

Rapportnummer - Åpen

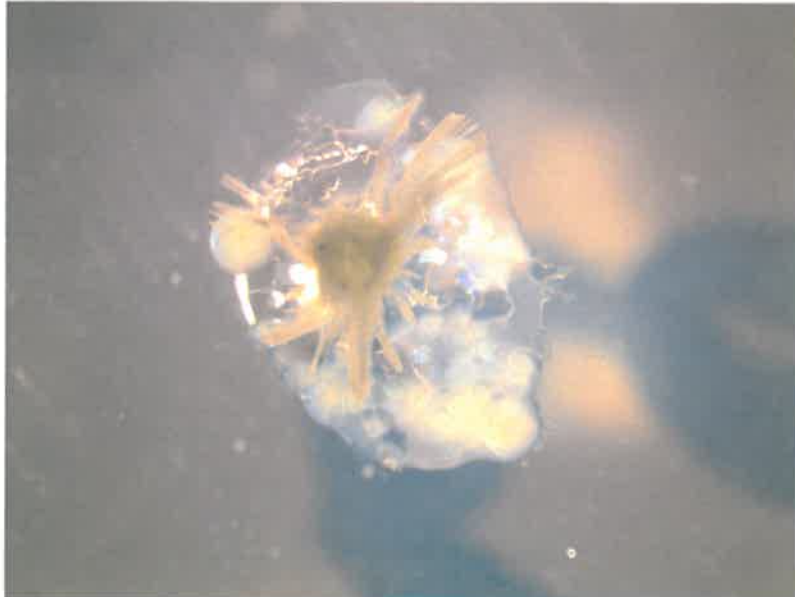
Rapport

Desinfisering av berggyltegg

Test av ulike desinfiseringsmidler
Delprosjekt 2: Rognbehandling

Forfatter(e)

Stine Wiborg Dahle
Gunvor Øie
Ingrid Lein



Rapport

Desinfisering av berggyltegg

Test av ulike desinfiseringsmidler
Delprosjekt 2: Rognbehandling

EMNEORD:

Leppefisk
Berggylt
Egg
Overflatedesinfeksjon

VERSJON

1

DATO

2013-03-21

FORFATTER(E)

Stine Wiborg Dahle
Gunvor Øie
Ingrid Lein

OPPDRAGSGIVER(E)

FHF

OPPDRAGSGIVERS REF.

Eirik Sigstadstø

PROSJEKTNR

MRT 6020132

ANTALL SIDER OG VEDLEGG:

11

SAMMENDRAG

Desinfisering av berggyltegg

Overflatedesinfeksjon av leppefiskegg ble utført med bruk av Pyceze[®] og gluteraldehyd (400 ppm) med 4 og 8 minutter eksponeringstid. Hurtigvoksende bakterier ble registrert etter to dager inkubering på agar hvor det ble registrert minst bakterievekst på egg som var blitt desinfisert med gluteraldehyd i 4 minutter. Denne behandlingen gav 20 % egg med bakterievekst samt høyest klekkeprosent (63 %). Gluteraldehyd i 8 minutter gav 27 % egg med bakterievekst. I behandlingen med Pyceze[®] var alle eggene begrodd med bakterier, i likhet med kontrollen uten desinfisering (100 %). Gluteraldehyd 400 ppm i 4 minutter eksponeringstid ser dermed ut til å sikre minst bakterievekst, høyeste klekkeprosent og best hygiene under inkubering av egg fra berggylt.

UTARBEIDET AV

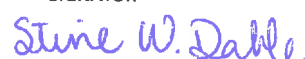
Stine Wiborg Dahle

SIGNATUR**KONTROLLERT AV**

Gunvor Øie

SIGNATUR**GODKJENT AV**

Stine Wiborg Dahle

SIGNATUR**RAPPORTNR**

Rapportnr

ISBN

ISBN-nummer

GRADERING

Åpen

GRADERING DENNE SIDE

Åpen

Historikk

VERSJON	DATO	VERSJONSBEKRIVELSE
1	2013-02-08	Utkast

Innholdsfortegnelse

1	Mål	4
2	Metode	4
	2.1 Desinfisering.....	4
	2.2 Bildebehandlingsanalyse.....	6
3	Resultater	6
	3.1 Bakterievekst	6
	3.2 Klekkeprosent	8
	3.3 Beregning av egg på gytematter	8
4	Diskusjon	9
5	Konklusjon	10
6	Referanser.....	10

BILAG/VEDLEGG

1. Rådata fra desinfiseringsforsøk

1 Mål

Målet med forsøkene var å teste ulike desinfiseringsmiddel i overflatedesinfeksjon for å oppnå minst mulig bakterievekst og best mulig hygiene under inkubering av egg fra berggylt. I tillegg skulle man teste ut bildehandlingsanalyse av egg for å kunne beregne antall egg på gytematter automatisk.

2 Metode

Dette delprosjektet ble utført i samarbeid mellom Nofima og SINTEF Fiskeri og havbruk (SINTEF F&H). Metoden ble første gang testet ut i et mindre forsøk i juli 2011 hvor en masterstudent fra NTNU deltok (Katrine Singasaas). Hensikten med dette forsøket var å teste om metoden fungerte etter hensikten. På grunn av kort gytesesong med nyinnfanget stamfisk i 2011 ble det ikke mulig å gjennomføre flere forsøk i 2011. Ut fra disse resultatene i pilotforsøket ble det i samarbeid med Ingrid Lein fra Nofima lagt planer for forsøksaktivitet i 2012. Det ble i 2012 gjennomført to runder med desinfiseringsforsøk ved Nofima Sunndalsøra, første runde i juni, og andre runde i juli. I det første forsøket deltok Gunvor Øie fra SINTEF, mens forsøket i juli ble gjennomført av Nofima alene (Tabell 1).

Tabell 1. Deltakere og ansvarsfordeling under forsøkene

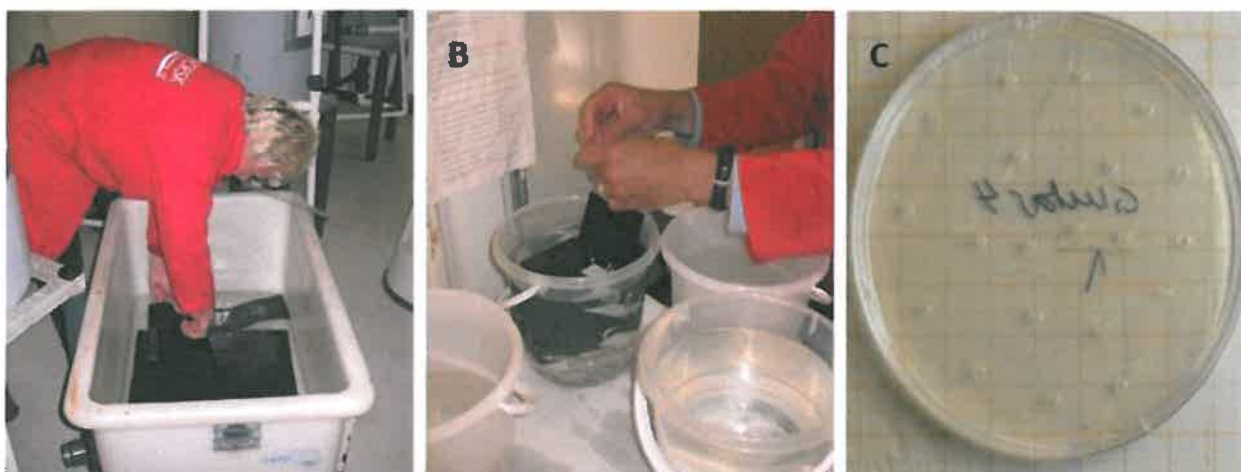
Navn	Ansvarsområde	Institusjon
Ingrid Lein	Forsøksansvarlig	Nofima
Yoav Barr	Utføring av forsøk	
Stine Wiborg Dahle	Mikrobiologi	SINTEF F&H
Gunvor Øie	Utføring av forsøk 1	
Andreas Hagemann	Billedokumentasjon agar	
Morten Alver	Bildeanalyse av egg på gytematter	
Katrine Singasaas	Uttesting av metode	NTNU/SINTEF F&H

2.1 Desinfisering

To ulike desinfeksjonsmidler ble benyttet samt ulik eksponeringstid på behandling. Følgende behandlinger ble benyttet:

- 1 Pyceze® – I henhold til prosedyre fra leverandør
- 2 Gluteraldehyd – 400 ppm i 4 minutter
- 3 Gluteraldehyd – 400 ppm i 8 minutter
- 4 Kontroll uten desinfeksjon

Under gyteperioden til stamfisken ble egg samlet opp på gytematter i stamfiskkarene. Gytemattene ble deretter tatt ut av stamfiskkarene og klippet opp (Figur 1A) og lagt ned i sjøvann med de ulike desinfiseringsmidlene samt kontroll uten desinfeksjon (Figur 1B). Matter og egg ble deretter vasket i 27 ‰ sterilt sjøvann for å fjerne kjemikaliene. Egg ble deretter overført enkeltvis til M65-agar (0,5 g gjær, 0,5 g trypton, 0,5 g pepton, 10 g agar, 800 ml sjøvann, 200 ml destillert vann) med ei steril podenål. Det var på forhånd laget hull i agaren med en steril spiss for å legge eggene ned i (Salvesen og Vadstein, 1995). 20 egg pr skål ble benyttet samt 3 paralleller av hver behandling (Figur 1C).



Figur 1: Gytematte klippes opp (A), gytematter legges i desinfeksjonsmiddel (B), 20 egg overført enkeltvis til hull i M65-agar (C). Foto: Ingrid Lein (Nofima).

Agarskålene ble fraktet kjølig fra Sunndalsøra til Trondheim med bil og inkubert i klimaskap ved 12 °C i totalt 20 dager. Bakterievekst ble registrert etter 2 og 20 dager for hurtig- og saktevoksende bakterier. Bakterievekst ble dokumentert med bilder. I tillegg ble det tatt ut noen biter av gytemattene som ble lagt i inkubatorer (25 L) for å registrere klekkesuksess og overlevelse fra de ulike behandlingene med desinfeksjon/kontroll (Figur 2).



Figur 2. Biter av gytematter i inkubator for å registrere klekkesuksess og overlevelse fra de ulike behandlingene med desinfeksjon/kontroll. I dette tilfellet for behandlingen Pyceze®. Foto: Ingrid Lein (Nofima).

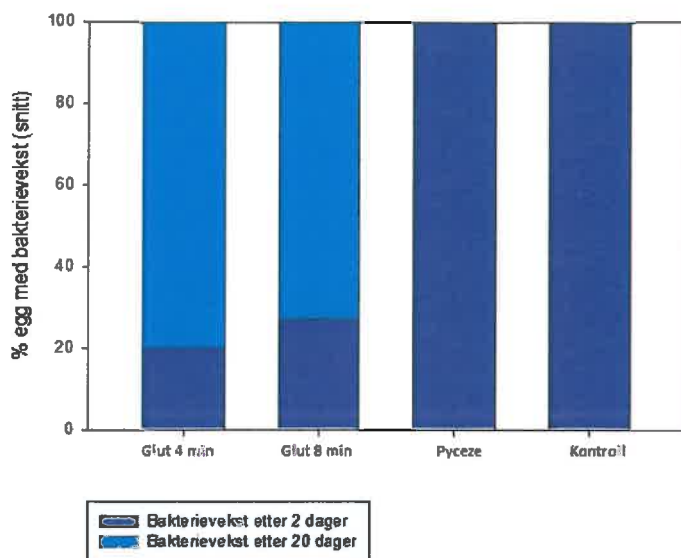
2.2 Bildebehandlingsanalyse

Det ble tatt bilder av gytemattene med egg for bildebehandlingsanalyse. Hensikten med dette var at man skulle undersøke om denne analysen kunne beregne hvor mange egg som var på gytemattene, siden å telle egg manuelt er en svært tidkrevende prosess. Programmet som ble benyttet er utviklet av Morten Alver ved SINTEF. Bilder av gytemattene med egg ble behandlet slik at programmet gjenkjenner form og farge på egg, og at hvert egg får en rød farge som deretter blir registrert.

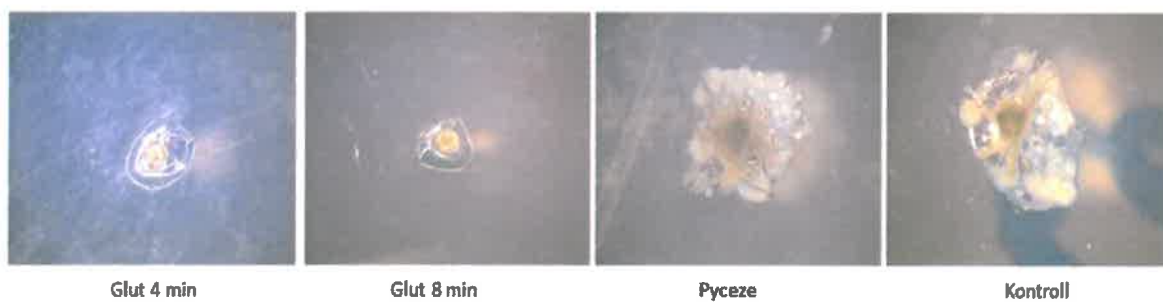
3 Resultater

3.1 Bakterievekst

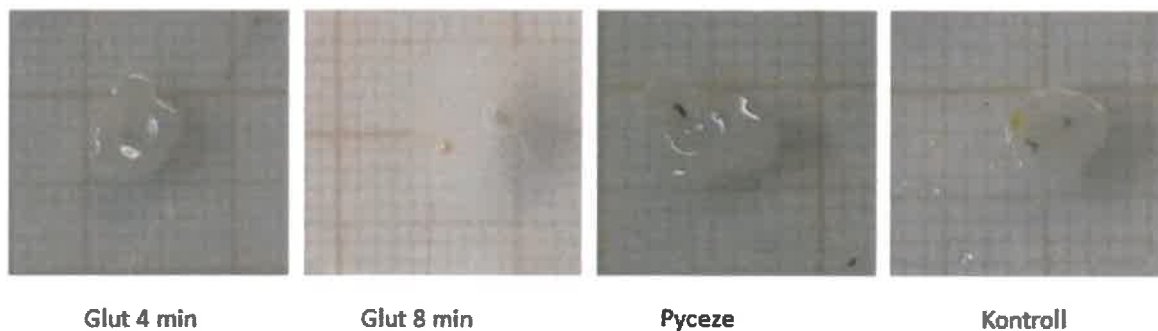
Etter to dager inkubering ble det registrert minst bakterievekst på egg som var blitt desinfisert med glutaraldehyd i 4 minutter. Denne behandlingen ga 20 % egg (± 5) med bakterievekst. Glutaraldehyd i 8 minutter gav 27 % (± 19) bakterievekst på eggene. I behandlingen med Pyceze® var alle eggene begrodd med bakterier (100 %), i likhet med kontrollen uten desinfisering (Figur 3, Figur 4). Etter 20 dager inkubering var også egg desinfisert med glutaraldehyd i 4 og 8 minutter overgrodd med bakterier (Figur 3, Figur 5).



Figur 3: Andel egg med bakterievekst fra de tre behandlingene og kontroll, etter 2 og 20 dager. 20 egg pr agarskål samt 3 paralleller pr behandling.



Figur 4: Egg i agarskåler etter 2 dager inkubering, fra de tre behandlingene og kontroll. Bildene viser lavest bakterievekst ved behandling med Glutaraldehyd i 4 eller 8 minutter sammenlignet med behandling med Pyceze, eller kontroll uten behandling. Foto: Andreas Hagemann, SINTEF



Figur 5: Egg i agarskåler etter 20 dager inkubering, fra de tre behandlingene og kontroll. Bildene viser at alle eggene er begrodd med bakterier 20 dager etter behandling. Foto: Andreas Hagemann, SINTEF.

3.2 Klekkeprosent

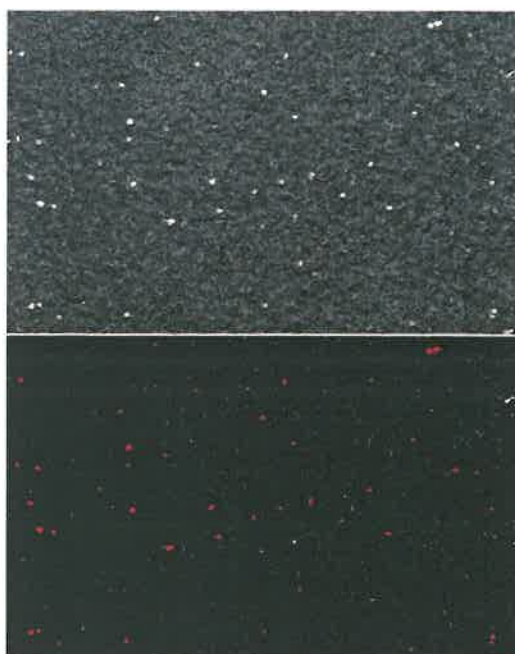
Klekkeprocent ble registrert i de ulike behandlingene i det andre forsøket som ble gjennomført i juli 2012. Klekke suksess ble beregnet ved å telle totalt antall egg på klekkematte pluss uklekte egg. Dette ble benyttet til beregning av prosent klekte egg (Tabell 2).

Tabell 2: Klekkeprocent og standardavvik fra de ulike behandlingene

Behandling	Klekkeprocent	Standardavvik
Gluteraldehyd 4 min	62,8	20,4
Gluteraldehyd 8 min	15,0	16,2
Pyceze®	23,0	19,3
Kontroll	29,6	17,0

3.3 Beregning av egg på gytematter

Resultatene viste at identifikasjonen av egg stemmer for de fleste av eggene, men at noen egg ikke blir detektert (Figur 6). Det er spesielt egg som ligger i klaser som er vanskelige å detektere, da disse blir registrert som ett egg og ikke flere.



Figur 6: Bildebehandling av gytematter for automatisk beregning av antall egg på gytematter. Over; gytematte med egg før bildebehandling, under; bilde hvor eggene har blitt identifisert med et rødt signal. Foto: Morten Alver, SINTEF.

4 Diskusjon

Glutaraldehyd 400 ppm i 4 minutter eksponeringstid gav lavest bakterievekst (20 %) og resulterte også i høyest klekkeprosent (63 %), selv om det var stor variasjon i overlevelse mellom replikatene i alle behandlingene. Glutaraldehyd 400 ppm i 8 minutter gav også lav bakterievekst (27 %), men gav lav klekkeprosent (15 %). I behandlingen med Pyceze var alle egg begrodd med bakterievekst etter to dager og gav i tillegg lav klekkeprosent (23 %). Så langt ser derfor metoden med glutaraldehyd 400 ppm i 4 minutter ut til å være best egnet desinfiseringsmidlet for leppefiskegg. Dette er i samsvar med tidligere arbeid på andre marine arter som torsk, kveite, rødspette, piggvar og steinbit (Harboe et al. 1994; Salvesen & Vadstein, 1995; Salvesen et al. 1997; Hansen & Falk-Petersen, 2001) hvor glutaraldehyd i ulike konsentrasjoner og eksponeringstid gav lav bakteriebelastning og høy klekkeprosent. Det er imidlertid behov for å se på langtidsutvikling av glutaraldehyd på utvikling av berggylltarver. Glutaraldehyd er ikke like brukervennlig som Pyceze® siden glutaraldehyd er giftig ved innånding og kreftfremkallende. Alt arbeid med glutaraldehyd må dermed behandles med varsomhet.

Metoden med å legge gytemattene i desinfeksjonsbad som ble benyttet i disse forsøkene er ikke godt egnet for storskala bruk, men fungerte godt for testing av ulike desinfeksjonsmidler, og effekten av disse på bakterievekst. Om det er ønskelig å benytte denne metoden videre for desinfeksjon av berggylltegg i produksjon, kan metoden videreutvikles for å unngå eksponering av skadelige kjemikalier.

Det er også aktuelt å teste hydrogenperoksid og ozon som desinfeksjonsmidler til berggylltrogn, men fordi slike forsøk krever mange replikater og registreringene er arbeidskrevende, var det ikke mulig å inkludere flere behandlinger i disse forsøkene.

Resultatene fra bildebehandling av gytematter med egg viste at identifikasjonen av egg på gytemattene er relativt pålitelig, men at noen egg ikke blir detektert. Grunnen til dette er at mange av eggene ligger i klaser, og eggene blir da identifisert som ett i stedet for flere. Treffsikkerheten er avhengig av kvaliteten og kontrasten i bildet og ikke alle bildene hadde like bra kvalitet. Denne metoden kan utvikles videre for å implementeres. En mulig fremtidig løsning er å beregne antall egg ut fra areal i stedet for direkte telling og/eller ta alle bilder med lik lyssetting.

5 Konklusjon

- Gluteraldehyd 400 ppm i 4 minutters eksponeringstid gir minst bakterievekst etter to dager inkubering
- 20 dager etter inkubering var alle eggene begrodd med bakterier
- Metoden som ble benyttet er godt egnet til å evaluere ulike desinfeksjonsmidler og deres effekt på bakteriebelastning
- Metoden kan videreutvikles for å unngå eksponering av skadelige kjemikalier og tas i bruk i kommersiell produksjon
- Automatisk telling av egg med bildebehandling er en lovende metode for å ha kontroll på antall egg på gytematter

6 Referanser

Hansen & Falk-Petersen (2001). Effects of egg disinfection and incubation temperature on early life stages of spotted wolffish. *Aquaculture International* 9: 333–344.

Harboe, T., Huse, I., Øie, G. (1994). Effects of egg disinfection on yolk sac and first feeding stages of halibut *Hippoglossus hippoglossus* L. larvae. *Aquaculture* 119: 157–165

Salvesen, I. & Vadstein, O. (1995). Surface disinfection of eggs from marine fish: evaluation of four chemicals. *Aquaculture International*, 3: 155-171.

Salvesen, I., Øie, G., Vadstein, O. (1997). Surface disinfection of Atlantic halibut and turbot eggs with gluteraldehyde: evaluation of concentrations and contact times. *Aquaculture International* 5, 249–258.

Vedlegg1: Rådata
Gluteraldehyd 400 ppm 4 minutter

Skål nr	Egg uten bakterier (%)	Egg med bakterier (%)
1	75	25
2	80	20
3	85	15
Snitt	80±5	20±5

Gluteraldehyd 400 ppm 8 minutter

Skål nr	Egg uten bakterier (%)	Egg med bakterier (%)
1	95	5
2	60	40
3	65	35
Snitt	73,33±18,93	26,67±18,93

Pyceze

Skål nr	Egg uten bakterier (%)	Egg med bakterier (%)
1	0	100
2	0	100
3	0	100
Snitt	0±0	100±0

Kontroll

Skål nr	Egg uten bakterier (%)	Egg med bakterier (%)
1	0	100
2	0	100
3	0	100
Snitt	0±0	100±0



Teknologi for et bedre samfunn

www.sintef.no