

Vurdering af hygiejniserings-effekten af nedsivning af viral hæmorrhagisk septikæmi virus (VHSV) under eksperimentelle forhold.

Juni 2011

Helle Frank Skall og Niels Jørgen Olesen
Veterinærinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet

&

Claus Jørgensen
DHI

Danmark og EU investerer i bæredygtigt fiskeri og akvakultur

Projektet er støttet af Fødevareministeriet og EU

Ministeriet for Fødevarer,
Landbrug og Fiskeri



Den
Europæiske
Fiskerifond

Resume

P.t. er nedsivning den i Danmark eneste godkendte metode til hygiejnisering af spildevand fra fiskeopskærings-virksomheder. For at belyse effekten af denne proces er der i dette projekt foretaget eksperimentel undersøgelse af nedsivning af viral hæmorrhagisk septikæmi virus (VHSV) i en søjle pakket med grus som top- og bundlag (i alt 22 cm) og bakkesand (76 cm). Over en periode på 18 timer blev der påført $3,9 \times 10^{10}$ TCID₅₀ (cellekultur infektive doser) VHSV til søjlen hvorefter der blev påført postevand i resten af forsøgstiden. Forsøget kørte over 7 dage, og i den tid blev der udtaget prøver fra udløbet til virologisk undersøgelse. Prøveudtagningen var mest intensiv i den periode hvor der var størst risiko for at VHSV kom ud af i bunden søjlen. Der blev ikke påvist virus ved den virologiske undersøgelse. Da den virologiske undersøgelses følsomhed var 13,9 TCID₅₀/ml kunne der påvises en reduktion af virus i udløbet på > 4 log. Nedsivning ser således ud til at være en brugbar metode til hygiejnisering af vand med VHSV i, men ændringer i temperatur, pH-forhold, jordtyper i nedsivningsområder o.s.v. kan potentielt ændre på reduktionen.

Indledning

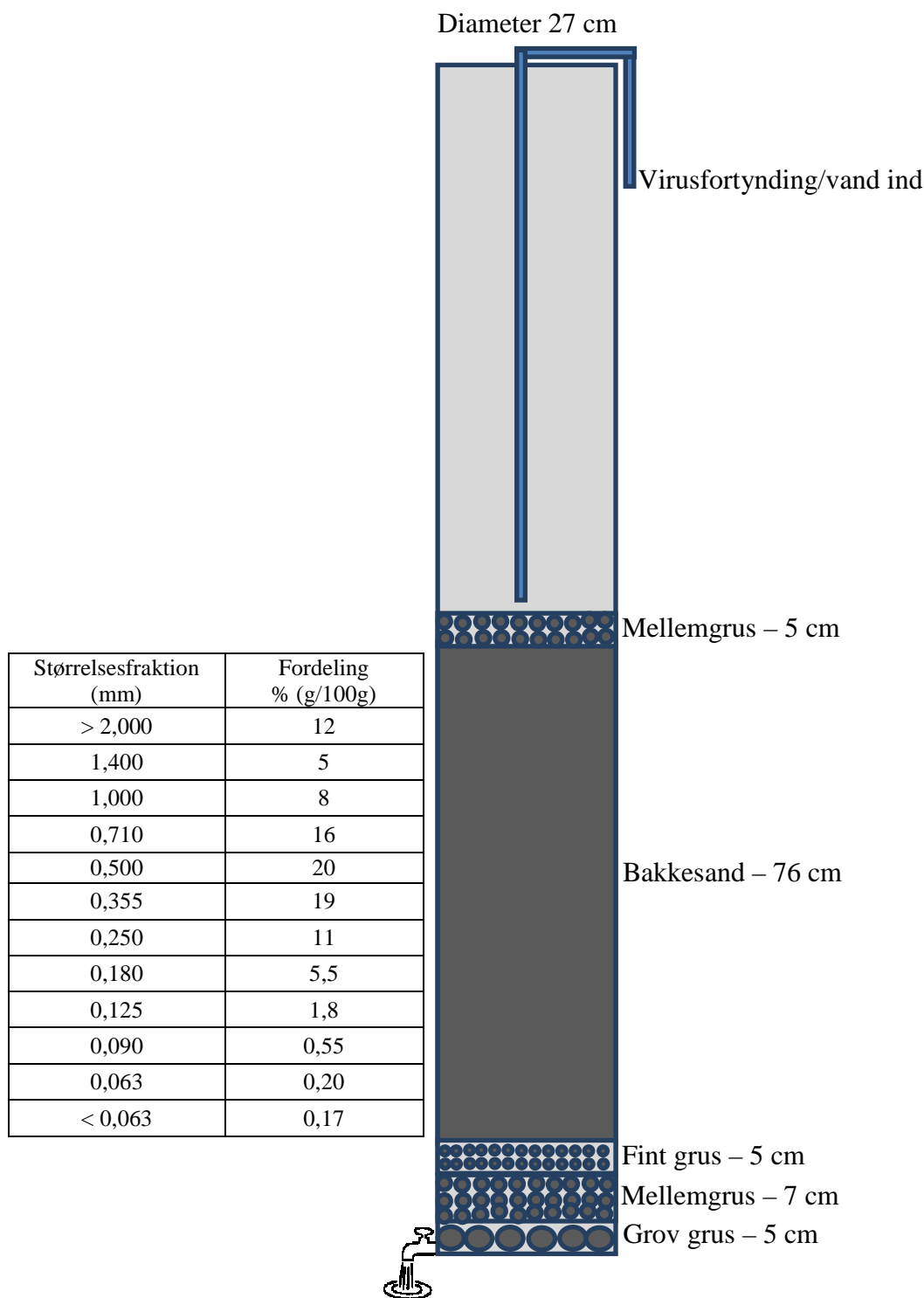
I den nuværende lovgivning "[Bekendtgørelse nr. 755 af 08/07/2008 om autorisation og drift af akvakulturbrug og –virksomheder](#)" er fiskeopskæringsvirksomheder i henhold til § 14 som udgangspunkt forpligtet til at nedsive al spildevand. Der er så vidt vides ikke publiceret undersøgelser over effekten af nedsivning på fiskepatogene vira. For at belyse effekten af denne proces er der foretaget en eksperimentel undersøgelse af nedsivning af viral hæmorrhagisk septikæmi virus (VHSV).

Prøveopsætning

Til undersøgelsen blev der benyttet en søjle pakket med grus, som bund- og toplag, og bakkesand. Grafisk fremstilling af søjlen kan ses i figur 1.

Efter pakning af søjlen blev der pumpet postevand ind i søjlen nedefra, for at sikre at så meget luft som muligt blev presset ud af søjlematerialet. Da vandsøjlen havde nået toppen af søjlematerialet, var der pumpet 13,6 l vand op i søjlen. For at søjlen kunne komme i ligevægt, blev der pumpet 104 l postevand over 2,7 døgn gennem søjlen. Der blev derefter foretaget et forforsøg med indpumpning af 20 l saltvand (20 l postevand + 20 g køkkensalt) efterfulgt af 42 l postevand for at undersøge hvordan vandet løb i søjlen, og bestemme søjlens porevolumen og dermed hvornår gennembrud af virus ville kunne forventes.

Indpumpning og udpumpning af vand blev foretaget med den samme peristaltiske pumpe for at sikre, at ca. lige meget væske blev pumpet ind som ud. Det var dog nødvendigt at spæde søjlen op, da der blev pumpet en lille smule mere væske ud end ind.



Figur 1 Opbygning af søjlen

Væsken blev pumpet op fra et reservoir og udledt i højde med overfladen af øverste lag grus i søjlen. Udpumpning af væsken skete gennem en hane i bunden af søjlen og over i et 50 ml rør, hvori der var anbragt en probe til måling af pH og en probe til måling af ledningsevne. I begge proberne var der indbygget en termometer. Ledningsevne, pH og temperatur blev logget hvert minut. Fra 50 ml røret løb vandet ud i et opsamlingskar (figur 2).

Det er blevet oplyst af Agustson A/S at pH i spildevand fra fiskeindustri ligger mellem 6,5 og 10,1 og middelværdi på 6,9-7,9. Det var ønskeligt at gennemføre forsøget ved en sammenlignelig pH, da pH kan have indflydelse på transport af virus (større transport ved højere pH). En undersøgelse viste, at pH i hanevandet på Veterinærinstituttet er 7,4. Endvidere viste det sig, at pH i en opslemning af bakkegruset i postevand var 7,4. Undersøgelsen blev derfor gennemført med postevand uden pH justering.



Figur 2 Prober til måling af temperatur, pH og ledningsevne. Udløbsvandet fra søjlen pumpes over i 50 ml røret med proberne via en slange i bunden af røret. Overløbsvandet fra rørene samles derefter i et opsamlingskar.

Selve forsøget:

Til forsøget blev 600 ml VHS virus blandet op med postevand til i alt 30 l. Virusblandingen blev pumpet ind over en periode på 18 timer. Derefter blev der pumpet postevand indtil forsøgets afslutning 7 døgn efter start.

Prøver blev udtaget af virusblandingen for hver halve time indtil alt virusvandet var suget op 18 timer. Prøver blev ligeledes udtaget af udløbsvandet med start efter 7 timer og derefter hver halve time indtil 36 timer efter start. Derefter blev der udtaget prøver 2 gange i døgnet de næste 3 døgn afsluttende med udtagning 1 gang i døgnet til afslutning.

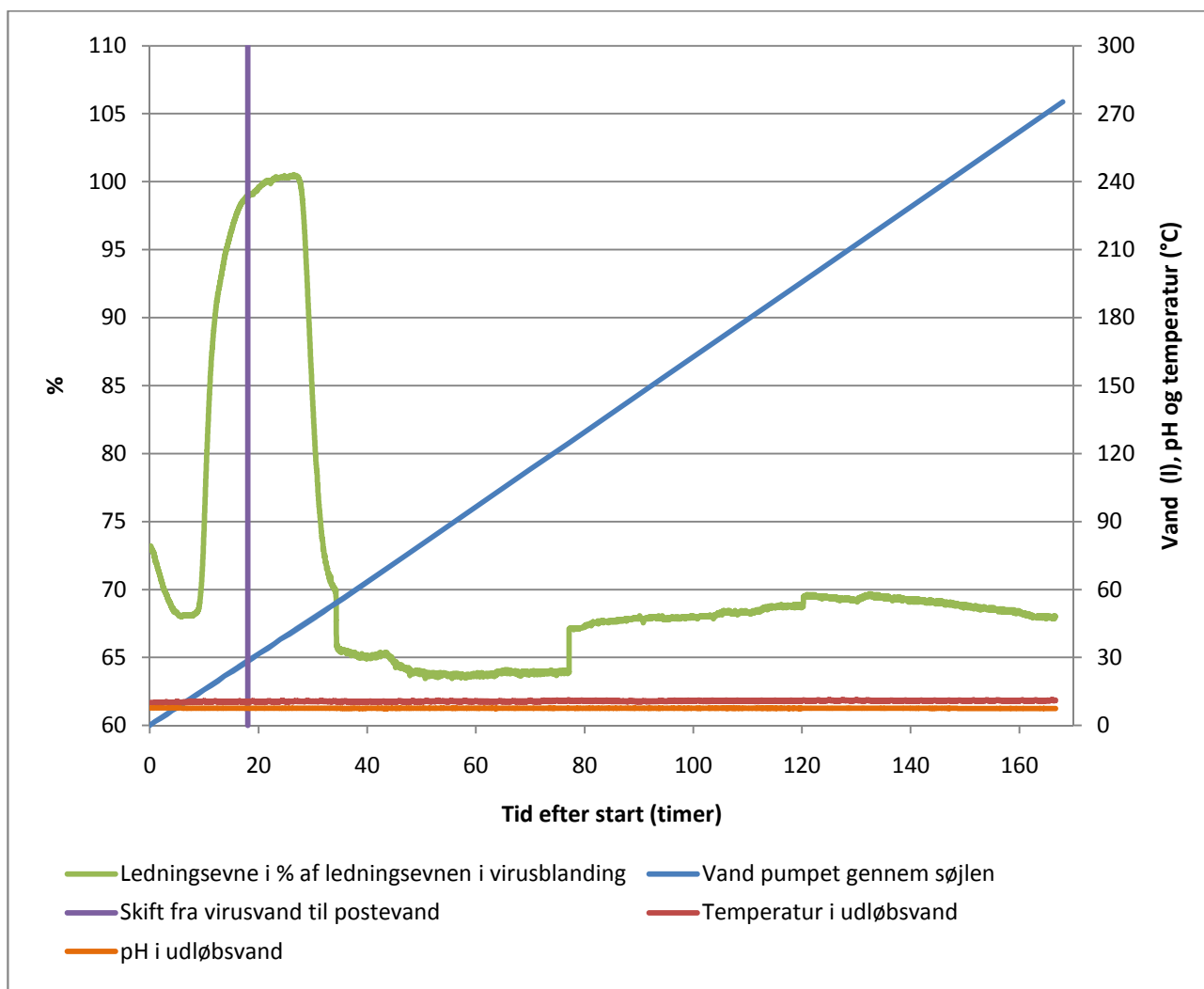
Prøveudtagning var således mest koncentreret omkring det tidspunkt, hvor virusblandingen blev pumpet ud af søjlens bund. Dette kunne følges både ved ledningsevнемålingen og ved farven på vandet i opsamlingskarret, som var farvet lyserød af virusmediet (Figur 1 og 2).

Prøver af udløbsvandet blev udtaget direkte fra udløbshanen og fra opsamlingskarret efter grundig omrøring. Ved udtagning fra opsamlingskarret undersøges hele mængden af vand

kørt gennem søjlen inden for tidsrummet, men der er en mulighed for at virus bliver inaktiveret mens vandet opsamles. Alle prøver blev udtaget i rør med 4 ml prøve tilsat 2 ml virusmedium for at beskytte virus og nedfrosset indenfor 10 min efter udtagning. Alle prøver blev undersøgt ved titrering på cellekultur med slutaflæsning efter 7 dage. Hvis der ikke var tegn på cytopatogen effekt, blev prøverne subkultiveret til friske celler og undersøgt i endnu 7 dage inden endelig aflæsning.

Resultater

Figur 3 viser forløbet af søjleforsøget.



Figur 3 Ledningsevne i % af ledningsevnen i virusblandingen, mængde vand pumpet gennem søjlen og tidspunkt for skift fra virusvand til postevand. Postevandet brugt til fortynding af virus havde en ledningsevne på 934 $\mu\text{S}/\text{cm}$ og pH 7,4. Virusvand (opblandet virus i postevand) havde en ledningsevne på 1365 $\mu\text{S}/\text{cm}$ og pH 7,5. Temperatur og pH i udløbsvandet varierede mellem henholdsvis 9,5 °C-11,5 °C og 7,3-7,7.

På baggrund af figur 3 kan det gennemsnitlige flow beregnes til 1,64 l/time svarende til 29 mm/time. Gennembruddet af saltopløsningen var stejl og nåede 100 %. Saltgennembruddet når 50% efter 11,0 timer (på kurven ved 84,5 %). Med et gennemsnitligt flow på 1,64 l i timen svarer det til et estimeret porevolumen på 18 l inklusiv volumen i gruslagene i søjlens top og bund, svarende til 32 % af det samlede volumen.

Virusblandingen blev kørt på søjlen fra tid 0 til tid 18 timer. Titrering af virusblandingen viste ikke tegn på inaktivering af virus i blandingen i løbet af de 18 timer, det tog at pumpe virus på søjlen (tabel 1).

Tabel 1 Titrering af virusblandingen og total mængde virus kørt på søjlen

Tid (timer efter start)	Titerværdi (TCID ₅₀ /ml)
0	9,5 x 10 ⁵
9	2,0 x 10 ⁶
18	2,0 x 10 ⁶
Mængde virus kørt på søjlen	3,9 x 10 ¹⁰ TCID ₅₀

Der blev undersøgt i alt 29 prøver udtaget fra opsamlingskarret og 67 prøver udtaget direkte fra udløbshanen. Ved titrering af prøverne blev der ikke påvist virus. Følsomheden ved undersøgelsen var 13,9 TCID₅₀/ml svarende til, at der har været < 13,9 TCID₅₀/ml udløbsvand eller < 2,4 x 10⁶ TCID₅₀ i den samlede mængde udløbsvand. Dette er > 4 log reduktion af virus (> 99,9938 %).

Hvis alt virus kom gennem søjlen, og intet blev inaktiveret, og virus var ligeligt fordelt, så ville der teoretisk være 1,4 x 10⁵ TCID₅₀/ml udløbsvand. Det aktuelle fund af < 13,9 TCID₅₀/ml svarer til > 4 log reduktion (> 99,9902 %).

Diskussion og konklusion

Ved eksperimentel undersøgelse af nedsivning af VHS virus blev der ikke påvist gennembrud af aktivt VHS virus i en søjle pakket med 76 cm bakkesand og 22 cm grus (top- og bundlag). I løbet af de første 18 timer af forsøget blev der pumpet i alt 3,9 x 10¹⁰ TCID₅₀ viruspartikler på søjlen, og der blev udtaget prøver af udløbsvandet over de næste 7 døgn. Prøver blev udtaget direkte fra hanen (67 prøver) samt fra opsamlingskarret (29 prøver) og undersøgt ved titrering med en følsomhed på 13,9 TCID₅₀/ml. Der blev ikke påvist aktivt virus i nogen af prøverne. Dette svarer til > 4 log reduktion.

Gennembruddet af saltopløsningen var stejl og nåede 100 %, hvilket betyder, at bakkesandet er blevet pakket ensartet, og at strømningen gennem søjlen var ensartet og tilfredsstillende.

I udløbet var pH mellem 7,3 og 7,7. Det viser, at søjlemateriale og vand var i balance. Da den anvendte pH i forsøget er optimal for VHSVs "overlevelse", er det ikke forventeligt at ændring til et mere surt eller basisk område vil medføre en mindskning af den del af reduktionen, der skyldes inaktivering, men ændring af pH kan påvirke bakkesandets struktur og transporten af virus.

Temperaturen var nogenlunde konstant omkring 10 °C. Temperaturen har ikke større indflydelse på transporten af virus, men kan have betydning for henfaldet, og bør derfor være konstant og kendt.

Der kunne således ikke påvises gennembrud af aktivt virus i søjlen. Dette kan skyldes, at alt virus er blevet inaktiveret på vej ned gennem søjlen, og/eller at virus er adsorberet til søjlematerialet. Yoshinaka et al. (2000) undersøgte adsorptionen af IHNV (infektøs hæmatopoietisk nekrose virus), et virus der er nært beslægtet til VHSV, til forskellige jordtyper (sand fra havet, japansk syreler, kaolin, bentonit, kvartssand, diatoméjord). IHNV adsorberede til kaolin, bentonit, japansk syreler og diatoméjord i steriliseret vand med pH 5-11 i koncentrationer fra 1-100 mg/l. Bortset fra i bentonit forblev leradsorberet IHNV infektivt i op til 9 uger. Det er i denne undersøgelse ikke undersøgt, om bakkesandet i søjlen indeholder infektivt VHS virus, men dette bør undersøges nærmere.

Det er heller ikke undersøgt om gennembrud af VHSV vil forekomme, hvis søjlen tilføres større mængder virus over længere tid (dage → uger).

Det kunne også være interessant at undersøge nedsivning af det mere modstandsdygtige virus IPNV.

Med de forbehold taget ovenfor er det på baggrund af det beskrevne forsøg vurderet, at nedsivning sandsynligvis er en brugbar metode til hygiejnisering af spildevand for VHSV.

Referencer

Yoshinaka T, Yoshimizu M and Ezura Y (2000) Adsorption and infectivity of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) with various solids. *Journal of Aquatic Animal Health* **12**, 64-68.