble ikke tatt vannprøver og biofilm i dette prøveuttaket.

Det ble foretatt histopatologisk undersøkelse av prøver fra alle fiskene i uttaket. Det ble ikke sett vevsforandringer som regnes å ha klinisk betydning. Alle fiskene ble også underøkt vha PCR mhp. PD-virus, PRV, *Paramoeba perurans* og *Branchiomonas cysticola*. Alle prøvene var negative med unntak av PRV, som ble påvist i svært små mengder. Dette er ikke et uvanlig funn.

Det første prøveuttaket etter at fisken var overført til sjøanlegget, ble utført den 24.2.2014. Det ble ikke påvist bakterier i noen av nyreprøvene. I hudprøvene var det funn av funn av miljøbakterier som dominerte. I det siste prøveuttaket ble det påvist *Tenacibaculum* sp i prøve kun fra en fisk. Sammenlignes bakteriefunn i prøver fra settefisken («0-uttaket») med funn i de neste prøvene tatt etter sjøsetting, ser man at det er en reduksjon i funn av *Tenacibaculum* sp. Dette kan være tilfeldig men forklaringen kan også være at fisken hadde bedre plass i sjøanlegget med bedre muligheter for forebygging og heling av hudlesjoner, noe som kan ha medvirket til en lavere forekomst av denne bakterien i vannet.

Shewanella og *Pseudoalteromonas* er to relativt like bakterier. De kan regnes å være vanlige komponenter i den normale bakterieflora på hudoverflaten hos fisk men er også isolert i forbindelse med sykdom hos svekket fisk. Å påvise disse bakteriene i hudprøver er derfor ikke uvanlig. De to nevnte bakterier kan også assosieres med bederving av mat og forårsake kortere holdbarhet når de finnes i matvarer (Adams, Moss 1995).

I prøvene fra uttaket den 24.2.2014 ble *Pseudoalteromonas* påvist i to tredjedeler av de undersøkte hudprøvene fra fisken. Dette er den høyeste forekomsten av denne bakterien som er påvist i fiskeprøvene undersøkt i denne arbeidspakken. Undersøkelser av vannprøver og biofilm tatt samme dag (24.2.2014), viste ingen spesielle funn. I vannprøve tatt i anlegget tre uker senere (17.3.2014) ble det påvist relativt store mengder *Pseudoalteromonas*. I prøveuttaket av fisk som fulgte den 13.5.2014 ble denne bakterien ikke påvist. I fall det har vært økt mengde organisk materiale i anlegget i en periode kan dette ha bidratt til den midlertidig økte forekomsten av *Pseudoalteromonas*. Det er ikke funnet tegn som tilsier at den tilsynelatende midlertidige økningen av *Pseudoalteromonas* har hatt konsekvenser for fiskens helseutvikling.

Det ble foretatt histopatologisk undersøkelse av prøver fra alle fiskene i uttaket. Ifølge opplysninger fra fiskehelsetjenesten ble det påvist *Paramoeba perurans* i prøver fra denne populasjonen i begynnelsen av februar 2014. De histopatologiske undersøkelsene av prøvene som ble tatt ut i forbindelse med Postsmolt Del E den 24.2.2014, viste gjelleforandringer man kan se ved AGD. *Paramoeba perurans* ble påvist i prøver undersøkt vha. PCR. Det ble også påvist PRV i prøvene fra dette uttaket. Mengdene PRV regnes som relativt lave men er i noen prøver likevel så høye at man kunne forvente å finne vevsforandringer som ved hjerte- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB): Ifølge Reigstad (2011) kan Ct-verdier for PRV mellom 20-25 være assosiert med histopatologiske forandringer, tilsvarende slike som ved HSMB (Reigstad 2011). Det ble ikke påvist HSMB i det undersøkte prøvematerialet. PD-virus og *Branchiomonas cysticola* ble ikke påvist i prøvene tatt ut 24.2.2014.

Det siste prøveuttaket i testperioden ble utført den 13.5.2014. Det ble kun påvist *Shewanella* i hudprøve fra en fisk, ellers ingen andre bakteriefunn hverken fra hud eller nyre. Det ble ikke tatt prøver av vann eller biofilm samme dagen som fisken ble prøvetatt den 13.5.2014. Resultatene fra undersøkelser av vannprøver og biofilm som ble tatt forut og etter denne dato (hhv. 5.5.2014 og 26.5.2014) viser funn av bakterier som regnes som vanlige i et vannmiljø.

Det ble foretatt histopatologisk undersøkelse av prøver fra alle 30 fisk. I vevssnitt fra gjelleprøvene tatt i mai ble det sett forandringer man kan se ved AGD. Samme type gjelleforandringer ble sett i prøvene fra uttaket i februar også, bare i større omfang. Det ble ikke påvist *Paramoeba perurans* vha PCR i prøvene fra mai. Forklaringen kan være at selv om amøben har vært tilstede i gjellene hos fisk i anlegget på et tidligere tidspunkt, så var den ikke lengre det i mai. Eventuelt var den fortsatt til stede, men i mindre mengder og dermed vanskeligere å påvise vha. histopatologisk undersøkelse. PCR-undersøkelser av prøver i dette uttaket viste imidlertid heller ingen funn av *Paramoeba perurans*.

Undersøkelse av nyreprøvene i det siste prøveuttaket 13.5.2014 kan tyde på at det har vært en svak økning i antall prøver med røde blodlegemer og/eller annet proteinholdig materiale i nyretubuli, fra 0-uttak til senere uttak i sjøfasen. Forandringene er ikke så store og antall fisk undersøkt er så lavt at dette også kan regnes som tilfeldig variasjon. Om dette er en reell økning er årsaken ukjent. Det ble påvist granulomatøs peritonitt som med svært stor sannsynlighet er vaksineindusert. Ingen øvrige vevsforandringer som ble sett, regnes å være av klinisk betydning.

Det ble ikke påvist PD-virus eller *Branchiomonas cysticola* i prøvene. Påvist mengde PRV i prøvene i mai er omtrent som i prøvene i februar. Under forutsetning av at de undersøkte prøvene er representative for populasjon, kan man anta at det ikke har funnet sted en vesentlig oppformering av PRV i anlegget fra februar til mai.

Ifølge kommentarer fra anleggseier, holdt dødeligheten seg svært lav etter avsluttet prosjektperiode medio mai, frem til medio september 2014. Ifølge eier oppstod det medio september en episode med akutt dødelighet trolig relatert til toksiske alger som skadet gjellene. Det ble etter hvert påvist ulike gjelleagens, samt sykdommen AGD, og dødeligheten tiltok igjen. Forsøksvis behandling med redusert dose H2O2 medførte ytterligere tap av fisk og det ble besluttet å slakte fisken, primært av velferdshensyn. Fisken var da ca. 2 kg.

Arbeidspakke 3, RAS-anlegg i Adamselv/lok. «Olaneset», Loppa kommune.

Testperioden varte fra 30.7. 2013 til 6.11.2013.

Denne arbeidspakken inkluderte to testgrupper med fisk på forskjellige saliniteter i RAS-anlegget samt kontrollgruppe på sjølokaliteten. De to gruppene ble introdusert for de respektive saliniteter på samme tidspunkt i september 2013. Arbeidspakken inkluderte også en kontrollgruppe som ble sjøsatt på lok. «Olaneset» medio august 2013. Fisken fra RAS-anlegget ble sjøsatt på denne lokaliteten ca tre måneder senere.

Den 30. juli 2013 ble det første prøveuttaket utført. Da ble det tatt prøver av settefisken før den ble delt i grupper som skulle introduseres for de to ulike salinitetene i september. Resultatene fra bakteriologisk undersøkelse av hudprøver fra det aller første uttaket («0-uttaket») viste vekst av *Shewanella* i prøver fra 8 av 31 fisk, samt *Vibrio anguillarum* ikke kjent serotype i prøver fra syv av 31 fisk. Dette er bakterier som kan påvises i prøver fra frisk fisk og regnes i dette tilfellet ikke å ha hatt klinisk betydning.

Det ble foretatt histopatologisk undersøkelse av prøver fra alle fiskene. Det var kun sparsomme vevsforandringer med unntak av nyreprøvene, der det ble sett høy forekomst av proteinholdig materiale i deler av nyrets ekskretoriske system. Det var ingen synlig forskjell mellom prøvene fra de to salinitetsgruppene. I anlegget på Adamselv har det etter opplysninger fra eier vært utfordringer i testperioden i forhold til tilfredsstillende regulering av for høye CO₂-konsentrasjoner i vannet. En sykdomstilstand som har vært assosiert med høy CO₂-konsentrasjon i vannet, er nefrokalsinose (Rosseland, 1999). Om CO₂-konsentrasjonen i vannet har vært for høy over tid, kan det tenkes at forandringene i nyreprøvene fra settefisken kan være de første tegn til en begynnende nefrokalsinose-tilstand. Sikker kan man likevel ikke være, det kan også være andre faktorer som har spilt en rolle uten at det er mulig å identifisere disse.

PCR-analysene av prøvene viste ingen funn av PD-virus, *Paramoeba perurans* eller *Branchiomonas cysticola*. Det ble påvist PRV i små mengder. Dette er ikke et uvanlig funn.

Det ble tatt prøver fra biofilm fra begge salinitetsgruppene samme dag som det ble tatt prøver fra settefisken. Resultatene viser funn av miljøbakterien *Polaribacter* i sparsomme til moderate mengder. Dagen før ble det tatt prøver av vannet i 12 ppt-gruppen. Det ble påvist små mengder *Polaribacter* og *Shewanella*. Disse regnes i utgangspunktet som miljøbakterier og representerer ingen uvanlige funn.

Det første uttaket etter at fisken var blitt fordelt og hadde gått en tid i de to ulike salinitetsgruppene i RAS-anlegget, ble utført den 2.10.2013. Hudprøver fra 25 fisk i 12 ppt-gruppen ble det påvist *Shewanella* i alle prøvene. I hudprøver fra 25 fisk i 22 ppt-gruppen ble det påvist *Shewanella* i prøver fra 9 fisk, *Vibrio splendidus* i prøver fra 8 fisk og *Vibrio anguillarum* uten kjent serotype i prøver fra 4 fisk. Sammenlignes funn av *Shewanella* i prøver fra alle de 25 fisk i 12 ppt-gruppen med funn av samme bakterie i prøver fra 9 av 25 fisk i 22 ppt-gruppen, kan en mulig forklaring være høyere forekomst av organisk materiale i vannmiljøet i 12 ppt-gruppen. Det ble ikke påvist bakterier i noen av nyreprøvene, begge grupper.

Det ble foretatt histopatologisk undersøkelse av prøver fra alle fisk, begge salinitetsgrupper. Vevsforandringene i prøvene var få og sparsomme med unntak av proteinholdig materiale i nyretubuli- et funn også sett i prøvene fra det forrige uttaket. Det ble ikke sett tydelige forskjeller mellom de to salinitetsgruppene.

Det ble ikke påvist PD-virus, *Paramoeba perurans* eller *Branchiomonas cysticola* i prøvene i dette uttaket. Det ble påvist PRV i svært små mengder i de undersøkte prøvene.

Dagen før fisken ble prøvetatt, ble det også tatt ut prøver fra vann og biofilm fra begge salinitetsgrupper. I biofilmprøvene ble det påvist små mengder *Polaribacter*. I vannprøven fra kar med 12 ppt salinitet ble det påvist betydelig større mengder *Polaribacter* enn i kar med 22 ppt salinitet. Dette kan muligens forklares med høyere konsentrasjon av organisk materiale i karet med 12 ppt salinitet, uten at dette kan dokumenteres.

Det siste prøveuttaket i RAS-anlegget ble utført den 4.11.2013. Det ble tatt prøver fra 30 fisk i hver av de to gruppene. I hudprøver fra fisk i 12 ppt-gruppen ble det påvist *Shewanella sp* i prøver fra 5 av 30 fisk og *Tenacibaculum sp* i prøver fra 3 av 30 fisk. I hudprøver fra fisk i 22 ppt-gruppen ble det påvist *Tenacibaculum sp* i prøver fra 6 av 30 fisk.

I nyreprøvene ble det påvist *Yersinia ruckeri* i 3 av 30 prøver fra fisk i 12 ppt-gruppen og 3 av 30 fisk fra 22 ppt-gruppen. *Yersinia ruckeri* ble introdusert til RAS-anlegget ved flytting av *Yersinia*-infiltrert fisk for kommersiell produksjon, til samme avdeling som forsøksfisken, få dager før prøveuttaket den 2. oktober 2013. Flytting av *Yersinia*-infiltrert fisk har tydeligvis medvirket til utbrudd av *Yersiniose* hos forsøksfisken.

Det ble ikke utført PCR-analyser av prøvene i dette uttaket av RAS-fisken den 4.11.2013.

To dager etter prøveuttaket i RAS-anlegget den 4.11., ble det tatt prøver fra fisk i kontrollgruppen i Loppa. Det ble påvist *Tenacibaculum sp* i hudprøve fra 1 av 30 fisk. Det ble ikke påvist bakterier i noen av nyreprøvene fra kontrollfisken. I ettertid ser man at det ikke ble sykdomsutbrudd i kontrollmerd. Med unntak av funn av proteinholdig materiale i nyrets ekskretoriske del, viste histopatologisk undersøkelse ingen vevsforandringer som regnes å være av klinisk betydning. Det er også vanskelig å vurdere hvilken klinisk betydning funn i nyreprøvene har hatt, sannsynligvis har den vært liten.

PCR-analyser viste ingen funn av PD-virus. Det ble ikke undersøkt gjelleprøver mhp. *Paramoeba perurans* og *Branchiomonas cysticola*. Det ble påvist små mengder PRV. Dette regnes som vanlig funn. Det ble ikke undersøkt prøver av vann eller biofilm fra merd med kontrollfisk.

Fisken i de to salinitetsgruppene i RAS-anlegget på Adamselv i Lebesby kommune, ble fraktet med båt til lok. «Olaneset» i Loppa kommune og sjøsatt medio november 2013. Sjøsetting av testfisken fra RAS-anlegget ble fremskyndet for å håndtere et utbrudd av *Yersinia ruckeri* i anlegget. Det var dårlig vær både under transport og utsett. Fisken som ble transportert fra RAS-anlegget var i gjennomsnitt ca 400 g. De to salinitetsgruppene fra RAS-anlegget ble satt i hver sin merd. Gruppen med kontrollfisk hadde stått sjøen på samme lokalitet fra 15.august året før.

Fisken som stammet fra RAS-anlegget utviklet sår. Det ble ikke sett sår hos kontrollfisken. Kort tid etter utsett i sjø begynte RAS-fisken å dø og dødeligheten ble høy kort tid etter utsett. I følge anleggseier døde dessuten «betydelig mer» fisk i gruppen som hadde gått på 22 ppt salinitet i RAS-anlegget, enn i gruppen som hadde gått på 12 ppt salinitet. Dødeligheten i kontrollgruppen som var satt i sjøen ca tre måneder før, var svært liten i forhold. I de to merdene med RAS-fisk døde det etter hvert så mange at de gjenlevende fiskene ble satt sammen i en merd.

Forklaring på hvorfor RAS-fisken utviklet sår, kan være at det var uvær da den ble transportert og sjøsatt. Det kan ha oppstått skader i huden som ikke nødvendigvis i utgangspunktet har vært store, men som likevel utviklet seg til sår fordi vanntemperaturen i sjøen i Loppa i november var så lav at hudskader ikke ble helet. Kontrollfisken hadde ikke sår, men den var sjøsatt tre måneder før, ved høyere vanntemperatur. Værforholdene ved transport og sjøsetting av kontrollfisken er ikke opplyst. Forskjellene i dødelighet mellom de to salinitetsgruppene kan være vanskelig å forklare men det kan ha vært variasjoner i værforholdene ved de fire transportene av fisk fra Adamselv til Loppa som har bidratt i den ene eller andre retning.

En forklaring på hvorfor dødeligheten ble så stor hos RAS-fisken etter at den ble sjøsatt, kan også være at den i utgangspunktet har hatt redusert helse pga. yersiniose i anlegget i Adamselv. Transport og sjøsetting i dårlig vær kan bety stress. Fisk som har redusert helse, vil i utgangspunktet tåle mindre stress før det medfører utvikling av sykdom eller at fisken dør. Foreløpig har man ikke så mye kunnskap om transport av så stor fisk som 400 g. I hvilken grad fiskens størrelse kan ha hatt innflytelse på helseutviklingen etter sjøsetting er det derfor vanskelig å ha en formening om. Det er også vanskelig å si med sikkerhet hvilken betydning yersiniose har hatt for helsetilstand og dødelighet hos testfisken.

Som oppfølging av sykdomsutbrudd på lokaliteten ble det utført et nytt prøveuttak den 29.4.2014. Det ble undersøkt 10 fisk som kom fra 12 ppt-gruppen i RAS-anlegget, 10 fisk fra 22 ppt-gruppen i RAS-anlegget og 10 fisk fra kontrollgruppen. Det ble påvist *A.wodanis* i samtlige nyreprøver og hudprøver fra fiskene i begge salinitetsgruppene.

I tillegg ble det påvist *Tenacibaculum sp* i hudprøver fra 3 av 10 fisk i hver av salinitetsgruppene.

Utvikling av sår og etter hvert systemisk infeksjon forårsaket av *A.wodanis* har med stor sannsynlighet forårsaket dødelighet i begge salinitetsgruppene fra RAS-anlegget.

I prøvene fra de ti undersøkte kontrollfiskene ble det påvist kun sparsomme mengder bakterier i hudprøver. Det ble ikke påvist bakterier i nyreprøver.

Det ble ikke påvist *Yersinia ruckeri* i noen av de undersøkte prøvene fra fisken på lok. «Olaneset» i Loppa i april 2014.

Etter hvert har vektforskjeller mellom de gjenlevende RAS-fiskene og kontrollfisken jevnet seg ut. Fiskehelsetjenesten regner med at vektforskjellene mellom fisk fra RAS-anlegget og fisk i kontrollgruppen vil være liten på slaktetidspunkt.

Mikrobiota ved de ulike anleggene, samlet.

Mikrobiotaen ved de ulike anleggene og i de ulike prøvematerialene ble sammenlignet med beta diversitets analyse (Fig. 1). Mikrobiotaen ved det semilukkede anlegg på Molnes (AP2) skilte seg klart fra mikrobiotaen påvist i RAS ved Adamselv (AP3) (Fig. 1A). Mikrobiotaen i vannprøvene fra det semilukkede anlegget på Smøla (AP1) overlappet noe med mikrobiotaen til noen av vannprøvene fra samme klasse anlegg på Molnes. Det var også en klar forskjell i mikrobiota mellom vannprøver og biofilmprøver. Denne forskjellen var mer utpreget i de semi-lukkede anleggene, enn i RAS hvor forskjellen mellom prosessvannet og biofilmen i biofilteret var mindre. En forskjell i biofilm mikrobiota fra oktober kontra tidligere i forsøksperioden ved Molnes er indikert.

Dyrkningsuavhengig mikrobiota analyse av vann og biofilmprøver fra de tre ulike lokalitetene i AP1, 2 og 3 viste stor spredning i mikrobiotasammensetning i forhold til både lokalitet og mellom vann og biofilmprøver. Minst variasjon i mikrobiota var det mellom prosessvannet og biofilmen i RAS ved Adamselv. Dette gjenspeiler forskjellen i teknologi; semilukkede anlegg p.t. er å betrakte som gjennomstrømmingssystemer hvor vannet tas inn og kun benyttes en gang. Under resirkulering derimot, kan det tenkes at resultatene fra disse analysene indikerer en større interaksjon mellom mikrobiota i biofilmen og i vannet, som følge av at vannet benyttes flere ganger. Vannmikrobiotaen ved det semilukkede anlegget ved Smøla overlappet noe med vannmikrobiotaen i det semilukkede anlegget ved Molnes. Både vann og biofilmmikrobiotaen ved Molnes endret seg over tid og et klart skifte ble observert fra mai til september/oktober. Dette korrelerte med blant annet påvisning av *Tenacibaculum* sp i biofilm og *Flavobacterium* sp i vannet. Det ble påvist forskjellig mikrobiota mellom vannprøver og biofilter biofilm ved de to RAS anleggene ved Adamselv. Ulik saltholdighet (12 eller 22 ppt S) påvirket også mikrobiotaen forskjellig. Potensielle patogener som *Polaribacter*, *Shewanella*, *Flavobacterium* og *Pseudoalteromonas* ble påvist i vannprøvene ved siste uttaket i november. Det kan nevnes at mikrobiotaen ved de tre lokalitetene hadde høy mikrobiell diversitet og som endret seg over tid, trolig grunnet en rekke ulike biologiske faktorer ved hvert anlegg. Videre analyser vil forhåpentligvis kunne avklare noen av disse interaksjonene.

Utviklingen av hudfloraen

Fiskens dyrkbare hudflora ble undersøkt ved hjelp av vekstmedier. Ved 0-uttaket i settefiskfasen var det godt samsvar mellom gruppene i de tre anleggene. Det var stort sett moderat vekst av en overveiende anhemolytisk blandingsflora. Molnes skilte seg svakt ut ved noe høyere innslag av hemolytisk flora sammenlignet med de andre. Det er opplyst at det var sår og finneråte i denne gruppen på prøvetakingstidspunktet. Det kan tenkes at dette har hatt betydning for hudfloraen. Når det gjelder utviklingen av hudfloraen i sjøfasen skiller Molnes seg noe ut fra de andre gruppene ved at det ved sluttuttaket var ingen vekst eller bare sparsom vekst av anhemolytiske eller svakt hemolytiske bakterier fra hudprøvene. For de andre gruppene var det derimot i større grad rikelig vekst av blandingsflora sammenlignet med ferskvannsfasen. Og både hos Smøla og i gruppen hos Adamselv med 12 ppt salinitet var veksten nå dominert av svakt eller tydelig hemolytiske bakterier.

For 22 ppt gruppen var det svakt høyere innslag av hemolytiske bakterier sammenlignet med 0-uttaket, men hovedtyngden av floraen var anhemolytisk. Også i kontrollgruppen hos Adamselv var floraen anhemolytisk på dette tidspunktet. Hos Adamselv utviklet fisken i RAS-gruppene sår etter at testperioden var avsluttet. Det var høyest dødelighet i 22 ppt gruppen. I kontrollgruppen var det lite eller ikke sår på fisken og lav dødelighet. Ved et begrenset prøveuttak som en oppfølging av utbruddet, hadde hudfloraen nå endret seg til å bestå av en 100 % betahemolytisk flora i fiskegruppene med mye sår, mens hudfloraen i kontrollgruppen bestod av både anhemolytiske og betahemolytiske bakterier. Det er grunn til å tro at forekomsten av sår påvirket hudfloraen i en mer betahemolytisk retning. Det er tidligere vist at «sårflora» hos fisk i sjø er dominert av hemolytiske bakterier og at hudflora hos fisk med sår endres fra å være forholdsvis anhemolytisk til å bli hemolytisk (Nilsen et al., 2010). At bakteriene er hemolytiske betyr at de kan ødelegge (lysere) røde blodlegemer og kan være en sykdomsframkallende egenskap hos bakterien.

Oppsummering av viktige punkt:

I prøvene som er undersøkt fra de tre anleggene er det ikke påvist alvorlig sykdom i testperioden. Det ble imidlertid etter avsluttet testperiode påvist sår og forhøyet dødelighet knyttet til infeksjon med *Allivibrio wodanis* hos RAS-fisken etter sjøsetting. Med unntak av funn av *Tenacibaculum* sp som ble påvist i forbindelse med finneslitasje som trolig oppstod da fisken en periode gikk for tett før utsett i anlegget på Molnes, samt *Allivibrio wodanis* hos sjøsatt fisk i Loppa, er det ikke påvist bakterier som knyttes direkte til sykdomsutbrudd.

Det er ikke påvist PD-virus i noen prøver fra noen av anleggene. Det er påvist PRV i prøver fra alle anleggene. Det er påvist *Branchiomonas cysticola* i prøver fra anleggene i Smøla og i prøver fra RAS-fisken etter sjøsetting på lokaliteten i Loppa. Det er påvist *Paramoeba perurans* i prøver fra Molnes og Smøla.

Det er gjort enkelte funn i nyrevev som kan indikere noe nyrepåkjenning hos fisken på lokalitetene Molnes og Adamselv/Loppa. Blodprøveanalyser ville kunne belyse om slike nyrefunn kan kobles til allmennpåkjenning hos fisken.

Mikrobiotaen ved de tre lokalitetene hadde høy mikrobiell diversitet som endret seg over tid, trolig grunnet en rekke ulike biologiske faktorer ved hvert anlegg. Videre analyser vil forhåpentligvis kunne avklare noen av disse interaksjonene.

Sammenligner man resultatene fra undersøkelser av prøver i de tre arbeidspakkene i Postsmolt E ser det ikke ut til å være gjort funn av betydning, som med sikkerhet kan relateres til driftsform/ulike driftsmodeller.

Konklusjon

Prosjektet har inkludert undersøkelser av prøver i forbindelse med storskalaproduksjon av fisk i tre ulike anlegg med nye teknologiske løsninger. Dette kan derfor kalles «nybrottsarbeid» for å samle kunnskap om fiskens helseutvikling i de tre anleggene i en definert testperiode. Resultater fra undersøkelser av prøver tatt i testperioden viser at det ikke er påvist vevsforandringer eller agens som med sikkerhet kan relateres til de tre ulike driftsformene.

Undersøkelsene har vært gjort av fisk, vann og biofilm i storskala-produksjonsmiljø, hvilket i praksis betyr at det er mange forhold som kan ha hatt innvirkning på resultatene, uten at man med sikkerhet kan vurdere omfanget. Dette medfører at resultatene bør vurderes med en viss forsiktighet. I et nybrottsarbeid vet man ikke alltid hvilke resultater man kan forvente. I slike tilfeller kan både det man påviser og det man ikke påviser i undersøkelsene, bidra til økt kunnskap.

Referanseliste

1. Adams, M.R.; Moss, M.O., Bacterial agents of foodborne illness. Food microbiology. The Royal Society of Chemistry 1995 pp. 156-219.
2. Anacker, R.L.; Ordal, E.J., Studies on the myxobacterium *Chondrococcus columnaris*: I. Serological typing. *Journal of Bacteriology* 1959, 78(1) pp. 25-32.
3. Caporaso, J. G.; Lauber, C. L.; Walters, W. A.; Berg-Lyons, D.; Lozupone, C. A.; Turnbaugh, P. J.; Fierer, N.; Knight, R., Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010a**.
4. Caporaso, J. G.; Kuczynski, J.; Stombaugh, J.; Bittinger, K.; Bushman, F. D.; Costello, E. K.; Fierer, N.; Pena, A. G.; Goodrich, J. K.; Gordon, J. I.; Huttley, G. A.; Kelley, S. T.; Knights, D.; Koenig, J. E.; Ley, R. E.; Lozupone, C. A.; McDonald, D.; Muegge, B. D.; Pirrung, M.; Reeder, J.; Sevinsky, J. R.; Turnbaugh, P. J.; Walters, W. A.; Widmann, J.; Yatsunencko, T.; Zaneveld, J.; Knight, R., QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* **2010b**, 7, (5), 335-6.
5. Fiskehelse rapporten Veterinærinstituttet, 2013.
6. Handeland, S., Calabrese, S., Kolarevic, J., Breck, O., Terjesen, B.F., 2015. Sluttrapport for OPP-delprosjekt 5a: Storskala uttesting av semi-lukket anlegg i sjø for produksjon av postsmolt. UNI research, pp 26.
7. Kolarevic, J., Martinsen, Iversen, R., S., Terjesen, B.F., 2015. Testing of a semi-closed containment system for production of Atlantic salmon postsmolts. Nofima, pp 24.
8. Kolarevic, J., Mathisen, F., Terjesen, B.F., 2015. Welfare and performance of Atlantic salmon postsmolt raised in commercial scale RAS at different salinities Nofima, pp 26.
9. Nilsen, H., Olsen, A.B., Bottolfsen, K., Soltvedt, E. 2005. Bacterial skin flora of Atlantic salmon and cod during the winter season and aspects of the pathogenesis of «winter ulcer» in Western Norway. Poster. 12. International conference for European Association of Fish Pathologists, Grado, Italia.
10. Olsen, A.B.; Nilsen, H.; Sandlund, N.; Mikkelsen, H.; Sørum, H.; Colquhoun, D.J., *Tenacibaculum* sp associated with winter ulcers in sea-reared Atlantic salmon *Salmo salar*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2011; 94(3): 189-99.
11. Reigstad, M., Utbredelse av reovirus assosiert med hjerte- og skjelettmuskelbetennelse i norsk lakseoppdrett. Mastergradsoppgave Universitetet i Bergen, 2011.
12. Rosten, W.R.; Ulgenes, Y.; Henriksen, K.; Terjesen, B.F.; Biering, E.; Winther, U., Oppdrett av laks og ørret i lukkede anlegg -forprosjekt. Sintef for FHF, 2011.
13. Rosseland, B., Vannkvalitetens betydning for fiskehelsen, Fiskehelse og fiskesykdommer pp.240-252, Universitetsforlaget 1999.

