

Oppdrett av marin fisk og skjell har et svært potensial i Norge. En forutsetning for å få dette til er stabil og sikker tilgang på yngel. Vaksiner må skreddersys for den enkelte oppdrettsart, og ny vaksineteknologi kan gi oss mer effektive vaksiner. Skjell og tidlige livsstadier av fisk kan ikke vaksineres, og man er avhengig av andre tiltak for å forebygge sykdom. Det må også utvikles effektive behandlingsprosedyrer for de ulike artene. Sentralt står funn av sykdomsframkallende bakterier og bruk av gunstige bakterier som sykdomsforebyggende tiltak, såkalte probiotika. Nye og mer avanserte oppdrettssystemer er også tatt i bruk. Produksjonen av kamskjellyngel har økt kraftig, og det er slutt på all bruk av antibiotika i yngelproduksjonen.

Øivind Bergh

oivind.bergh@imr.no

Audun Nerland

audun.nerland@imr.no

Ole B. Samuelsen

ole.samuelsen@imr.no

Skjell og fiskelarver kan ikke vaksineres

Mens fiskeoppdrett er helt avhengig av vaksiner, er man avhengig av å bruke andre teknikker for å beskytte skjell mot sykdom. Skjell tilhører en dyregruppe som etter det vi i dag vet ikke har noen immunologisk "hukommelse". De mekanismene og celletypene som finnes hos fisk og mennesker som gjør at immunforsvaret reagerer på en vaksine og "husker" antigenene som fantes i vaksinen, finnes ikke hos skjell. Dette vil ikke si at skjell mangler immunforsvar. Tvert i mot må vi huske at skjell er tilpasset gjennom millioner av år til å leve i et miljø med høye konsentrasjoner av bakterier, og at bakterier utgjør en del av næringen til skjellene. Det er ikke mulig å leve på en slik måte uten å ha utviklet ganske gode beskyttelsesmekanismer. Andre deler av immunforsvaret er derfor godt utviklet hos skjell. Det er sannsynlig at såkalt uspesifikk immunstimulering vil kunne brukes med godt resultat. Tilsetning av gunstige bakterier, såkalte *probiotika*, dels for å stimulere immunforsvaret, og dels for å holde sykdomsframkallende bakterier borte, er antakelig en vei å gå.

Fiskelarver kan heller ikke vaksineres. De fleste fiskearter klekker på et relativt primitivt utviklingsstadium, og de delene av immunforsvaret som kan kjenne igjen "fiender" blir først utviklet noe seinere. Fra studier av kveite, torsk og piggvar vet vi at dette først skjer etter startføring. I praksis betyr dette at man er avhengig av andre metoder for sykdomsforebygging. Både hygiene, probiotika og uspesifikk immunstimulering kan være viktige komponenter.

"Fingeravtrykk" av hele bakteriesamfunnet

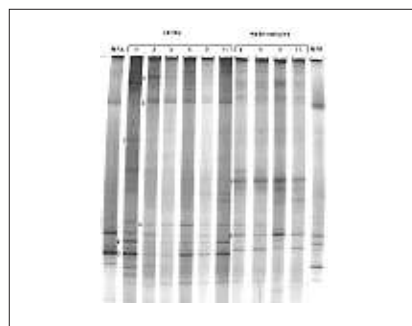
Tradisjonelle mikrobiologiske teknikker som brukes i klassisk veterinærmedisin og fiske- og skjellhelse er basert på dyrking av bakterier på ulike dyrkningsmedier. Slike teknikker er nyttige for å påvise for eksempel bakterier i blodbanen hos større fisk. Hvis man f.eks. studerer

spinkle skjellarver med størrelse på en tidels millimeter, har de imidlertid klare begrensninger. I praksis vil man oppleve at man isolerer mange forskjellige arter bakterier, og at hver og en av disse kan antas å spille en rolle. Man får bare et lite gløtt inn i sammensetningen av bakteriesamfunnet. En vesentlig andel av de bakteriene som finnes i samfunnet vil ikke la seg dyrke, og forblir uoppdaget. I tillegg vil man fort støte på det problemet at "klassiske" mikrobiologiske teknikker er svært arbeidskrevende, og at man må begrense seg til noen få gløtt inn i bakteriesamfunnene. Sammenlikninger mellom ulike akvakultursystemer, effekter av ulike behandlinger over tid, eller effekter av ulike miljøparametere, blir da i praksis umulig å gjennomføre. I våre tidligere prosjekter har vi brukt slike "klassiske" teknikker og skaffet oss et lite overblikk over mikroorganismene som er assosiert med skjellarver. Fra homogenater av skjellarver og fra algekulturene har vi isolert og karakterisert bakterier som kan forårsake dødelighet hos skjellene. Smitteforsøk har vært utført med skjellarvene og har bekreftet disse bakterienes evne til å forårsake dødelighet. Det er påvist flere ulike sykdomsframkallende bakteriestammer, men viktigst er *Vibrio splendidus* og en bakterie i slekten *Pseudoalteromonas*. Parallelt med dette undersøkte vi patologi ved infeksjoner forårsaket av slike bakterier, og bekreftet at disse bakteriene virkelig forårsaket sykdom hos skjellarvene. Det er imidlertid ikke slik at alle bakteriene har negative effekter for larvene. Tvert i mot er det grunn til å tro at mange av dem har positive effekter. Noen av bakteriene ga økt overlevelse i "smitteforsøk", og det er grunn til å tro at det bør være mulig å utvikle et probiotikakonsept basert på disse.

Vi har hentet teknologi fra studier av mikroorganismenes økologi. Forskere som arbeider med mikroorganismer i jord, sedimenter og i marine systemer har i lengre tid arbeidet med å utvikle metoder som kan gi overblikk over hele bakteriesamfunnet i de systemene som studeres. Dette forskningsfeltet er en rik kilde til metoder som kan brukes i akvakultursammenheng. Vår metodikk for overvåking av bakteriesamfunn assosiert med larver og akvakultursystemer (inntaksvann, vann i oppdrettsenheter, utslippsvann, levedefør og algekulturer) gir i prinsippet et

Figur 5.5.1

Et eksempel på sammenlikning mellom bakterieflora på kamskjellarver og vannprøver på ulike dager i larveutviklingen (dag 0–11). Hver kolonne representerer et bakteriesamfunn, og hvert bånd representerer i prinsippet en bakterieart. Hvert bånd er et DNA-fragment fra disse bakteriene. Det kan stanses ut, man kan sekvensere DNA-et, og bruke dette til å identifisere bakterien. Slik kan man identifisere bakteriene uten å dyrke dem. Figuren er hentet fra Sandaa RA, Torkildsen L, Magnesen T, Bergh Ø. (2003). *Syst. Appl. Microbiol.* 26:302-311. *A comparison of the bacterial microflora of scallop larvae and water samples at different days in the larval development (days 0–11). Each column represents a bacterial community, and each band represents in principle one bacterial species. Each band consists of an amplified DNA fragment. The DNA can be sequenced, and this information can be used to identify the bacterium. This method makes it possible to identify the bacteria without cultivation.*



“genetisk fingeravtrykk” av alle bakteriene i en populasjon, enten de kan dyrkes eller ei.

Prinsippet for metoden er at man isolerer alt DNA fra en prøve, og deretter isolerer og oppformerer spesifikt såkalt 16S ribosomal-DNA. Dette er genetisk materiale som finnes i alle bakterier og egentlig har samme funksjon i dem alle: Det koder for en del av ribosomene, som spiller en viktig rolle i syntesen av proteiner. Slikt genetisk materiale utgjør en såkalt “biologisk klokke”. Jo mer likt 16S ribosomal-DNA er hos to bakterier, jo mer slektskap er det mellom de to bakteriene. Det finnes store internett-databaser tilgjengelig der man kan søke etter “slektninger” til det 16S ribosomal-DNA-et man har funnet. Ved å separere 16S ribosomal-DNA fra ulike bakterier ved hjelp av en såkalt Denaturerende Gradient GelElektroforese (DGGE), kan man skille de ulike bakterietypene i en prøve fra hverandre. Hvert bånd på gelen på figur tre utgjør som oftest i prinsippet DNA fra en bakterietype. Det er mulig å sekvensere dette genetiske materialet, og bruke dette til identifikasjon av bakteriene. Vi kan si at DGGE-metodikken gir oss et “genetisk fingeravtrykk av et helt bakteriesamfunn”.

Anvendelse av ny mikrobiologisk kunnskap

Vi har brukt slik metodikk til å kartlegge oppformering og spredning av sykdomsframkallende bakterier i yngelproduksjonsanlegget, og studere effekten av ulike mottiltak. Vi har oppnådd en langt mer detaljert oversikt over hvilke bakterier som finnes i de ulike delene av produksjonen enn det som hadde vært mulig med tradisjonelle mikrobiologiske teknikker. Vi arbeider nå med implementering av tilsvarende metodikk i forskningsprosjekter rundt torskeyngelproduksjon. Her er det også betydelige bakterielle problemer, og høy dødelighet som følge av dette. Heller ikke tidlige livsstadier av torsk og kveite kan vaksineres, og problemstillingene har mange fellestrekk med produksjon av

skjellyngel. Ved å overvåke bakteriesamfunnene tilknyttet larver og -yngel kan vi si noe om hvilke bakterier som er assosiert med god overlevelse. Siden torsk, kveite og kamskjell er svært forskjellige organismer med ekstremt forskjellige larvestadier, er det store forskjeller med hensyn til hvilke bakteriearter som kan leve sammen med larvene. Målet vårt er konsepter for sykdomskontroll og probiotika som er spesialtilpasset hver oppdrettsart.

Bakterier og kamskjell

De tre–fire første ukene av livet er kamskjell fritt svømmende planktonorganismer som er ca. en tidels millimeter store. Det å oppdrette slike organismer er en enorm biologisk utfordring. Erfaringer både fra Norge og andre land tilsier at larvene er ekstremt sårbare for opportunistiske bakterier. Høy dødelighet er mer regel enn unntak. Tidligere var man avhengig av antibiotika for å få larvene gjennom disse stadiene.

Yngelproduksjon av kamskjell er en krevende prosess med flere ulike elementer. Flere ulike algearter skal dyrkes med tilfredsstillende kvalitet, og tilføres skjellyngelen. Algekulturene er assosiert med bakterier. Det dreier seg ikke om enkeltbakterier, eller kulturer av noen få bakteriestammer. Hver kultur er en komplisert miks av mikroorganismer, med en dominerende algekultur, og en rekke forskjellige bakteriearter i større eller mindre mengder. Vi bruker vanligvis ordet “samfunn” om slike samlinger av mange organismer. Algekulturene er assosiert med hvert sitt bakteriesamfunn, og det finnes egne bakteriesamfunn som er assosiert med forskjellige oppdrettsystemer for skjellarver og -yngel.

Hver av algeartene som dyrkes er assosiert med sitt eget bakteriesamfunn. Variasjoner i oppdrettsystemer for skjellarver kan ha svært stor innvirkning på bakteriesamfunnet i vannet, og til dels også på larvene. Overgangen til gjennomstrømningsystemer for de fritt svømmende

larvestadiene har medført en endring i bakteriesamfunnet i gunstig retning, med betydelig bedring i overlevelse og vekst som resultat. Det er dette som har gjort det mulig å avslutte all bruk av antibiotika i kamskjellklekkeriet.

Vi har også kartlagt oppformering og spredning av gunstige bakterier i anlegget. Disse bakteriene ble oppformert i et biofiltersystem og tilsatt larvetankene i en kontinuerlig strøm derfra. Dette kan være en kostnadseffektiv og enkel metode for å tilsette probiotika til vann i oppdrettsenheter i stor skala. Nå arbeider vi med å studere kvantitative aspekter av slik tilsetting av probiotika. Her skal blant annet såkalt “kvantitativ PCR” brukes. Metodikken som er utviklet i våre prosjekter kan brukes i mange forskjellige systemer og uavhengig av art.

Probiotika til kveite og torsk?

Vi arbeider nå med implementering av tilsvarende metodikk i forskningsprosjekter rundt torskeyngelproduksjon. Her er det også betydelige bakterielle problemer, og høy dødelighet som følge av dette. Spesi-

**Figur 5.5.2**

Kamskjellarver er spinkle planktonorganismer (60–120 µm) som lever av å filtrere alger og bakterier fra vann. *Scallop larvae are tiny planktonic organisms (60–120 µm) feeding on microalgae and bacteria.*

elt bør vi være oppmerksom på tendenser til en foruroligende økning av antibiotikabruken i torskoppdrett de siste årene. Ved å overvåke bakteriesamfunnene tilknyttet larver og yngel kan vi si noe om hvilke bakterier som er assosiert med god overlevelse. Siden torsk, kveite og kamskjell er svært forskjellige organismer med ekstremt forskjellige larvestadier, er det store forskjeller med hensyn til hvilke bakteriearter som kan leve sammen med larvene. Målet vårt er konsepter for sykdomskontroll og probiotika som er spesielt tilpasset hver oppdrettsart.

Nye vaksiner

Vaksiner har vært det klart viktigste elementet i forebyggende sykdomsarbeid i norsk akvakultur. Utviklingen av effektive vaksiner mot kaldtvannsvibriose og furunkulose var hovedårsaken til den kraftige nedgangen i antibiotikaforbruket tidlig på nittitallet. Industrialisert fiskeoppdrett som vi kjenner det i dag er en umulighet uten systematisk bruk av gode vaksiner.

I sin enkleste form er vaksiner basert på drepte eller svekkede mikroorganismer. Vaksinerne mot de vanlige bakterielle sykdommene er basert på at mikroorganismene dyrkes opp i store mengder, og drepes med formalin. For kaldtvannsvibriosen var dette tilstrekkelig. For furunkulosevaksinen måtte man i tillegg inkorporere en såkalt "adjuvans", som er et hjelpestoff som øker effekten av vaksinen. Tradisjonelle vaksiner mot virus inneholder drepte eller svekkede virus, men det er ofte vanskelig å få tilstrekkelige mengder av viruset til at man klarer å få til en immunologisk respons.

De senere årene har rekombinant DNA-teknologi blitt benyttet i vaksineutvikling. Et eksempel på bruk av slik teknologi er en vaksine mot IPNV som ble tatt i bruk i Norge for noen år siden. Her bruker man en

genetisk modifisert bakterie til å lage store mengder av et overflateprotein fra viruset. Det er dette overflateproteinet som er vaksinen. Den genmodifiserte bakterien slipper aldri ut av laboratoriet, og selve fisken utsettes bare for et protein. Mange vanlig brukte legemidler til mennesker og dyr produseres i dag på denne måten, og slik bruk av bioteknologi er ikke regnet som kontroversiell i dag. Forskningsfronten i dag tar utgangspunkt i bioinformatikk som kan brukes til å kartlegge overflatestrukturer på mikroorganismene som kan være interessante for vaksineutvikling.

En annen forskningsfront er såkalte DNA-vaksiner. Her settes genet fra mikroorganismen inn i dyret som blir vaksinert, slik at dyret selv produserer det stoffet som skal gi et immunsvær. Erfaringer fra laboratorieforsøk er svært lovende. Metoden er sikker, billig og gir god beskyttelse. Negative konsekvenser av slike vaksiner er ikke kjent. Om de likevel blir tatt i bruk i oppdrett kan ha mer med markedsaksept enn med biologi å gjøre.

Behandling: Hver art er spesiell

Selv om hovedfokus i fiskehelsearbeid må være på sykdomsforebyggelse, er det helt nødvendig å sikre at den fisken som likevel blir syk får adekvat behandling. Det å holde dyr i fangenskap forplikter, og syke dyr har krav på behandling. Vi kan si at forebyggelse er Plan A, og behandling er Plan B. Å satse alt på at Plan A alltid holder vil være uetisk og urealistisk. Erfaring har vist at kunnskapen om behandling av marine fiskearter er utilstrekkelig. I praksis har veterinærene vært henvist til å behandle kveite og torsk etter samme prosedyrer som fantes for laks. Fysiologien til disse artene er svært ulik, og de står også langt fra hverandre i utviklingsbiologien.

Havforskningsinstituttet har de seinere årene gjennomført en rekke forsøk med behandling av kveite, torsk og ulike lep-

pefisk. Dels har vi gjennomført farmakokinetiske studier, dvs. kartlagt hvordan legemidler distribueres i ulike vev og etter hvert skilles ut, og dels har vi studert effektivitet av ulike behandlingsregimer. Det er også mulig å lage prosedyrer for tilsetning av legemidler via levendefôr. Flere kvalitetssikrede prosedyrer for behandling av disse artene er nå tilgjengelige. De siste årene har vi spesielt fokusert på torsk. Dette er begrunnet i den betydelige veksten i torskenæringen. Et hovedprinsipp er at minst to uavhengige behandlingsprosedyrer må være tilgjengelige for hver oppdrettsart. Ved at veterinærene kan veksle systematisk mellom ulike legemidler, kan problemer med resistensutvikling begrenses kraftig.

Summary

Cultivation of marine fish and shellfish has a great potential in Norway. A prerequisite for this is a stable and safe production of juveniles. Vaccines must be tailor-made for each species, and new vaccine technology can provide more efficient vaccines. Bivalves and early stages of fish cannot be vaccinated, and one is dependent of other methods for prevention of disease. More advanced culture systems have a positive effect on larval health. All use of antibiotics in Norwegian scallop juvenile production has now been terminated.