

A26021 - Åpen

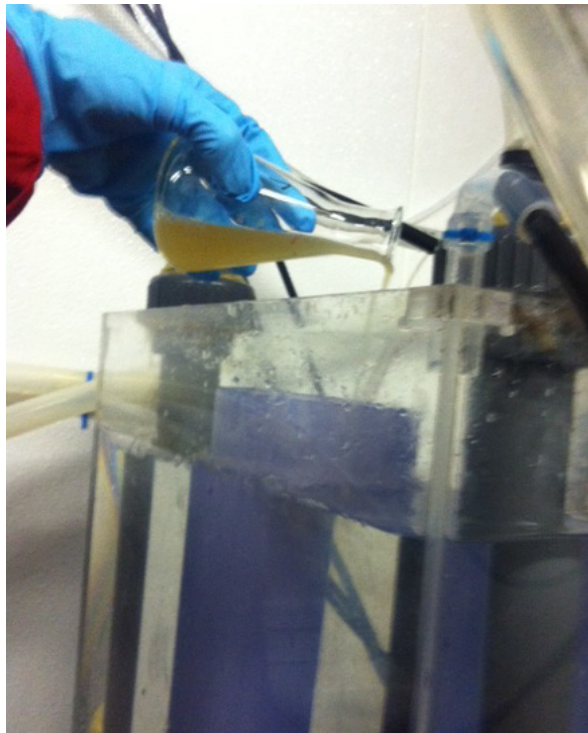
Rapport

Membranfiltrering av bakterien *Moritella viscosa* fra sjøvann

Innledende forsøk

Forfatter

Stine Wiborg Dahle, Trond Rosten (SINTEF Fiskeri og havbruk), Astrid Buran Holan, Tor Ove Leiknes (NTNU), Catrine Ahlen og Marianne Aas (SINTEF Materialer og kjemi).



Rapport

Membranfiltrering av bakterien *Moritella viscosa* fra sjøvann

Innledende forsøk

EMNEORD:

Vintersår

Laks

Membranfiltrering

Moritella viscosa

Maldi-TOF

Vannbehandling

Vannkvalitet

VERSJON

2

DATO

2013-12-31

FORFATTER

Stine Wiborg Dahle, Trond Rosten (SINTEF Fiskeri og havbruk), Astrid Buran Holan, Tor Ove Leiknes (NTNU), Catrine Ahlen og Marianne Aas (SINTEF Materialer og kjemi).

OPPDRAGSGIVER(E)

FHF

OPPDRAGSGIVERS REF.

Merete B. Schrøder

PROSJEKTNR

900933

ANTALL SIDER OG VEDLEGG:

21

SAMMENDRAG

Bakterien *Moritella viscosa* forårsaker sykdommen vintersår hos laks og kan føre til stor dødelighet hos smolt i sjøvann og sår hos laks som fører til nedklassing ved slakt. I tillegg til økonomiske tap er også sykdommen et velferdsproblem for fisken. Prosjektet tok sikte på å teste membranfiltrering av *M. viscosa*, og studere i hvilken grad membranen kan holde tilbake bakterien. *M. viscosa* infisert sjøvann ble membranfiltrert for å se om en slik vannbehandling kan holde tilbake bakterien og dermed benyttes som vannbehandling. I første forsøk ble råvann med en bakteriekonsentrasjon på $2,9 \times 10^6$ CFU/mL membranfiltrert. Etter to timer membranfiltrering var bakteriekonsentrasjonen redusert med 99,52 %. Ved artsidentifisering ble bakteriene i det filtrerte vannet (permeatet) bestemt til å være *M. viscosa*. Et nytt forsøk ble utført med en ubrukt membran. Dette forsøket viste en bakteriereduksjon på 99,99 %. *M. viscosa* som ble identifisert i permeatet etter filtrering antas å være kontaminering fra dråper i lufta og/eller fra permeatslangen, da forsøksoppsettet gjør det vanskelig å jobbe helt sterilt. Metoden er lovende som vannbehandling i både settefisk, lukkede og semi-lukkede anlegg for laks, for å hindre sykdomsfremkallende bakterier. Ytterligere tester under ulike betingelser, må foretas, ved siden av storskala feltutprøving.

UTARBEIDET AV

Stine Wiborg Dahle

SIGNATUR



KONTROLLERT AV

Jorunn Skjermo

SIGNATUR



GODKJENT AV

Trond Rosten

SIGNATUR



RAPPORTNR

A26021

ISBN

978-82-14-05714-0

GRADERING

Åpen

GRADERING DENNE SIDE

Åpen

Historikk

VERSJON	DATO	VERSJONSBEKRIVELSE
2	2013-12-31	Oppgradert etter referansegruppemøte

Innholdsfortegnelse

1	Sammendrag	4
2	Summary	4
3	Innledning	5
4	Problemstilling og formål	9
5	Materialer og metode	10
5.1	Forsøksoppsett.....	10
5.2	Oppdyrking av <i>Moritella viscosa</i> fra Veterinærinstituttet	10
5.3	Oppdyrking av <i>M. viscosa</i> til forsøk	10
5.4	Identifisering av bakterier.....	11
5.5	Membranfiltrering	11
6	Resultater og diskusjon	13
6.1	Oppdyrking av <i>Moritella viscosa</i> fra Veterinærinstituttet	13
	FORSØK 1.....	14
6.2	Oppdyrking av <i>M. viscosa</i> til forsøk	14
6.3	Membranfiltrering PURON®-membran.....	14
6.4	Morfologi bakterier	15
6.5	Artsidentifisering	15
6.6	Oppsummering Forsøk 1	16
	FORSØK 2.....	16
6.7	Oppdyrking av <i>M. viscosa</i> til forsøk	16
6.8	Membranfiltrering ZeeWeed 10-membran	16
6.9	Morfologi.....	17
6.10	Artsidentifisering.....	17
6.10	Oppsummering Forsøk 2	19
7	Konklusjon, nytteverdi og videre forskning	20
8	Leveranser	21
9	Kvalitetssikring	21
10	Referanser	21

1 Sammendrag

Bakterien *Moritella viscosa* forårsaker sykdommen vintersår hos laks og kan føre til stor dødelighet hos smolt i sjøvann og sår hos laks som fører til nedklassing ved slakt. I tillegg til økonomiske tap er også sykdommen et velferdsproblem for fisken. Prosjektet tok sikte på å teste ut om membranfiltrering, som er en avansert teknologi for partikkelseperasjon, kan holde tilbake *M. viscosa* fra kaldt sjøvann. *M. viscosa* infisert sjøvann ble membranfiltrert i to timer med en membran fra Koch Membrane Systems (laboratiemodell PURON), for å se om en slik vannbehandling kan holde tilbake bakterien og dermed potensielt benyttes som vannbehandling i lukkede og semi-lukkede anlegg for laks, eller for bruk i settefiskproduksjon for å hindre andre sykdomsbakterier. Råvannet som inneholdt en bakteriekonsentrasjon på $2,9 \times 10^6$ CFU/ml ble membranfiltrert i to timer. Etter membranfiltrering inneholdt det rensede vannet (permeatet) en bakteriekonsentrasjon på $1,4 \times 10^4$ CFU/mL. Dette betyr at en log removal – verdi (LRV) på 2,3 ble oppnådd, noe som tilsvarer en reduksjon på 99,52 %. Ved hjelp av artsidentifisering med verktøyet Maldi-TOF ble bakteriene i permeatet bestemt til å være *M. viscosa*. En ubrukt membran fra GE Zenon (laboratiemodell ZeeWeed 10) ble testet med identiske betingelser som første forsøk. Råvannet som inneholdt en bakteriekonsentrasjon på $2,1 \times 10^6$ CFU/ml ble membranfiltrert i én time. Etter membranfiltrering inneholdt permeatet 245 CFU/ml (*M. viscosa*) som tilsvarer en LRV på 3,9 og en bakteriereduksjon på 99,99 %. *M. viscosa* som ble identifisert i permeatet etter filtrering antas å være kontaminering fra dråper i lufta og/eller fra permeatslangen, da forsøksoppsettet gjør det vanskelig å jobbe helt sterilt. Metoden er lovende som potensiell vannbehandling i både settefiskanlegg, lukkede og semi-lukkede anlegg for laks, for å hindre sykdomsfremkallende bakterier, muligens også levendefisk transport i brønnbåt. Flere tester gjenstår imidlertid før en kan avgjøre om metoden er sikker og praktisk anvendbar.

2 Summary

This study describes membrane filtration of the gram negative bacteria *Moritella viscosa*, the causative agent of winter ulcer disease of farmed fish. The aim of the project was to study if membrane filtration can retain *M. viscosa* from cold seawater, and to evaluate if this treatment has the potential to improve today's technology as a disease controller in land based farming. *M. viscosa* infected seawater (2.9×10^6 CFU/ml) was membrane filtrated with a laboratory scale PURON membrane module from Koch Membrane Systems for two hours. After membrane filtration the cleaned water (permeate) contained a bacteria concentration of 1.4×10^4 CFU/ml. This corresponds

to a log removal value (LRV) of 2.3 which is a 99.52 % reduction of bacteria. The *M. viscosa* was identified in the permeate after filtration by species identification with Maldi-TOF. An unused membrane (GE Zenon, laboratory scale ZeeWeed 10 module) was also tested. *M. viscosa* infected seawater (2.1×10^6 CFU/ml) was membrane filtrated for one hour. After membrane filtration the concentration of *M. viscosa* was reduced to 245 CFU/ml. This corresponds to a log removal value (LRV) of 3.9 and a reduction of 99.99 %. *M. viscosa* identified could be caused by contamination, since the experiments didn't allow complete sterile conditions. The method is promising as a water treatment in both hatcheries, and closed and semi-closed farming, to avoid *M. viscosa* and other pathogenic bacteria.

3 Innledning

Prosjektet ble igangsatt som oppfølging av FHF utredning om forprosjekt lukkede anlegg (Rosten et al. 2011), der sårskader ble påpekt som en av de store utfordringene ved inntak av sjøvann til produksjon av laksesmolt, post-smolt og laks i lukkede anlegg. Problemet har lenge vært kjent i settefisknæringen, men ingen fullgod løsning for desinfeksjon av sjøvann har blitt identifisert. NTNU og SINTEF miljøet har lenge hatt en faglig styrke og interesse for vannbehandling med bruk av membraner. SINTEF har også spesiell kunnskap på identifisering av mikroorganismer som vi ønsket å benytte oss av. De lovende resultater med bakteriereduksjon ved bruk av membraner i produksjon av marin yngel (Holan, 2013), gav oss ideen om å teste om membranteknologien kunne benyttes til å stanse *Moritella viscosa*. Vi ønsket også ideen luftet med FHF og man ble enige om å gjennomføre et forprosjekt for å se om denne hypotesen stemte. Prosjektet ble omsøkt og oppnådde NOK 300.000,- i støtte fra FHF. Bevilgning ble gitt i september 2013. Prosjektet er å anse som en pilotstudie for å gi den første pekepinn på om membranfiltrering på sikt kan utvikles til bli en teknologi som kan inngå som forbedring av system for smittebarriere ved inntak eller utslipp av sjøvann. Det kan ikke slutes direkte av svarene at et slikt system kan implementeres for å løse problemene med vintersår, til det må flere tester og utviklingsarbeid gjennomføres for at man skal kunne få en sikker løsning i storskala.

Prosjektgruppen har bestått av:

Trond Rosten (Prosjektleder), Stine Wiborg Dahle, Jorunn Skjermo (kvalitetssikring) (SINTEF Fiskeri og havbruk AS), Astrid Buran Holan, Per-Arvid Wold, Tor Ove Leiknes (NTNU), Catrine Ahlen, Marianne Aas (SINTEF Materialer og kjemi), Eirik Biering (Veterinærinstituttet).

Styringsgruppen har bestått av: Frode Mathisen (Grieg Seafood ASA), Harald Sveier (Lerøy Seafood Group), Ørjan Tveiten (Marine Harvest Norway AS), Rolv Haugervoll (Lingalaks AS).

Vintersår og *Moritella viscosa*

Bakteriesykdommer har tidvis vært et stort problem i lakseoppdrett, og de senere år har det vært flere tilfeller av vintersår forårsaket av bakterien *Moritella viscosa*. Tapene har vært anslått til mer enn 100 millioner kroner (www.forskning.no, 15.09.09). Sykdommen er hyppigst å se på vinterhalvåret når det er lave vanntemperaturer. Sykdommen kan forårsake stor dødelighet på smolt som står i kar med sjøvann, men også på stor og liten laks i sjøen med nedklassing ved slakt som resultat. Den gram negative bakterien *M. viscosa* regnes som en viktig årsaksfaktor til sykdommen og en fellesnevner for utbrudd er eksponering for lave sjøtemperaturer og /eller infeksjon i sår etter mekanisk påførte skader. Ved infeksjon med *M. viscosa* får fisken store hudsår på sidene av kroppen (Figur 1). Vintersår settes ofte i forbindelse med inntak av sjøvann fra litt dypere og kaldere vannlag, og sykdommen har gitt store problemer i landbasert produksjon av settefisk av laks, der sjøvann benyttes. Infeksjon med *M. viscosa* er ikke meldepliktig, og det kan føre til underrapportering. I 2010 var det registrerte funn av *M. viscosa* på 55 lokaliteter, 47 med laks og 8 med regnbueørret. I 2009 var antallet 34. Ny forskning viser at bakteriestammene som gir sykdom hos regnbueørret er forskjellige fra de som gir sykdom på laks, og problemene synes å være alvorligst i noen områder på Nord-Vestlandet samt i Troms og Finnmark. I tillegg til de økonomiske tapene så er vintersår også et velferdsproblem for fisken. Sykdommen er smittsom fra fisk til fisk via sjøvannet men også spesielle forhold gjør at konsentrasjonen av bakterien øker i forhold til det som er vanlig. Skader knyttet opp mot håndtering og behandling kan også gjøre det lettere for fisken å bli rammet av bakterien og etablere et smittepress som også gjør at fisk med intakt hud utvikler sår.



Figur 1. Laks med vintersår. Foto: fra Forskning.no

Forlenget smoltfase (såkalt postsmolt) i landbaserte eller semi-lukkede oppdrettsanlegg i sjø er vurdert som et alternativ for å redusere oppholdstiden for fisken i åpne nøter. Dette setter også store krav til behandling av inntaksvann i slike systemer. Dagens semi-lukkede systemer i sjø har ikke løsninger for desinfeksjon av inntaksvann (Rosten *et al.*, 2013). Empiri fra settefiskanlegg viser at desinfeksjon med UV ikke fungerer som tilstrekkelig barriere for inntak av bakterien, og det kan være aktuelt å innføre konseptet om flere barrierer (multiple barriers) for å oppnå ønskede hygieniske forhold. Test av nye metoder som kan ha potensial for å forbedre dagens teknologi for smittebarriere vil tilføre ny kunnskap til feltet.

Membranfiltrering

Anvendelse

Bruk av membraner er en fysisk filtreringsprosess der vannet renses uten tilsetning av kjemikalier. Membranteknologi er mye anvendt i rensing av drikkevann og rensing av avløpsvann, samt avsalting av sjøvann. Dette er en avansert teknologi for partikkelseparasjon der størrelsen av partiklene som fjernes vil være avhengig av membrantypen anvendt. Det er med valg av ulike membraner mulig å gjennomføre alt fra mikrofiltrering (løste partikler i størrelsesområdet 0,05 – 10 µm) til revers osmose (monovalente salter og uløste syrer < 20 Ångstrøm). Dette gjør det mulig å filtrere vekk bakterier før vannet kommer til produksjonstankene. Forskning og utvikling av membranteknologi for avansert vannbehandling har vært et fokusområde ved Institutt for vann- og miljøteknikk (IVM) ved NTNU siden 1996. Aktiviteten har vært knyttet til anvendelse i drikkevannsbehandling (Leiknes *et al.*, 2005; Fiksdal and Leiknes, 2006; Leiknes and Ødegaard, 2007; Osterhus *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2011; Meyn *et al.*, 2012), rensing av avløpsvann (e.g. kommunal/industriell, avløpsvann på skip) (Ahl *et al.*, 2006; Leiknes and Ødegaard, 2007; Ivanovic and Leiknes, 2008; Ivanovic *et al.*, 2008; Phattaranawik and Leiknes, 2009; Sun *et al.*, 2009; Phattaranawik and Leiknes, 2010; Sun *et al.*, 2010a; Sun *et al.*, 2010b; Phattaranawik and Leiknes, 2011), og rensing av resirkulert vann i akvakulturanlegg (Holan *et al.*, 2013a; Holan *et al.*, 2013b; Holan *et al.*, 2013c; Wold *et al.*, In prep; Holan *et al.*, Submitted 2013; Wold *et al.*, Submitted 2013).

Mikro- og ultrafiltrering

Membranfiltrering i kategorien mikrofiltrering (MF) (0,05–10 µm porestørrelse) og ultrafiltrering (UF) (0,002 – 0,05 porestørrelse) brukes bl.a. for å fjerne partikler og mikroorganismer for produksjon av drikkevann og for rensing av avløpsvann (Van der Bruggen *et al.*, 2003). Flere studier viser at membranfiltrering er svært effektivt til å fjerne bakterier. Sharrer *et al.* (2007) viser til nesten 100 % reduksjon i antall bakterier ved filtrering av sjøvann ved bruk av en Kubota MF-membran (Japan) med en nominal porestørrelse på 0,4 µm. Dette viser at man ikke trenger å gå helt ned til UF for å oppnå ønsket bakteriereduksjon. Østerhus *et al.* (2007) oppnådde tilsvarende reduksjon i antall bakterier ved bruk av en ultrafiltreringsmembran (Zenon ZW10) med porestørrelse på 0,04 µm. UF- og MF-membraner har også blitt testet for forbehandling av sjøvann for fjerning av uønskede mikroalger.

Filtreringseffektiviteten og avvsningsmekanismen til en membran bestemmes hovedsakelig av størrelsen på porene, men også andre mekanismer kan øke avvsninga, som adsorpsjonsprosesser og kakefiltrering (filtrering gjennom et kakelag av celler og andre kolloidale partikler som akkumulerer på membranoverflaten) (Crittenden *et al.*, 2012). Disse mekanismene kan være viktige bidrag til avvsning for partikler nær porestørrelsen.

I følge Norsk drikkevannsforskrift (FOR 2001-12-04 nr 1372) må en hygienisk barriere kunne vise til minimum 3 log reduksjonsverdi (LRV) av bakterier for å være godkjent som hygienisk barriere. Dette tilsvarer en reduksjon på 99,9 %. I følge en rapport (Norwegian Water (Ødegaard *et al.*, 2009)) er UF-membran godkjent hygienisk barriere. Membraner har imidlertid i liten grad blitt benyttet til å stanse fiskepatogene bakterier og vår tilnærming var å undersøke dette nærmere og å bestemme tilhørende LRV-verdi. I følge Forskriften for desinfeksjon av inntaksvann og avløpsvann fra akvakulturrelatert aktivitet (FOR-1997-02-20-192) skal en hygienisk barriere til eksempel fylle kravet om 3 LRV for bakterien *Aeromonas salmonicida*.

Identifisering av bakterier - Maldi-TOF

I prosjektet skulle man identifisere eventuelle bakterier som vokse opp etter membranfiltrering med analyseverktøyet MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time-of-flight) Prøvene ioniseres skånsomt med laser før de separeres etter «time-of-flight» og identifiseres ved hjelp av massespektrometri. Resultatene blir sammenlignet med et bibliotek med kjente bakterieog i løpet av kort tidvil det genereres en liste med best samsvarende treff. Metoden er sensitiv og

tidsbesparende. SINTEF Materialer og kjemi har investert (2012) i software Biotyper RTC og Biotyper 3.0, som er installert på MALDI-TOF (UltraFlex – TOF/ TOF, Bruker Daltonics, Bremen) ved NTNU, DMF, Promec.

4 Problemstilling og formål

Prosjektet tok sikte på å teste ut en hypotese om at membranfiltrering av kaldt sjøvann infisert med *M. viscosa* ville holde tilbake *M. viscosa* og filtratet vil ha en betydelig redusert konsentrasjon av bakterien. Dette ville gi en indikasjon på om denne formen for vannbehandling kan brukes i utvikling av teknologi for vandedesinfeksjon for settefiskanlegg med sjøvannsinntak eller vandedesinfeksjon i semi-lukkede anlegg. Det ble tatt sikte på å bruke tilsats av en høy konsentrasjon av *M. viscosa* (jfr smitte modeller) og analysere sjøvannet før og etter filtrering med tanke på tilstedeværelse av *M. viscosa*. Bakteriekulturen ble innhentet i samarbeid med Veterinærinstituttet.

5 Materialer og metode

5.1 Forsøksoppsett

5.2 Oppdyrking av *Moritella viscosa* fra Veterinærinstituttet

To ulike stammer av *M. viscosa* fra laks (isolatnummer 2033 og 3999) ble levert fra Veterinærinstituttet i form av kolonier på blod agar (Figur 2).



Figur 2. Stamme av *M. viscosa* fra laks (isolatnummer 2033).

Kolonier ble plukket enkeltvis og dyrket opp i 50 ml flytende medium (Tryptic Soy Broth, TSB, Merck) tilsatt NaCl til en sluttkonsentrasjon på 2 %, i to døgn ved 15 °C og ved 200 rpm. Vekst ble målt jevnlig med plateleser (EPOCH plateleser, Bergman) med OD₅₉₀ og konsentrasjon bestemt ved utplating av ulike konsentrasjoner på 100 µl, til Tryptic Soy Agar (TSA) med 2 % NaCl. Agar ble inkubert ved 15 °C i to døgn for deretter å beregne CFU/ml. Bakteriene ble tatt ut i log-fase fra TSB og fryst ned i ampuller på 1 ml med 20 % glyserol ved -80 °C, for å benyttes ved membranfiltreringsforsøk.

5.3 Oppdyrking av *M. viscosa* til forsøk

1 ml fra glycerolstocks ble tint og tilsatt 50 ml TSB og dyrket i to døgn som ovenfor (4.1). Bakterievekst ble målt med plateleser og CFU/ml beregnet når bakteriene var i log-fase. Bakteriesuspensjonen ble så tilsatt til autoklavert sjøvann for membranfiltrering, til en konsentrasjon på omtrent 2-3 x 10⁶ CFU/ml. Denne konsentrasjonen er basert på studier av Løvoll *et al.* (2009) og Wallace *et al.* (2003) som benyttet en konsentrasjon på henholdsvis 7,0 x 10⁵ og 2,0 x 10⁵ CFU/ml for å infisere laks. I følge Meyn *et al.* (2012) vil en del av mikroorganismene kunne

feste seg til karveggene og andre overflater, og man bør derfor tilsette en høyere konsentrasjon for å oppnå et tilstrekkelig konsentrasjon i vannet.

5.4 Identifisering av bakterier

M. viscosa (isolat 2033) fra Veterinærinstituttet ble dyrket på TSA og ferske kolonier ble levert til SINTEF Materialer og kjemi for å benyttes som referansestamme for oppbygging av bibliotek over fiskepatogene stammer i Biotyper-databasen til MALDI-TOF (UltraFlex – TOF/ TOF, Bruker Daltonics, Bremen). Enkeltkolonier ble applisert på målplate og tilsatt α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA). Denne stammen ble benyttet som referanse, for å kunne sammenlikne eventuelle kolonier som vokser opp etter membranfiltrering

5.5 Membranfiltrering

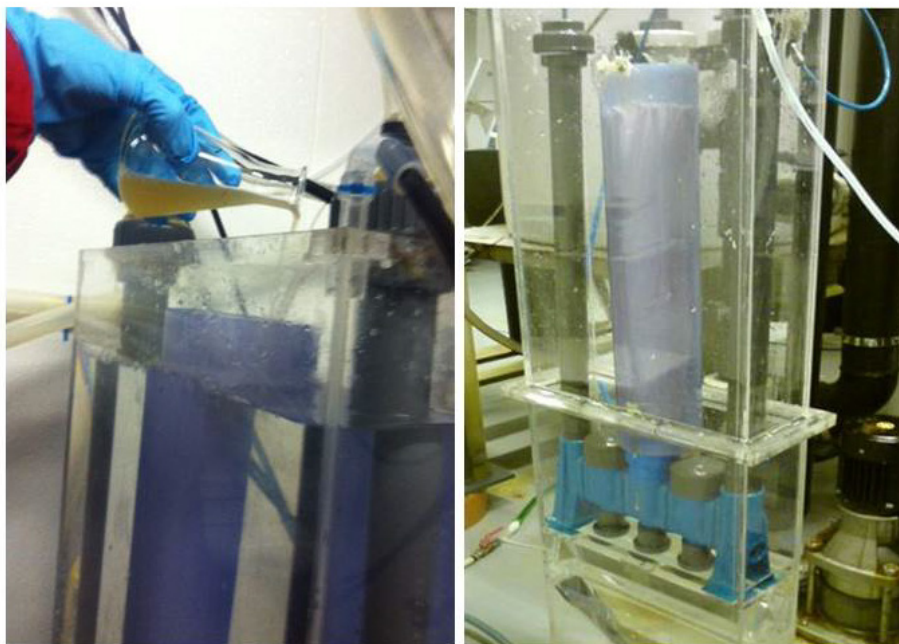
Membranfiltrering

Forsøk 1

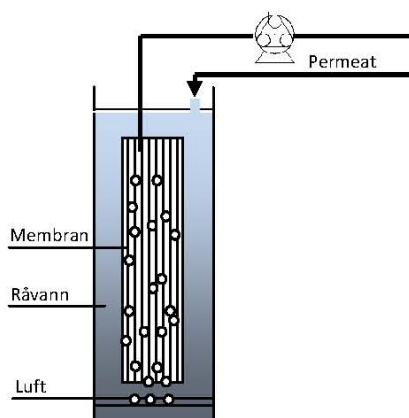
Membranen PURON® fra Koch Membrane Systems, nominell porestørrelse 50 nm, overflateareal 0,97 m² ble grundig rengjort ved å følge anbefalt prosedyre fra leverandøren som består av vasking med hypokloritt og sitronsyreløsning før forsøkene. Membranen ble deretter skylt med autoklavert ferskvann. Til 30 L autoklavert sjøvann med temperatur på 9,9 °C, pH på 7,97 og salinitet på 33 ‰ ble *M. viscosa* tilsatt i en konsentrasjon på $2,9 \times 10^6$ CFU/mL ($C_{\text{råvann}}$) (Figur 3) (målt konsentrasjon like etter tilsetning). Konsentrasjonen i råvannet holdes konstant gjennom forsøket. Luftbobling inne i membrantanken sørget for god, kontinuerlig omrøring (Figur 4). Membranen ble umiddelbart satt i gang med en konstant gjennomstrømning (flux) på 35 L/m²/h ved gitt temperatur.

Forsøk 2

Membranen ZeeWeed 10, GE Zenon, nominell porestørrelse 40 nm, overflateareal 0,93 m² ble grundig rengjort som i Forsøk 1. Til 8 L autoklavert sjøvann med temperatur på 10,7 °C, pH på 7,97 og salinitet på 34 ‰ ble *M. viscosa* tilsatt i en konsentrasjon på $2,1 \times 10^6$ CFU/mL ($C_{\text{råvann}}$). Konsentrasjonen i råvannet holdes konstant gjennom forsøket. Luftbobling inne i membrantanken sørget for god, kontinuerlig omrøring (Figur 4). Membranen ble umiddelbart satt i gang med en konstant gjennomstrømning på 36 L/m²/h ved gitt temperatur.



Figur 3. Tilsetning av kultur med *M. viscosa* til 30 liter råvann i membranen (venstre). PURON®-membran, Koch Membrane Systems (høyre).



Figur 4. Skisse av membranene benyttet i forsøkene, PURON®-membran og GE Zenon ZeeWeed 10-membran. Den peristaltiske pumpen genererer vakuum inne i de hule membranene. Dette er drivkraften som fører til at råvannet filtreres gjennom membranporene og det produseres renset vann (permeat). I dette oppsettet tilbakeføres permeatet til membrantanken.

Vannprøver

Permeatet (renset vann) ble overført aseptisk til sterile glassflasker for mikrobiologisk undersøkelse etter en og to timers filtrering for å se på renseeffektiviteten over tid. For å finne eventuell tilstedeværelse og konsentrasjon av *M. viscosa* ble tre vannprøver fra hvert tidspunkt platet ut på agar i ulike konsentrasjoner og med tre replikater av hver prøve. Ettersom bakterier kan adsorbere

til alle overflater (Meyn et al., 2012) ble nøyaktig bakteriekonsentrasjonen i membrantanken (råvannet) ($C_{\text{råvann}}$) målt ved 2 min etter tilsetning av bakterier/oppstart membranfiltrering. Man unngår da overestimering av bakteriefjerning (fjerning som ikke skyldes membranfiltreringa, men som skyldes adsorpsjon til alle typer overflater).

Bakteriereduksjon

Bakteriereduksjonen beregnes som log reduction value (LRV) ved hjelp av ligning 1, der C er antall bakteriekolonier per mL.

$$\text{LRV} = \log \frac{C_{\text{råvann}}}{C_{\text{permeat}}} \quad (1)$$

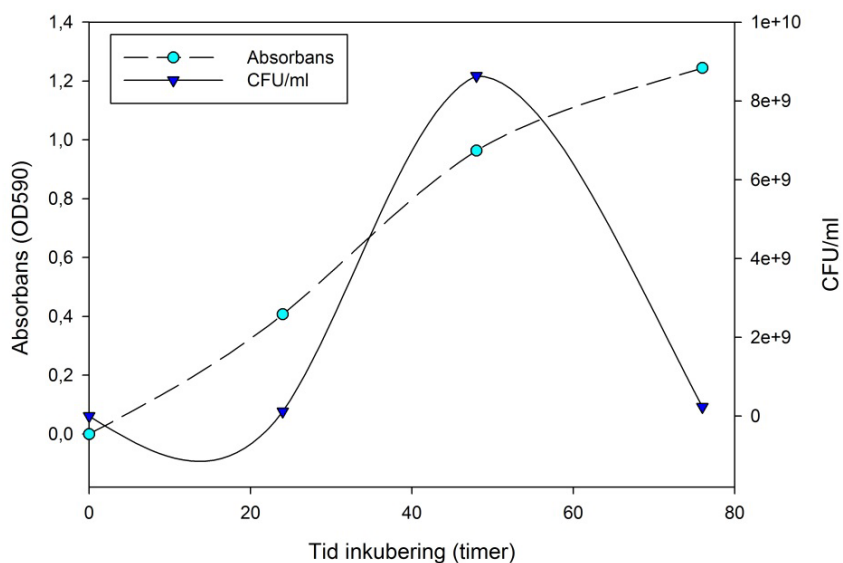
Artsidentifisering

Bakteriekolonier som vokste opp på agar etter membranfiltrering ble plukket enkeltvis og overført til nye agar (TSA) og deretter dyrket opp i vekstmedium (TSB) i to dager. 5 individuelle kolonier ble deretter strøket ut på nytt til fem nye agar (TSA), inkubert ved 15 °C i to dager og levert til SINTEF Materialer og kjemi for artsidentifisering ved hjelp av instrumentet MALDI-TOF (UltraFlex – TOF/ TOF, Bruker Daltonics, Bremen). Enkeltkolonier ble applisert på målplate og tilsatt α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA), deretter analysert og data prosessert ved bruk av software (Biotyper RTC og Biotyper 3.0).

6 Resultater og diskusjon

5.1 Oppdyrking av *Moritella viscosa* fra Veterinærinstituttet

M. viscosa isolat 2033 vokste bra ved 15 °C og oppnådde en OD på 1,25 i stasjonærfase. Dette er i samsvar med resultater fra Benediktsdottir *et al.* (2007) som hadde en maks OD på 1,5. Isolat 3999 hadde en lavere OD (0,3) og dermed ble isolat 2033 benyttet til selve membranfiltreringen. Isolat 2033 hadde en startkonsentrasjon på $6,99 \cdot 10^5$ CFU/ml. Høyeste konsentrasjon ble registrert etter 48 timer ($6,64 \cdot 10^9$ CFU/ml) (Figur 5). Bakterien bør høstes før 48 timer for å hindre at bakterien er i stasjonærfase/dødfase.



Figur 5. Vekstkurve for *Moritella viscosa* isolat 2033 ved OD₅₉₀ samt konsentrasjon i CFU/ml over en periode på 76 timer inkubering ved 15 °C.

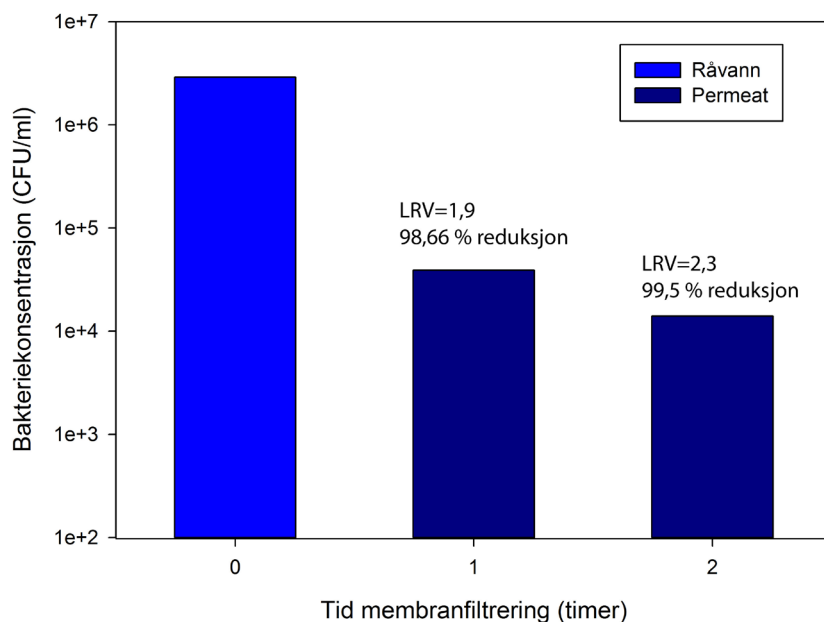
FORSØK 1

5.2 Oppdyrking av *M. viscosa* til forsøk

M. viscosa (isolat 2033) vokste bra og nådde en OD₅₉₀ på 1,0 etter 44 timer inkubering, som tilsvarer $8,5 \times 10^9$ CFU/ml ut fra Figur 5. Ved tilsetning av 40 ml av bakteriesuspensjonen til 30 liter råvann i membrantanken ble startkonsentrasjonen beregnet teoretisk til $1,1 \times 10^7$ CFU/ml ut fra Figur 5. Denne konsentrasjonen vet man vil reduseres når bakteriene kommer i kontakt med overflater etc. i membrantanken, nøyaktig konsentrasjon ble derfor målt like etter tilsetning.

5.3 Membranfiltrering PURON®-membran

Konsentrasjonen av bakterien i råvannet ($C_{\text{råvann}}$) ble målt til $2,9 \times 10^6$ CFU/mL 2 minutter etter tilsetning. Etter 1 time membranfiltrering hadde permeatet en konsentrasjon på $3,9 \times 10^4$ ($C_{\text{permeat 1}}$). Etter 2 timer membranfiltrering hadde permeatet en konsentrasjon på $1,4 \times 10^4$ CFU/mL ($C_{\text{permeat 2}}$). Ved hjelp av ligning 1 beregnes LRV etter 1 time til å være 1,9, noe som tilsvarer 98,66 % bakteriereduksjon, og etter to timer til å være 2,3, noe som tilsvarer 99,52 % bakteriereduksjon (Figur 6). Reduksjonen av bakteriekonsentrasjon i råvannet fra beregnet konsentrasjon på $1,1 \times 10^7$ CFU/mL til målt konsentrasjon på $2,9 \times 10^6$ CFU/mL ($C_{\text{råvann}}$) ved start skyldes mikroorganismenes evne til å feste seg til karvegger og andre overflater, og skal ikke tas med i beregning av LRV.



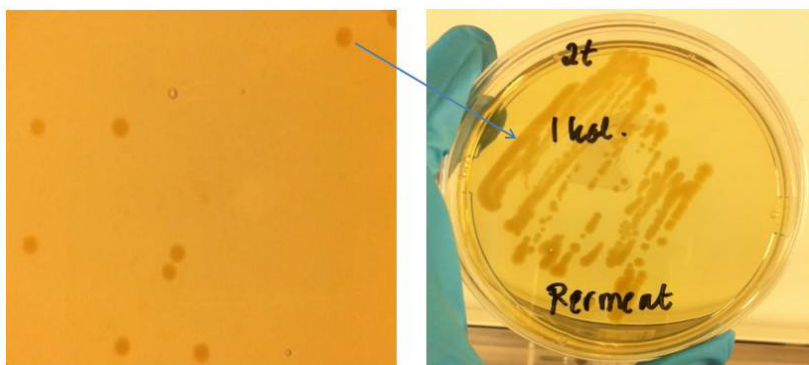
Figur 6. Konsentrasjon av bakterier (CFU/ml) i råvannet ved start, og i permeat etter 1 time og 2 timer membranfiltrering med PURON-membran. Y-akse vist i log-skala og starter på 1×10^2 .

5.4 Morfologi bakterier

Koloniene som vokste opp på agar fra råvannet og permeatet var sirkulære, ca. 1-2 mm i diameter og strågule i fargen (Figur 6, venstre). Denne visuelle observasjonen tilsier at det var nokså lik sammensetning av bakterier i råvann og permeat.

5.5 Artsidentifisering

Rendyrkede kolonier fra permeat etter 1 (n=2) og 2 timer membranfiltrering (n=3) (Figur 6, høyre) ble analysert ved hjelp av MALDI-TOF og fikk en score mot referansestammen av *M. Viscosa* på 2.385-2.499 (Tabell 1). Høy artsidentifikasjon gir en score mellom 2.300 og 3.000 (Tabell 2), som viser at disse bakteriene var *M. viscosa*, stamme 2033 som ble tilsatt til membrantanken.



Figur 7. Venstre: Kolonier på TSA etter 2 timer membranfiltrering (permeat). Høyre: Utstryk fra enkeltkoloni levert til artsidentifikasjon med Maldi-TOF.

Tabell 1: Score verdi fra analyse av bakterier med Maldi-TOF

Koloni	Prøve	Bakteriestamme	Score verdi
1	1 time membranfiltrering	<i>M. viscosa</i>	2,468
2	1 time membranfiltrering	<i>M. viscosa</i>	2,464
3	2 timer membranfiltrering	<i>M. viscosa</i>	2,451
4	2 timer membranfiltrering	<i>M. viscosa</i>	2,499
5	2 timer membranfiltrering	<i>M. viscosa</i>	2,385

Tabell 2: Rekkevidde og beskrivelse av resultater fra Maldi-TOF.

Range	Description
2.300...3.000	Highly probable species identification
2.000...2.299	Secure genus identification, probable species identification
1.700...1.999	Probable genus identification
0.000...1.699	Not reliable identification

5.6 Oppsummering Forsøk 1

Etter membranfiltrering med PURON-membranen ble konsentrasjonen av bakterier redusert med 98,66 og 99,52 % etter henholdsvis 1 time og 2 timer membranfiltrering. Artsidentifisering av koloniene ved bruk av Maldi-TOF viste at bakteriene i permeatet var *Moritella viscosa*. Siden *M. viscosa* er mye større enn porestørrelsen på membranen, antar man at det kan være kontaminering fra dråper i lufta og/eller fra permeatslangen, da forsøksoppsettet gjør det vanskelig å jobbe helt sterilt (**Figur 4**). For å utelukke at *M. viscosa* i permeatet skyldes skade på membranen, ble det satt i gang et nytt forsøk med en ubrukt membran (Forsøk 2). Artsidentifisering ved bruk av Maldi-TOF fungerer utmerket som et effektivt verktøy for å identifisere bakterier fra vann.

FORSØK 2

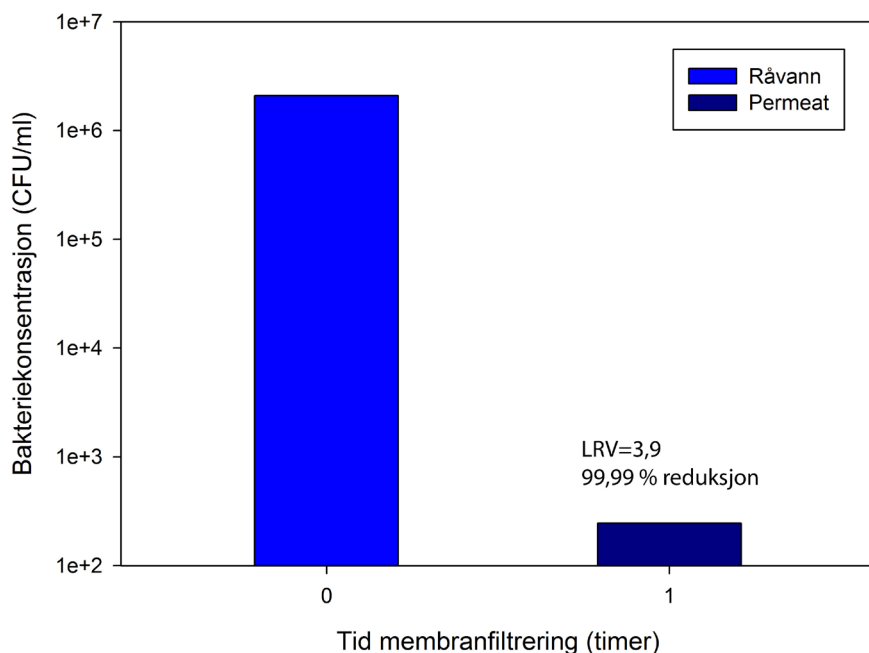
5.7 Oppdyrking av *M. viscosa* til forsøk

Ved tilsetning av 10 ml av bakteriesuspensjonen til 8 liter råvann i membrantanken ble startkonsentrasjonen beregnet til $1,0 \times 10^7$ CFU/ml ut fra Figur 5.

5.8 Membranfiltrering ZeeWeed 10-membran

Konsentrasjonen av bakterien i råvannet ved start ($C_{\text{råvann}}$) ble målt til $2,1 \times 10^6$ CFU/mL. Etter 1 time membranfiltrering hadde permeatet en konsentrasjon (C_{permeat}) på $2,5 \times 10^2$ CFU/mL. I følge ligning 1 er dette en log reduksjonsverdi (LRV) på 3,9, noe som tilsvarer 99,99 % bakteriereduksjon. Reduksjonen i råvannet fra beregnet konsentrasjon på $1,0 \times 10^7$ CFU/mL til 2,1

$\times 10^6$ CFU/mL ($C_{\text{råvann}}$) ved start skyldes mikroorganismenes evne til å feste seg til karvegger og andre overflater, og skal ikke tas med i beregning av LRV.



Figur 8. Konsentrasjon av bakterier (CFU/ml) i råvannet ved start og i permeatet etter 1 time ved membranfiltrering med GE Zenon ZeeWeed 10-membran. Y-akse vist i log-skala og starter på 1×10^2 .

5.9 Morfologi

Koloniene som vokste opp på agar fra råvannet og permeatet var like. Koloniene var sirkulære, ca. 1-2 mm i diameter og strågule i fargen. Dette kan indikere at det er de samme bakteriene i råvann og permeat. Koloniene var også identiske med kolonier fra forsøk 1.

5.10 Artsidentifisering

Rendyrkede kolonier fra permeat etter en time membranfiltrering (n=5) ble analysert ved hjelp av MALDI-TOF og fikk en score mot referansestammen av *M. Viscosa* på 2,502-2,604 (

Tabell 3). Høy artsidentifikasjon gir en score mellom 2.300 og 3.000 (Tabell 2), som viser at disse bakteriene var *M. viscosa*, stamme 2033 som ble tilsatt til membrantanken.

Tabell 3: Score verdi fra analyse av bakterier med Maldi-TOF

Koloni	Prøve	Bakteriestamme	Score verdi
1	1 time membranfiltrering	<i>M. viscosa</i>	2,561
2	1 time membranfiltrering	<i>M. viscosa</i>	2,604
3	1 time membranfiltrering	<i>M. viscosa</i>	2,589
4	1 time membranfiltrering	<i>M. viscosa</i>	2,558
5	1 time membranfiltrering	<i>M. viscosa</i>	2,502

5.10 Oppsummering Forsøk 2

Konsentrasjonen av bakteriene i tank ble beregnet til $2,1 \times 10^6$ CFU/mL ved start (råvannet). Etter 1 time membranfiltrering hadde permeatet en konsentrasjon på $2,5 \times 10^2$ CFU/mL. Dette tilsvarer en log reduksjonsverdi (LRV) på 3,9, noe som tilsvarer 99,99 % bakteriereduksjon. Reduksjonen i råvannet fra $1,0 \times 10^7$ CFU/ml ved start til $2,1 \times 10^6$ CFU/mL ved start skyldes mikroorganismene evne til å feste seg til karvegger og andre overflater, og skal ikke tas med i beregning av LRV. *M. viscosa* som ble identifisert på agar etter filtrering antas å være kontaminering fra dråper i lufta og/eller fra permeatslangen, da forsøksoppsettet gjør det vanskelig å jobbe helt sterilt (**Figur 4**).

7 Konklusjon, nytteverdi og videre forskning

Bruk av membranfiltrering førte i forsøk 1 og 2 til en bakteriereduksjon på henholdsvis 99,52 og 99,99 %, og en LRV på henholdsvis 2,3 og 3,9. Til sammenligning er rensekravet til hygienisk barrierer i drikkevannsrensing på 3 LRV for bakterier, og kravet til desinfeksjon av inntaksvann til akvakulturrelatert virksomhet 3 LRV for bakterien *Aeromonas salmonicida*. Metoden er dermed lovende som vannbehandling i både settefiskanlegg, lukkede og semi-lukkede anlegg for post-smolt og laks, for å hindre sykdomsfremkallende bakterier, og bakterier generelt. Dette kan bidra til ei mer stabil, forutsigbar, bærekraftig og lønnsom sjømatnæring.

Nye forsøk, både i lab - og storskalaforsøk bør utføres med bakgrunn i disse lovende resultatene. For å måle eksakt reduksjon i lab bør det gjøres forsøk hvor man unngår kontaminering bl.a. fra åpne membrantanker. I stor skala kan membranen installeres som en del av vannbehandlingen i resirkuleringsanlegget (delstrøm), eller som en filtreringsenhet i inntaksvannet til anlegget, gjerne i kombinasjon med desinfisering. Man kan da måle reduksjon i konsentrasjon av *M. viscosa* eller andre sykdomsbakterier som oppstår i produksjonen, og samtidig studere effekten av dette på fisken. *Flavobacterium psychrophilum* og *Yersinia ruckeri* (yersiniose/rødmunnssyke) er to sykdomsbakterier som kan forårsake store tap i settefiskanlegg hos laks og ørret, og vi ønsker også å studere i hvilken grad disse bakteriene kan holdes tilbake ved hjelp av membranfiltrering.

Siden membranfiltrering er en ny teknologi i akvakultur, er det nødvendig å designe og konfigurere membranteknologi for bruk i kommersielle anlegg. Valg av prosess teknologi er viktig for integrering av ny vannbehandling i akvakultur. Siden det finnes mange tilgjengelige membranleverandører verden over bør det testes ut flere membrantyper, og effekten av filtreringa bør dokumenteres i både lab – og fullskalautfordringer. Det bør også gjennomføres forsøk med mikrofiltrering (MF) som har en høyere vanngjennomstrømning, gjerne i kombinasjon med UV eller ozon (multiple barriers) for å oppnå ønskede hygieniske forhold. For å dokumentere membranfiltrering som en holdbar og pålitelig vannbehandling er det også vanlig å utføre konsistenskontroll (holdbarhetskontroll) og prosessoptimalisering for å avdekke imperfeksjoner i konstruksjonen. Selv om en membran har en levetid på flere år vil membranen degraderes over tid.

8 Leveranser

Leveranser i prosjektet

Sluttrapport til FHF

Planlagte publikasjoner

Dahle, S. W., Holan, A. B., Rosten, T Membranfiltrering- ny teknologi som smittebarriere i landbasert oppdrett. Sendes til det vitenskapelige tidsskriftet "Vann". 15.01.2014.

Formidling

Presentasjon for næringsaktører:

- (1) Referansegruppemøte den 19.12.2013
- (2) TekSET 2014 (Dahle, S. W. & Holan, A. B): Membranfiltrering- ny teknologi som smittebarriere i landbasert oppdrett. Trondheim, Clarion Konferansesenter, 06.02.14.

9 Kvalitetssikring

Kvalitetssikring er utført i henhold til interne rutiner ved SINTEF Fiskeri og havbruk. Kvalitetssikrer i prosjektet har vært Senior forsker Jorunn Skjermo, ved SINTEF Fiskeri og havbruk. Dette omfatter kvalitetssikring av prosjektet, sluttrapporten og er diskusjonspartner i prosjektperioden.

10 Referanser

- Ahl, R. M., T. Leiknes and H. Odegaard (2006). "Tracking particle size distributions in a moving bed biofilm membrane reactor for treatment of municipal wastewater." *Water Science and Technology* 53(7): 33-42.
- Benediktsdóttir, E. and K. J. Heidarsdóttir (2007). "Growth and lysis of the fish pathogen *Moritella viscosa*." *Letters in Applied Microbiology* 45(2): 115-120.
- Crittenden, J. C., R. R. Trussell, D. W. Hand, K. J. Howe and G. Tchobanoglous (2012). *Water treatment principles and design*. Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, Inc.
- FOR 2001-12-04 nr 1372: Forskrift om vannforsyning og drikkevann – Drikkevannsforskriften
- FOR-1997-02-20-19 Forskriften for desinfeksjon av inntaksvann og avløpsvann fra akvakulturrelatert aktivitet
- Fiksdal, L. and T. Leiknes (2006). "The effect of coagulation with MF/UF membrane filtration for the removal of virus in drinking water." *Journal of Membrane Science* 279(1-2): 364-371.
- Holan, A. B., P.-A. Wold and T. Leiknes (2013a). "Intensive rearing of cod larvae (*Gadus morhua*) in recirculating aquaculture systems (RAS) implementing a membrane bioreactor (MBR) for enhanced colloidal particle and fine suspended solids removal." *Aquacultural Engineering*.
- Holan, A. B., P.-A. Wold and T. O. Leiknes (Submitted 2013). "Assessment of a biofilm reactor coupled with membrane filtration for increased ammonia conversion, and reduced particle and nitrogen concentration in marine recirculating aquaculture systems (RAS)."
- Holan, A. B., P. A. Wold and T. O. Leiknes (2013b). "Membrane performance and fouling behaviour in marine recirculating aquaculture systems." *Aquacultural Engineering*.
- Holan, A. B., P. A. Wold, G. Oie and T. O. Leiknes (2013c). "Integrated Membrane Bioreactor for Water Quality Control in Marine Recirculating Aquaculture Systems." *Separation Science and Technology* 48(12): 1758-1767.

- Ivanovic, I. and T. Leiknes (2008). "Impact of aeration rates on particle colloidal fraction in the biofilm membrane bioreactor (BF-MBR)." *Desalination* 231(1-3): 182-190.
- Ivanovic, I., T. Leiknes and H. Odegaard (2008). "Fouling control by reduction of submicron particles in a BF-MBR with an integrated flocculation zone in the membrane reactor." *Separation Science and Technology* 43(7): 1871-1883.
- Leiknes, T., M. Lazarova and H. Odegaard (2005). "Development of a hybrid ozonation biofilm-membrane filtration process for the production of drinking water." *Water Science and Technology* 51(6-7): 241-248.
- Leiknes, T. and H. Odegaard (2007). "The development of a biofilm membrane bioreactor." *Desalination* 202(1-3): 135-143.
- Løvoll, M., C. R. Wiik-Nielsen, H. S. Tunsjø, D. Colquhoun, T. Lunder, H. Sørum and S. Grove (2009). "Atlantic salmon bath challenged with *Moritella viscosa* – Pathogen invasion and host response." *Fish & Shellfish Immunology* 26(6): 877-884.
- Meyn, T., T. O. Leiknes and A. Konig (2012). "MS2 removal from high NOM content surface water by coagulation - ceramic microfiltration, for potable water production." *Aiche Journal* 58(7): 2270-2281.
- Osterhus, S., K. Azrague, T. Leiknes and H. Odegaard (2007). "Membrane filtration for particles removal after ozonation-biofiltration." *Water Science and Technology* 56(10): 101-108.
- Phattaranawik, J. and T. Leiknes (2009). "Double-Deck Aerated Biofilm Membrane Bioreactor with Sludge Control for Municipal Wastewater Treatment." *Aiche Journal* 55(5): 1291-1297.
- Phattaranawik, J. and T. Leiknes (2010). "Study of Hybrid Vertical Anaerobic Sludge-Aerobic Biofilm Membrane Bioreactor for Wastewater Treatment." *Water Environment Research* 82(3): 273-280.
- Phattaranawik, J. and T. Leiknes (2011). "Extractive biofilm membrane bioreactor with energy recovery from excess aeration and new membrane fouling control." *Bioresource Technology* 102 (3): 2301-2307.
- Rosten, T., Ulgenes, Y., Henriksen, K., Terjesen, B.F., Biering, E., Winter, U., (2011). Oppdrett av laks og ørret i lukkede anlegg - forprosjekt (rapport A-21169). Trondheim: SINTEF Fiskeri og havbruk.
- Rosten, T., Terjesen, B. F., Ulgenes, Y., Henriksen, K., Biering, E., Winter, U. (2013). Lukkede oppdrettsanlegg i sjø-økt kunnskap er nødvendig. VANN 01 2013. p 5-13.
- Sharrer, M. J., Y. Tal, D. Ferrier, J. A. Hankins and S. T. Summerfelt (2007). "Membrane biological reactor treatment of a saline backwash flow from a recirculating aquaculture system." *Aquacultural Engineering* 36(2): 159-176.
- Sun, C., L. Fiksdal, A. Hanssen-Bauer, M. B. Rye and T. Leiknes (2011). "Characterization of membrane biofouling at different operating conditions (flux) in drinking water treatment using confocal laser scanning microscopy (CLSM) and image analysis." *Journal of Membrane Science* 382 (1-2): 194-201.
- Sun, C., T. Leiknes, J. Weitzenböck and B. Thorstensen (2009). "The effect of bilge water on a Biofilm-MBR process in an integrated shipboard wastewater treatment system." *Desalination* 236(1-3): 56-64.
- Sun, C., T. Leiknes, J. Weitzenböck and B. Thorstensen (2010a). "Development of a biofilm-MBR for shipboard wastewater treatment: The effect of process configuration." *Desalination* 250(2): 745-750.
- Sun, C., T. Leiknes, J. Weitzenböck and B. Thorstensen (2010b). "Salinity effect on a biofilm-MBR process for shipboard wastewater treatment." *Separation and Purification Technology* 72(3): 380-387.
- Van der Bruggen, B., C. Vandecasteele, T. Van Gestel, W. Doyen and R. Leysen (2003). "A review of pressure-driven membrane processes in wastewater treatment and drinking water production." *Environmental Progress* 22(1): 46-56.
- Wallace, C., Maira, C., Syvertsen, C., Thoen, E. and Midtlyng, P.J. (2003). Vaccine performance testing with *Moritella viscosa* using different challenge models. Poster presented at 3rd International Symposium on Fish Vaccinology, Bergen 2003.
- Wold, P.-A., A. B. Holan, T. Bardal, E. Kjørsvik and T. O. Leiknes (In prep). "Impact of membrane filtration in a recirculating aquaculture system (RAS) on growth, development and performance of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. "
- Wold, P. A., A. B. Holan, G. Øie, K. Attramadal, I. Bakke, O. Vadstein and T. O. Leiknes (Submitted 2013). "Effects of membrane filtration on bacterial number and microbial diversity in marine recirculating aquaculture systems (RAS) "
- Østergaard, H, Østerhus, S. and Melin, E. (2009). Norwegian Waters BA. Rapport on optimal disinfection practise (nr. 169)



Teknologi for et bedre samfunn

www.sintef.no