



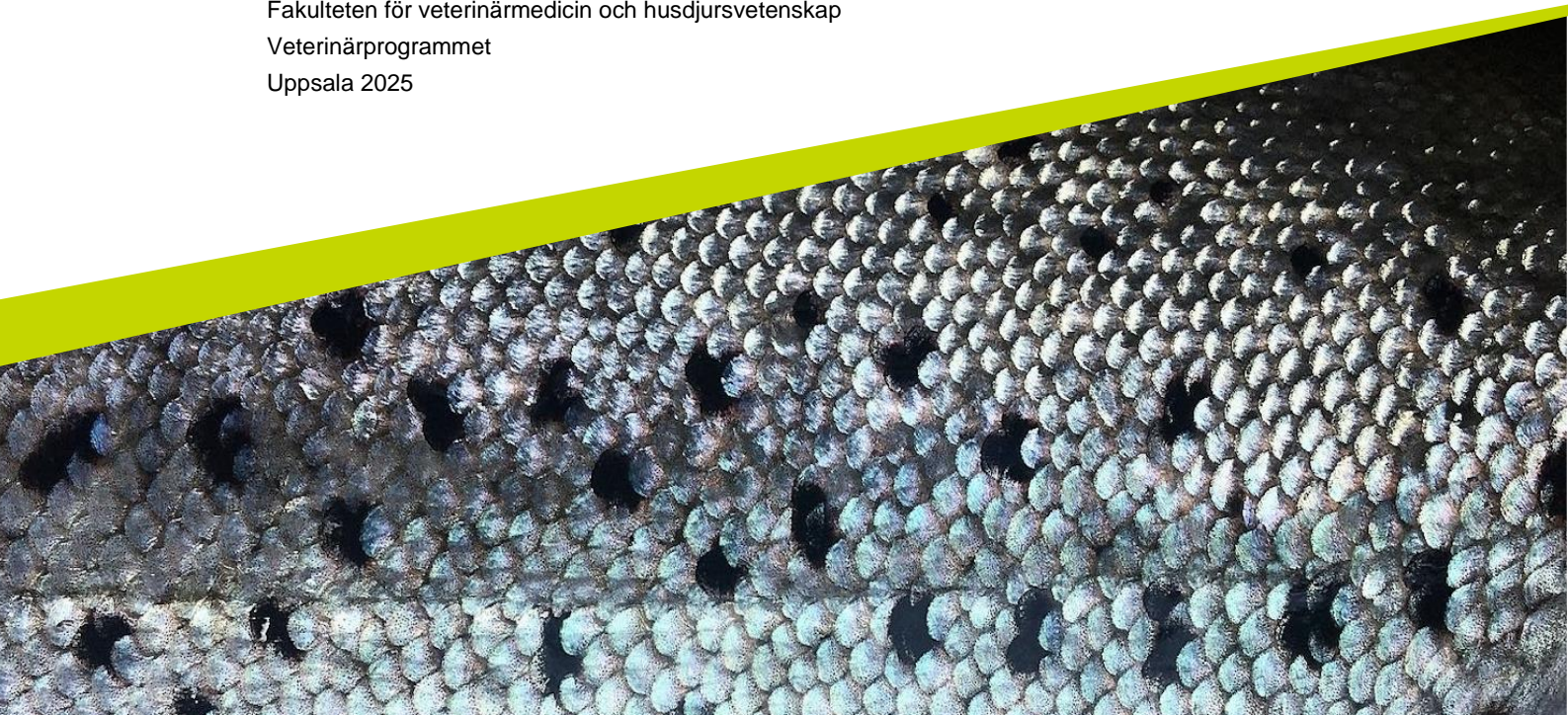
# Den bakteriella tarmfloran hos vilda fiskbestånd i Sverige

En studie av hur fiskodling kan påverka tarmfloran hos de vilda fiskbestånden i svenska sjöar

---

Nina Clausen

Självständigt arbete • 30 hp  
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Veterinärprogrammet  
Uppsala 2025





# Den bakteriella tarmfloran hos vilda fiskbestånd i Sverige - En studie av hur fiskodling kan påverka tarmfloran hos de vilda fiskbestånden i svenska sjöar

*The bacterial intestinal biota of wild fish populations in Sweden - A study of how fish farming can affect the intestinal biota of the wild fish populations in Swedish lakes*

Nina Clausen

<b>Handledare:</b>	<b>Charlotte Axén, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för vilt, fisk och miljö samt SVA, Avdelningen för djurhälsa och antibiotikafrågor</b>
<b>Bitr. handledare:</b>	Stefan Bertilsson, Sverige lantbruksuniversitet, Institutionen för vatten och miljö, Avdelningen för mikrobiell ekologi
<b>Examinator:</b>	Susanna Sternberg Lewerin, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för husdjurens biovetenskaper, Avdelningen för bakteriologi, virologi, livsmedelssäkerhet och veterinärmedicinsk folkhälsa

<b>Omfattning:</b>	30 hp
<b>Nivå och fördjupning:</b>	Avancerad nivå, A2E
<b>Kurstitel:</b>	Självständigt arbete i veterinärmedicin
<b>Kurskod:</b>	EX1003
<b>Program/utbildning:</b>	Veterinärprogrammet
<b>Kursansvarig inst.:</b>	Institutionen för kliniska vetenskaper
<b>Utgivningsort:</b>	Uppsala
<b>Utgivningsår:</b>	2025
<b>Omslagsbild:</b>	Leon Englberger
<b>Upphovsrätt:</b>	Alla bilder används med upphovspersonens tillstånd.

<b>Nyckelord:</b>	Fisk, bakteriell tarmflora, fiskodling, <i>Aeromonas</i> spp., <i>Renibacterium salmoninarum</i> , <i>Flavobacterium</i> spp., <i>Yersinia ruckeri</i>
-------------------	--

## Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Veterinärprogrammet



## Sammanfattning

I Sverige sker matfiskodling vanligen i öppna kassar placerade i naturliga vattendrag. Dessa kassodlingssystem är utformade så att vilda fiskar lätt kan komma i kontakt med spillmaterial från odlingarna. Syftet med denna studie var att undersöka hur den bakteriella tarmfloran hos de vilda fiskarna påverkas av kontakt med fiskodling. Detta gjordes genom att undersöka vilka bakteriegrupper som dominerade i tarmfloran hos två vilda fiskpopulationer, en från sjö med fiskodling och en från sjö utan sådan verksamhet. Tarmfloran undersöktes även med avseende på förekomst av specifika bakteriella opportunister och patogener så som *Renibacterium salmoninarum*, *Flavobacterium* spp., *Aeromonas* spp. och *Yersinia ruckeri*.

Den totala studiepopulationen bestod av tarmprover från 185 fiskar (av varierande art), varav 180 var vilda och fem odlade. 95 av de vilda fiskarna kom från sjön Hornavan, en sjö utan fiskodling, och 85 kom från sjön Storuman, en sjö med flera kassodlingar. Tarmfloras bakteriella sammansättning fastställdes med PCR-baserad samhällsanalys som utgick från 16S rRNA som genetisk markör för taxonomi.

Resultatet visade att det förekom skillnader i tarmfloras sammansättning mellan de båda sjöarna. Tarmfloran hos de odlade fiskarna skilde sig också från den hos de vilda populationerna. I samtliga tre populationer dominerade fylumet *Firmicutes*, men sedan varierade resterande dominerade fyla. När tarmfloran hos fiskarna studerades på individnivå kunde dock inga tydliga indelningar ses sjöarna emellan, här var det endast de odlade fiskarna som särskilde sig från resterande 180. *Renibacterium salmoninarum* förekom med låg men likartad prevalens i tarmfloran hos fisk från båda sjöarna. *Flavobacterium* spp. förekom endast i fiskar från Hornavan medan *Yersinia ruckeri* endast förekom i Storuman. Prevalensen av dessa två bakterier var låg. Den potentiella zoonotiska bakteriegruppen *Mycobacterium* spp. hade hög prevalens i tarmproverna från de båda sjöarna och ingen signifikant skillnad kunde ses mellan sjöarna. Förekomst av andra potentiella zoonoser var ringa. *Aeromonas* spp. förekom i båda sjöarna och prevalensen var högre i Storuman än i Hornavan. Även prevalensen av *A. salmonicida* var högre i Storuman och skulle således kunna vara en effekt av fiskodlingen på vilda fiskars tarmflora.

Studien kartlägger hur den bakteriella tarmfloran skiljer sig mellan två sjöar, vilket utgör en grund för ytterligare studier kring tarmflora hos vild fisk samt fiskodlingars påverkan på vilda bestånd. Ytterligare forskning kring tarmfloran är motiverad för att utforska tarmens hela mikrobiom, samt för att se om de skillnader som dokumenterades i denna studie förekommer i fler sjöar med fiskodling.

*Nyckelord:* Fisk, bakteriell tarmflora, fiskodling, *Aeromonas* spp., *Renibacterium salmoninarum*, *Flavobacterium* spp., *Yersinia ruckeri*

## Abstract

In Sweden, fish farming for the purpose of producing food usually takes place in open cages placed in natural watercourses. The way this cage culture system is designed allows wild fish to easily come into contact with waste material from the aquaculture facilities. The aim of this study was to investigate how the bacterial intestinal microbiota of wild fish is affected by contact with fish farms. This was done by investigating which bacterial groups dominated the intestinal microbiota of two wild fish populations, one from a lake where fish farming occurs and one from a lake without such activity. The intestinal microbiota was also examined regarding the presence of specific bacterial opportunists and pathogens such as *Renibacterium salmoninarum*, *Flavobacterium* spp., *Aeromonas* spp. and *Yersinia ruckeri*.

The total study population consisted of gut samples from 185 fish of varying species, of which 180 were wild and five farmed. 95 of the wild fish came from Lake Hornavan, a lake where no fish farming occurs, and 85 came from Lake Storuman, a lake with several cage farms. The bacterial composition of the intestinal microbiota was determined by PCR-based analysis by using the 16S rRNA as a genetic marker for taxonomy.

There were differences in the composition of the gut microbiota between the two lakes. Farmed fish also differed from the wild populations. In all three of the populations, the phylum *Firmicutes* dominated, while the remaining dominating phyla in the populations varied. However, when the intestinal flora of the fish was studied on an individual level no clear differences could be seen between the two wild populations from the lakes, but the farmed fish differed from the wild fish. *Renibacterium salmoninarum* occurred at a low and similar prevalence in the intestinal flora of fish from both lakes. *Flavobacterium* spp. occurred only in fish from Lake Hornavan while *Yersinia ruckeri* only occurred in Lake Storuman. Both bacteria were found in low prevalence. *Mycobacterium* spp., a potentially zoonotic bacterial group, had a high prevalence in the gut samples from both lakes and no significant difference could be seen between the two lakes. The occurrence of other potential zoonoses was low. *Aeromonas* spp. occurred in both lakes and the prevalence was higher in Lake Storuman than in Lake Hornavan. The prevalence of *A. salmonicida* was also higher in Lake Storuman and could therefore be a possible effect of fish farming on the intestinal microbiota of wild fish.

This study shows how the bacterial intestinal flora differs between two lakes, which forms the basis for further studies on the intestinal microbiota of wild fish and the impact of fish farms on wild populations. Further research on gut microbiota is suggested to explore the entire gut microbiome, as well as to see if the differences documented in this study occur in other lakes with or without fish farms.

**Keywords:** Fish, bacterial gut microbiota, fish farm, *Aeromonas* spp., *Renibacterium salmoninarum*, *Flavobacterium* spp., *Yersinia ruckeri*

# Innehållsförteckning

<b>Tabellförteckning .....</b>	<b>9</b>
<b>Figurförteckning.....</b>	<b>10</b>
<b>Förkortningar .....</b>	<b>11</b>
<b>1. Inledning .....</b>	<b>13</b>
1.1 Bakgrund.....	13
1.2 Syfte .....	14
1.3 Avgränsning .....	14
<b>2. Litteraturoversikt.....</b>	<b>15</b>
2.1 Fisk och vattenbruk.....	15
2.2 Mag-tarmkanalen hos fisk.....	16
2.2.1 Anatomi.....	16
2.2.2 Immunförsvaret.....	17
2.3 Antibiotika-administrering till fisk.....	18
2.4 Tarmfloran hos fisk .....	18
2.4.1 Levnadsstadie.....	19
2.4.2 Utfodring .....	20
2.4.3 Stress.....	20
2.4.4 Vattentemperatur .....	20
2.4.5 Antibiotika .....	21
2.5 Bakteriella sjukdomar hos fisk .....	21
2.5.1 Sjukdomssymptom, sammanfattade .....	22
2.5.2 Korrelation mellan vattentemperatur och sjukdomsförekomst .....	22
2.5.3 Opportunister: .....	23
2.5.4 Zoonoser.....	23
2.5.5 Smittspridning.....	23
<b>3. Material och metoder .....</b>	<b>25</b>
3.1 Insamling av tarm/provmaterial.....	25
3.2 DNA-extraktion.....	26
3.2.1 Preparation av tarmpaket .....	26
3.2.2 Extraktion.....	26
3.3 PCR.....	26
3.3.1 Bakteriespecifik PCR/16S rRNA PCR .....	26
3.3.2 Gelelektrofores och rening av DNA .....	27
3.3.3 PCR 2 .....	27
3.4 Sekvensering .....	28
3.4.1 Fördjupad analys av <i>Aeromonas</i> spp. ....	28
3.5 Statistik.....	29

<b>4. Resultat .....</b>	<b>30</b>
4.1 Provurval .....	30
4.2 Okulära fynd.....	31
4.3 Fylum .....	31
4.4 Skillnader i tarmfloras sammansättning .....	32
4.5 Skillnader i tarmfloran hos de odlade fiskarna .....	34
4.6 Förekomst av <i>Renibacterium</i> spp. ....	34
4.7 Förekomst av opportunistiska bakterier .....	35
4.7.1 <i>Flavobacterium</i> spp. ....	35
4.7.2 <i>Yersinia</i> spp. ....	35
4.7.3 <i>Aeromonas</i> spp.....	36
4.8 Potentiellt zoonotiska bakterier .....	37
4.8.1 Övriga zoonoser: .....	37
4.9 <i>Mycoplasma</i> spp. ....	38
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>39</b>
5.1 Generell jämförelse mellan Hornavan, Storuman och fiskodlingen .....	39
5.1.1 Fylum .....	39
5.1.2 Fynd i förhållande till tidigare litteratur .....	39
5.1.3 Jämförelse av tarmfloran avseende individ, art och nät .....	39
5.2 Förekomst av patogener och opportunister .....	40
5.2.1 <i>Renibacterium salmoninarum</i> .....	40
5.2.2 <i>Flavobacterium</i> spp. ....	41
5.2.3 <i>Yersinia ruckeri</i> och <i>Aeromonas</i> spp. ....	41
5.3 <i>Mycobacterium</i> spp. och andra zoonoser .....	41
5.4 Riskfaktorer och förbättringsförslag .....	42
5.5 Konklusion.....	43
<b>Referenser.....</b>	<b>45</b>
<b>Populärvetenskaplig sammanfattning .....</b>	<b>52</b>
<b>Tack .....</b>	<b>54</b>
<b>Bilaga 1.....</b>	<b>55</b>



# Tabellförteckning

Tabell 1. Antal insamlade fiskar, per art och sjö, samt antalet fiskar från fiskodlingen som provtogs. ....	30
---	----

# Figurförteckning

Figur 1. Lista vid vilka vattentemperaturer olika fiskpatogena bakterier kan komma att föröka sig .....	23
Figur 2. Antalet fiskar som provtogs, representerat i art per sjö .....	31
Figur 3. Relativa förekomsten av olika fylum i de två olika sjöarna Hornavan och Storuman .....	32
Figur 4. Fioldiagram som visar alfadiversitet (artrikedom) inom sjöarna med hjälp av fyra olika index .....	33
Figur 5. Den relativa förekomsten av olika bakteriegrupper på olika taxonomiska nivåer .....	33
Figur 6. Tarmfloras sammansättning hos de fem fiskar som kom från fiskodlingen.....	34
Figur 7. Antalet prover där Renibacterium spp. kunde påvisas, sorterat efter fiskart för respektive sjö.....	34
Figur 8. Antal fiskar per sjö som hade förekomst av de olika bakterierna Yersinia spp., Aeromonas spp. samt Flavobacterium spp. ....	35
Figur 9. Förekomst av A.salmonicida i tarmfloran hos fiskar Hornavan och Storuman ....	36
Figur 10. Prevalensen av Mycobacterium spp. i tarmfloran hos fiskar från Hornavan och Storuman. ....	37
Figur 11. Antal fiskar med förekomst av Mycoplasma spp. i tarmfloran .....	38

# Förkortningar

DNA	Deoxyribonucleic acid
LDA	Linear discriminant analysis
NGS	Next generation sequencing
PCR	Polymerase chain reaction



# 1. Inledning

## 1.1 Bakgrund

Tarmflora, bestående av en rad olika typer av mikroorganismer, har de senaste åren blossat upp till ett forskningsområde som resulterat i otaliga publikationer kring hur tarmens mikroorganismer interagerar med värdjurets hälsa. Studier har även utförts på fisk, för att undersöka tarmfloras sammansättning och påverkan på individen, men dessa studier är främst utförda på fisk i fångenskap, så som odlad fisk och fisk som hålls som försöksdjur. Studier kring tarmfloras sammansättning hos vild fisk är däremot få, trots att man kan anta att tarmfloras funktion är densamma som hos fiskar i fångenskap.

Tarmen är en känd infektionsport för patogener, varför det är av intresse att känna till tarmfloras sammansättning, särskilt beträffande förekomst av bakteriella opportunisterna och kommensaler. Tarmfloras sammansättning kan påverkas av diet, läkemedel, genetik, levnadsstadium och inte minst vilket typ av vatten fisken lever i (Bjørngen *et al.* 2020; Luan *et al.* 2023). Med en växande industri av odlad fisk som lever och vistas i samma vatten som vildlevande fisk finns det skäl att misstänka att dessa populationer kan komma att påverka varandra, kanske även tarmfloras sammansättning hos de respektive populationerna.

Detta examensarbete är en del av ett större projekt, *Fiskodling i norr*, som har till syfte att skapa en fördjupad kunskap kring hållbar fiskodling i norrländska sjöar. Detta kommer göras ur ett flertal olika perspektiv, såsom biologiskt, ekologiskt, ekonomiskt och socialt (Kiessling 2024a). Fiskarna som låg till grund för detta arbete har undersökts i ett flertal olika aspekter, däribland ålder och magsäcksinnehåll. Hos de salmonida arterna undersöktes även förekomst av den bakterie som orsakar fisksjukdomen renibakterios/BKD. Utöver fiskprover togs miljöprover (till exempel bottensediment och vattenprover) för att undersöka skillnader avseende andra miljöeffekter i den fiskodlingsnaiva sjön Hornavan och den fiskodlingsexponerade sjön Storuman. Projektet *Fiskodling i norr* är finansierat av Familjen Kamprads stiftelse.

## 1.2 Syfte

Arbetet syftar till att undersöka om tarmfloran hos vild fisk påverkas av förekomst av fiskodling, och om så är fallet, vilka skillnader som skulle kunna ses avseende patogener och opportunister. För att konkretisera syftet formulerades följande frågeställningar:

- Vilka bakteriella fyta utgör tarmfloran hos vild fisk? Finns det skillnader mellan de olika sjöarna?
- Förekommer skillnader i närvaro av den patogena bakterien *Renibacterium salmoninarum*?
- Finns det skillnader i förekomst av opportunistiska patogena bakterier såsom *Aeromonas* spp., *Yersinia ruckeri* och *Flavobacterium* spp. hos de olika fiskbestånden?
- Kan man se någon skillnad i förekomst av potentiella zoonotiska patogener (t.ex. *Mycobacterium* spp.) i de båda populationerna?

## 1.3 Avgränsning

I första hand togs prover från laxfiskar (salmonider) såsom sik (*Coregonus* sp.), röding (*Salvelinus alpinus*), öring (*Salmo trutta*), harr (*Thymallus thymallus*) och regnbåge (*Oncorhynchus mykiss*). Det förekom även provtagning på andra arter såsom abborre (*Perca fluviatilis*), lake (*Lota lota*), gädda (*Esox lucius*) och gärs (*Gymnocephalus cernua*). Studien fokuserar uteslutande på den bakteriella aspekten av tarmfloran.

## 2. Litteraturöversikt

### 2.1 Fisk och vattenbruk

Vattenbruk, även kallat akvakultur, är en form av naturbruk där man föder upp vattenlevande djur såsom fiskar, musslor, kräftor och odlar vissa växter. Den fisk som odlas kan komma att bli fisk för humankonsumtion, alternativt sättas ut för sport- och fritidsfiske (put and take-fiske); eller sättas ut för att stärka hotade fiskbestånd. På så vis gynnar vattenbruket samhället både ekologiskt och ekonomiskt. Jordbruksverket beskriver vattenbruk som en näring ”med stor potential för tillväxt” (Jordbruksverket 2019). Produktionen av svenska matfiskar genom vattenbruk uppskattades till 9700 ton i färskvikt under 2023 (Jordbruksverket 2024c). Den vanligaste metoden att odla denna matfisk på i Sverige är genom kassodling, där fiskarna hålls i nätkassar placerade i naturliga vattendrag (Svenskt Vattenbruk 2022b). Då vattenbruk är beroende av god vattentillförsel återfinns anläggningarna främst i stora vattendrag eller sjöar. De nätkassar som förekommer i Sverige kan vara upp emot 50 m i diameter och består av en flytring till vilken ett nät är förankrat. Kassarnas djup kan variera beroende på vattendjup vid odlingsläget. Nackdelen med utformningen av de kassar som idag används är att spillmaterial från odlingen, i form av restprodukter såsom foderrester, urin och faeces samt läkemedelsrester passerar rakt igenom kassarnas nät. Dessa restprodukter kommer även ut i kringliggande vatten, samt i övrig natur, och kan potentiellt bidra till övergödning (Agstam-Norlin *et al.* 2023). Restprodukterna utgör även en ökad risk för smittspridning genom att vilda fiskar som uppehåller sig nära kassarna kan förtära det som hamnar på botten under kassarna (Kiessling 2024b). En kanadensisk studie har dock visat att det förekommer fall där vild fisk kring fiskodlingar gynnats av förhållandena som uppstår, genom en ökning i tillväxt och näringsinnehåll hos fisken (Johnson *et al.* 2018; Agstam-Norlin *et al.* 2023).

Det finns tre olika syften för att odla fisk i Sverige: matfisk-, sättfisk- samt kompensationsodling. Bland den matfisk som odlas i Sverige är regnbåge den vanligaste arten och odlingen sker vanligen i öppna kassar (Jordbruksverket 2023). Sättfisk odlas för att förse matfiskodlingar med fisk för tillväxt, eller för att planteras ut i svenska sjöar med målet att gynna fisketurismen och den biologiska mångfalden (Svenskt vattenbruk 2022b). Även här är det regnbåge som är den dominerande arten, men det förekommer även odling av öring och röding. Kompensationsodling är som namnet antyder till för att kompensera för de förluster som uppstått till följd av att vattenkraftanläggningar blockerar vandring till lekplatser för lax och öring (Svenskt vattenbruk 2022a). Eftersom fiskarna då inte

kan reproducera sig naturligt stötts bestånden genom utsättning av smolt, det vill säga utvandringsfärdiga fiskyngel, som är avkomma till vildfångade föräldrar.

När man pratar generellt om de fiskarter som förekommer i alla svenska sjöar kan man se att abborre är den art som dominerar, följd av mört, gös och gädda (Nyqvist 2021). Artrikedomen kan dock variera kraftigt mellan de olika sjöarna i vårt avlånga land. För att kunna övervaka bestånden av vilda fiskar som finns i sjöarna har man sedan ca 40 år tillbaka utfört provfisken. Statistik från dessa återfinns sedan i det Nationella registret över sjöprovfisken (NORS) och presenteras på 10-årsbasis (SLU 2024). Statistiken för Norrbotten och Västerbotten där Hornavan respektive Storuman är belägna visar på högre andel av laxfiskar (sik, öring och röding) samt avsaknad av insjöfisken gös när de jämförs med Sverige som helhet. Utöver den aktiva övervakningen som sker genom provfiske bedrivs även passiv övervakning genom exempelvis inrapportering från allmänheten vid påträffad sjuk, skadad eller död fisk (SVA 2023c).

## 2.2 Mag-tarmkanalen hos fisk

### 2.2.1 Anatomi

Trots att skillnaden mellan däggdjur och fiskar avseende yttre anatomi och livsmiljö är påtaglig så finns det många likheter i den inre anatomin, bland annat med avseende på mag-tarmkanalens uppbyggnad och funktion. Det är en tubulär kanal som inleds med en munhåla och avslutas med anus. Däremellan har man i grova drag: svalg, foder-/matstrupe, magsäck, och tarm. Anatomin varierar kraftigt mellan olika fiskarter, då den anatomiska uppbyggnaden, liksom hos landlevande djur, är anpassad efter diet (Parenti & Weitzman 2024). Foderstrupen leder ner till magsäcken. Magsäckens utformning kan variera kraftigt, men det vanligaste är att även denna liknar en tubulär struktur, med förekomst av körtlar i slemhinneväggen. När födan lämnar magsäcken och passerar vidare är den digererad till vätska. Efter magsäcken har vissa fiskarter, däribland laxfiskar, pylorusbihang som i viss litteratur benämns som blindfickor. Pylorusbihangen kan variera till antal och storlek. Funktionen hos dessa är att fortsätta spjälka födan och/eller absorbera de näringsämnen som frigörs. Därefter tar tarmen vid och denna är hos herbivora fiskarter betydligt längre och mer vindlande än hos rovfiskar, där den sällan är längre än bukhålans totala längd.

Fisktarmen kan delas in i tre segment som på engelska benämns som "first segment of the mid intestine" (FSMI), "second segment of the mid intestine" (SSMI) och "posterior segment"(PS) (Bjørngen *et al.* 2020). Beroende på litteratur kan nomenklaturen variera. Foderstrupe och magsäck, som saknar relevans i detta arbete då dessa ej inkluderades i provtagningsmaterialet, benämns anatomiskt som "anterior segment/intestine". FSMI innefattar pylorusbihangen och sträcker sig



bak till SSMIs början. SSMI har visat sig vara den mest immunologiskt aktiva av de nämnda tarmsegmenten i mag-tarmkanalen och kan därför liknas vid tarmsegmentet ileum hos däggdjur (Wallace *et al.* 2005). Det första segmentet, FSMI, motsvarar däggdjuren doudenum och jenunum medan det sista segmentet, PS, motsvarar däggdjurens colon.

### 2.2.2 Immunförsvaret

Det finns många komponenter som bygger upp det lokala och systemiska immunförsvaret hos djur. Peyerska plack (lymfatisk vävnad i tunntarms-slemhinnan), IgA (antikropp som dominerar i sekret hos däggdjur) och M-celler (specifika celler som finns i mukosan som har till uppgift att presentera agens som förekommer i lumen för lymfatisk vävnad) är samtliga grundläggande beståndsdelar i däggdjurs immunförsvaret. Rombout *et al.* skriver i sin sammanfattande artikel "Teleost intestinal immunity" att dessa immunologiska komponenter inte kunnat påträffas hos fisk (2011). Däremot förekommer makrofager, lymfocyter och granulocyter i låg koncentration i mukosan (Powell 2000). Vidare hänvisar Rombout *et al.* även till en studie utförd på rödspätta där man jämförde olika tekniker för att vaccinera fiskarna med avdödat *Vibrio anguillarum*-vaccin (Fletcher & White 1972). Där såg de att de fiskar som fick oral administration av vaccinet uppvisade höga halter av antikroppar i tarmmukosan upp till ett år efter administrering medan parenteral administrering (subkutant eller intraperitonealt) gav låg förekomst av antikroppar i tarmen. Trots den för bakterier icke gästvänliga miljön som magsäcken utgör har man sett att det förekommer patogener (exempelvis *Y. ruckeri*, *R. salmoninarum*) som har kunnat ge upphov till infektioner efter oral administrering och dessa patogener måste då följaktligen kunna tas upp via tarmslemhinnan (Evelyn 1996). Studier som undersökte var i tarmen det huvudsakliga antigenupptaget inträffade upptäckte att det skedde i SSMI (Rombout *et al.* 1985; Rombout & van den Berg 1989). Författarna av "Teleost intestinal immunity" menar att denna sammanvägda information talar för att fiskar har ett starkt lokalt immunförsvaret snarare än ett systemiskt. Fiskars försvar mot yttrevärlden involverar även lymfoid vävnad på gälarna samt på huden. Tarmen, gälarna och huden är alla delar av vad som på fisk kan klassas som mukosa-associerad lymfvävnad (MALT) och spelar således stor roll i fiskarnas skydd mot patogener (Salinas 2015). Det är därför inte helt ovanligt att det just är i dessa anatomiska strukturer som lesioner uppkommer i samband med infektioner orsakade av bakterier så som *Aeromonas* spp., *Flavobacterium* spp., och *Yersinia ruckeri*.

## 2.3 Antibiotika-administrering till fisk

I Sverige används fyra olika typer av antibiotika till fisk: florfenikol, oxytetracyclin, trimpetoprim i kombination med sulfonamid, samt oxolinsyra (Swedres-Svarm 2024). Under 2023 beräknas strax under 18 mg antibiotika per kg slaktad fisk av någon av ovan nämnda antibiotikatyper ha förskrivits till fiskodlingar.

Denna statistik är inte uteslutande för fiskodlingar av kassmodell utan inkluderar även fiskodlingar på land. Specifik statistik avseende antibiotikaadministrering till fisk i andra EU-länder är begränsad och den statistik som förekommer är oftast för en totalmängd för alla livsmedelsproducerande djur (European Medicines Agency 2023). Dock förekommer rapporter från Storbritannien och Norge. Antibiotikaanvändning till odlad fisk i Storbritannien för 2023 var 20 mg/kg för lax och 6,9 mg/kg för regnbåge (UK-VARSS 2024) medan Norge endast använde 0,34mg/kg slaktvikt inom fiskodling för samma period (NORM-VET 2024).

Djurhållningens utformning (mängden djur som hålls) inom fiskodlingar samt behovet av sövning vid injektioner gör det omöjligt med individuell läkemedelsadministrering. Detta lämnar foderformen som det enda alternativet för antibiotikabehandling. Två nackdelar med denna administreringsform är att de sjukaste djuren kan vara för sjuka för att kunna tillgodose sig de läkemedelsberikade fodret samt att utsläpp av foder- och läkemedelsrester i omgivande vatten blir ofrånkomligt. På så vis kan de vilda fiskarna och deras mikroflora komma i kontakt med denna antibiotika. Utöver att detta skulle kunna påverka tarmfloran hos vild fisk negativt, torde det kunna bidra till den snabbt växande antibiotikaresistensen som ses världen över. Dock finns det risk för förekomst av rests substanser även i naiva vatten som ej har exponerats för fiskodlingar, då avloppsvatten har visat sig innehålla halter av antibiotika och andra antimikrobiella rests substanser (Östman 2018). Vattnet kan innehålla halter av dessa rests substanser, trots att det genomgått behandling på reningsverk.

## 2.4 Tarmfloran hos fisk

Livsmedelsverket refererar till kroppens tarmflora, mikrobiota, som ”ett ekosystem av bakterier och andra mikroorganismer” och tarmen, där tarmfloran är lokaliserad, som ett av kroppens största organ (Livsmedelsverket 2023). Utöver bakterier består tarmfloran även av virus, protozoer samt jäst- och mögelsvampar. Den tidigare forskning som finns kring tarmfloras sammansättning och funktion hos fisk har haft fokus på fiskar i försöksanläggningar eller fiskodlingar. Några av dessa studier, varav en utförd i Sverige, visade att tarmfloran i grova drag består framförallt av bakterier tillhörande fylum såsom *Tenericutes*, med viss förekomst av *Proteobacteria* och *Firmicutes* (regnbåge) (Huyben *et al.* 2018). På ordningsnivå påvisade denna studie hög förekomst av *Mycoplasmatales* (fylum *Teneri-*

*cutes*). En annan studie identifierade *Firmicutes* som dominerande fylum i tarmfloran med förekomst av *Proteobacteria* samt *Actinobacteriota* (atlantlax) (Uren Webster *et al.* 2020) medan en tredje uppvisade *Proteobacteria* som dominerande fylum följt av *Firmicutes* och *Bacteroidota* (atlantlax) (Vera-Ponce de León *et al.* 2024). På mer högupplöst nivå har ytterligare en studie undersökt förekomsten av *Mykoplasma* och rapporterade att denna bakteriegrupp var vanlig och talrik i tarmen hos tre olika laxfiskar (atlantlax, regnbåge och sik) (Rasmussen *et al.* 2021). Sammanfattningsvis kan bakterieartsammansättningen skilja sig åt även inom samma fiskart, redan på övergripande nivå så som fylum.

När man talar om tarmfloras sammansättning behöver man förstå vad som kan komma att påverka densamma. Studier har visat att det finns många olika faktorer av betydelse, såsom levnadsstadie, utfodring, antibiotika, exponering för stressorer, samt förändrad vattentemperatur (Romero & Navarrete 2006; Grammes *et al.* 2013; Huyben *et al.* 2018; Uren Webster *et al.* 2020). Det är av stor vikt att känna till för studien i detta masterarbete att tarmfloras biodiversitet inte bara kan variera beroende på vilket segment av tarmen undersöks, utan kan även variera inom samma segment. En studie utförd på odlad atlantlax som hölls i saltvatten visade att digestan i tarmen uppvisade högre biodiversitet jämfört med tarmslemhinnan (Fletcher & White 1972).

#### 2.4.1 Levnadsstadie

En studie utförd på silverlax (*Oncorhynchus kisutch*) undersökte hur tarmfloran hos fiskarten förändrades med fiskarnas olika levnadsstadier (Romero & Navarrete 2006). Man kunde se att de bakterier som dominerade tarmfloran när fiskarna fortfarande var embryon (okläckta) tillhörde klassen *Betaproteobacteria*, för att sedan byta sammansättning efter kläckning. Då kom i stället *Gammaproteobacteria* att dominera. *Betaproteobacteria* härstammar enligt studiens författare mest troligt från miljön kring dessa embryon då det är en bakterieklass man tidigare hittat i akvatiska livsmiljöer. Det var när tarmfloran dominerades av *Gammaproteobacteria* som den ansågs stabilisera och därefter inte förändras ytterligare avseende klass. Skillnaden som sågs därefter iaktogs på genusnivå. Strax innan gulesäcken absorberas dominerade *Shewanella* spp. samt *Aeromonas* spp. När fiskarna växte och blev juvenila (gränsen för detta definierades tyvärr inte av författaren) kunde man se att tarmfloran i huvudsak bestod av *Pseudomonas* spp. samt *Aeromonas* spp. Studien undersökte även fiskarnas omgivande miljö och studiens författare drog slutsatsen att tarmfloras sammansättning, avseende *Gammaproteobacteria*, härstammar från de bakterier som förekommer omgivande vatten, samt från äggens epibiota. Denna slutsats drogs då den stabiliserade tarmfloran, vattnet och epibiotan hade identiska artprofil. En annan studie, utförd på zebrafiskar, visar att de fiskar som hålls i bakteriefritt vatten uppvisade

minskat uttryck av bägarceller samt endokrina celler i tarmslemhinnan (Bates *et al.* 2006). Detta indikerar att bakterierna som förekommer i omgivningen, och som påverkar tarmflora, även är en viktig del i uppbyggnaden av fiskens skydd mot omvärlden.

#### 2.4.2 Utfodring

För att undersöka korrelationen mellan jäst (av typen *Saccharomyces cerevisiae*) som fodersubstitut till fiskmjöl, samt vattentemperaturens effekter på tarmfloran utfördes en studie i Sverige (Huyben *et al.* 2018). I denna studie drogs slutsatsen att man kunde byta ut upp till 40 % av fiskmjölet mot levande jäst utan minskning av fiskens tillväxt. Samtidigt ökade andelen jäst i tarmfloran. Att ha med jäst i fodret (då av typen *Candida utilis*) har även visat sig kunna motverka sjukdomen ”soybean meal induced enteritis” (SBMIE) (Grammes *et al.* 2013). Denna sjukdom kan uppstå i samband med att fisk utfodras med sojabaserat foder och kan liknas vid de sjukdomar som kan ses hos andra produktionsdjur. Två exempel är gasbrand på lamm (orsakat av överväxt av *Clostridium perfringens* typ D i tarmen) och nekrotiserande enterit hos fjäderfä (orsakat av *C. perfringens* typ A och-/eller C) som kan uppstå i samband med dysbios i tarmen till följd av snabba foderbyten (MSD 2023; SVA 2024b).

#### 2.4.3 Stress

I en studie kunde man se en tydlig förändring i mikrobiotan hos fisk som exponerades för stress (Uren Webster *et al.* 2020). Fiskarna (atlantlax) i försöket utsattes för stress genom att man minskade vattenmängden, och således krympte utrymmet i deras tankar avsevärt. I huvudsak kunde man se en minskning av mjölksyrebakterien *Carnobacterium* spp., samt en ökning av *Clostridium* spp., vilket är en välkänd grupp opportunist.

#### 2.4.4 Vattentemperatur

Huyben *et al.* (2018), undersökte även om man kunde se korrelation mellan vattentemperatur och tarmfloras biodiversitet. Där upptäcktes en negativ korrelation mellan höga vattentemperaturer (>18 °C) och hög biodiversitet i tarmfloran hos de regnbågar som ingick i studien. Huyben *et al.* såg även att högre vattentemperaturer kunde minska förekomsten av *Lactobacillus* i tarmen. *Lactobacillus* är en bakterietyp med dokumenterade probiotiska egenskaper (Panigrahi *et al.* 2004). Förhöjda vattentemperaturer skulle således, enligt Huyben *et al.*, kunna orsaka dysbios i tarmen. Att fiskar är växelvarma djur, vars kroppstemperatur anpassas i förhållande till omgivande vattentemperatur, samt att olika bakterier har olika temperaturoptimum, gör att förändringarna i tarmfloras sammansättning i samband med förändringar i vattentemperaturen kan förväntas.

## 2.4.5 Antibiotika

Det är välkänt att antibiotika kan ge upphov till dysbios och minskad biodiversitet i tarmfloran. I en studie utförd på zebrafisk där kontrollgruppens tarmflora i huvudsak bestod av bakterier tillhörande fylum *Fusobacteriota*, följt av *Firmicutes* och *Bacteroidetes*, kunde man se att förekomsten av *Firmicutes* och *Bacteroidota* minskade kraftigt i tarmfloran efter tetracyklinexponering (Keerthisinghe *et al.* 2020). Dock såg man i samma studie att exponering för låga halter av tetracyklin i stället bidrog till en ökad biodiversitet. Det är inte det enda exemplet på att bakterier kan gynnas av antibiotika, då en in-vitro-studie på *Escherichia coli* visade att bakteriens tillväxt gynnades av små mängder av tetracyklin (under MIC-värdet) (Migliore *et al.* 2013).

Alla dessa ovan nämnda faktorer kan vara aktuella även för vilda fiskbestånd. Foder och läkemedel kan komma ut i vattnet som biprodukter från kassodlingarna och stigande vattentemperaturer kan vi förvänta oss som resultat av klimatpåverkan. Även båttrafik, uppdämningar och kraftverk skulle kunna utgöra stressorer för de vilda bestånden och på så vis påverka tarmfloran negativt.

## 2.5 Bakteriella sjukdomar hos fisk

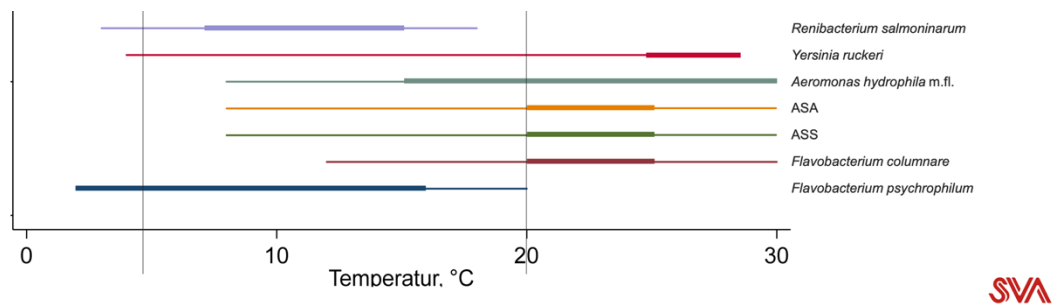
En sammanställning av de bakteriella diagnoser som rapporterats hos fisk under de gångna åren (2008 - 2023) innefattar sjukdomar så som: flavobakterios (*Flavobacterium psychrophilum*), kolumnaresjuka (*Flavobacterium columnare*), infektiös dermatit/ASA (*Aeromonas salmonicida* atypisk, tidigare *A. salmonicida* subsp. *achromogenes*), furunkulos/ASS (*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*), yersinios (*Yersinia ruckeri*) bakteriell njurinflammation/BKD (*Renibacterium salmoninarum*) m.fl. (Axén 2024). Dessa sjukdomar drabbar laxfiskarna hårdast men några av dem har även beskrivits kunna drabba andra fiskarter. ASS och ASA har exempelvis orsakat utbrott hos torskfiskar (SVA 2023b; d) och flavobakterios har kunnat drabba abborre (Austin & Austin 2016). BKD, yersinios samt ASS är de bakteriella sjukdomar som regleras av Statens jordbruksverks föreskrifter och är anmälningspliktiga (SJVFS 2021:10). BKD ska anmälas redan när infektion med bakterien misstänks då den är föremål för åtgärder (Jordbruksverket 2024a). Anläggningar med misstänkt BKD-smitta spärras i väntan på analysresultat för att förhindra flytt av infekterad fisk. Bakterien anses vara en obligat patogen och det förekommer latent bärare av sjukdomen (SVA 2022). Vid yersinios och ASS görs anmälan däremot när diagnos är fastställd och sjukdomarna är inte föremål för statligt reglerade åtgärder. År 2023 rapporterades i Sverige två fall av BKD, fyra fall av yersinios samt tre fall av furunkulos (Jordbruksverket 2024b).

### 2.5.1 Sjukdomssymptom, sammanfattade

Gemensamt för alla dessa sjukdomar är att de kan ge upphov till varierande grad av hudlesioner. Flavobakterios (orsakad av *F. psychrophilum*) kan orsaka fen-skador och sår på kroppen, eller förekomma i en akut till perakut (septisk) form när den drabbar yngel (en mortalitet hos ynglen på 50-90 % har dokumenterats) (SVA 2023a). Den andra sjukdomen som orsakas av en flavobakterie, kolumnare-sjuka (*F. columnare*), visar sig som gäl- och hudskador (SVA 2023e) och har även den dokumenterats kunna orsaka perakut död hos unga fiskar (Austin & Austin 2016). Symptombilderna vid ASS (furunkulos) och ASA (infektiös dermatit) påminner om varandra med hudlesioner samt att infektionen lätt kan sprida sig vidare till andra organ i kroppen (SVA 2023d; b). ASS klassas dock som den mer allvarliga av dessa två sjukdomar med blodfyllda bölder i musku-laturen. Yersinios kallas även för rödmunsjuka då hudlesionerna (blödningar) är lokaliserade kring munnen, men mer diffusa symptom kopplade till sjukdomen finns beskrivna (SVA 2023g). Trots att BKD i huvudsak är associerat med yttre symptom som ökat bukombång, balanssvårigheter och exoftalmi kan fisken även drabbas av hudblåsor (SVA 2022).

### 2.5.2 Korrelation mellan vattentemperatur och sjukdomsförekomst

Utöver att bakterierna drabbar olika arter och olika levnadsstadier i olika grad så påverkas även förekomsten av bakterier av den omgivande vattentemperaturen (Figur 1). Olika bakterier har uppvisat olika temperaturoptima, det vill säga vid vilka temperaturer som bakteriernas tillväxt gynnas. Således finns den en påtaglig korrelation mellan förekomst av bakteriella infektioner och vattentemperatur (Swederes-Svarm 2023; Axén 2024). Medan bakterier som *F. psychrophilum* och *R. salmoninarum* föredrar vattentemperaturer under ca 15 °C föredrar exempelvis *Y. ruckeri*, *Aeromonas salmonicida* atypisk, *Aeromonas salmonicida* susp. *Salmonicida* och *F. columnare* vattentemperaturer >20 °C. Förändringar som stigande vattentemperaturer kan även resultera i att bakteriella sjukdomar som tidigare inte förekommit i Sverige kan komma att få fäste exempelvis hemorragisk septikemi orsakad av bakterien *Edwardsiella tarda* (Du *et al.* 2017; Axén 2024).



Figur 1. Lista vid vilka vattentemperaturer olika fiskpatogena bakterier kan komma att föröka sig samt deras temperaturoptimum (fetmarkerat) (Axén 2024).

### 2.5.3 Opportunister:

Opportunist är bakterier som förekommer i normalfloran men som kan ge upphov till sjukdom när värdjuret är försvagat eller lider av nersatt immunförsvar. Av de ovan nämnda sjukdomarna kan utbrott av ASS, ASA, flavobakterios samt kolumnaresjuka uppstå i samband med att fiskarna utsätts för ogynnsamma förhållanden där stressorer och andra faktorer kan ha negativ påverkan på immunförsvaret (SVA 2023d, b, a; e). Kolumnaresjuka har visat sig kunna uppstå i samband med att nitritnivåer i vattnet ökar. Opportunistiska bakteriers förekomst går hand i hand med de faktorer som kan påverka tarmfloran, såsom förändringar av vattentemperatur, stress, antibiotikabehandling till följd av sjukdom, etc.

### 2.5.4 Zoonoser

Bland fiskar som lever i svenska vattendrag förekommer en rad bakteriella zoonoser, *Aeromonas hydrophila*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Vibrio vulnificus*, samt diverse olika mykobakterier (ex: *M. marinum*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, m.fl.) (SVA 2023h). De symptom drabbade människor uppvisar kan variera kraftigt från lättare magsjuka till sårinfektioner och sepsis, det är dock inte alltid dessa sjukdomar ger upphov till symptom hos fiskarna som bär på sjukdomen. *A. hydrophila* är en opportunist hos fisk och behöver således inte nödvändigtvis ge upphov till sjukdom och *E. rhusiopathiae* verkar inte orsaka sjukdom hos fisk (Gauthier 2015). När *Mycobacterium* spp. drabbar fisk ger dessa bakterier upphov till en långsamt progredierande sjukdom med granulombildning i inre organ och i huden (SVA 2023h). *V. vulnificus* är ej av relevans för denna studie då denna bakterie endast förekommer i bräckt och saltvatten (SVA 2023f).

### 2.5.5 Smittspridning

Bland de i Sverige anmälningspliktiga sjukdomar som förekommer hos fisk är hälsoläget gott, med ingen eller låg förekomst (SVA 2024a). Det är av stor vikt att det så förblir för både de vilda bestånden, som har en komplex roll i våra

ekosystem, samt för de odlade fiskarna och näringen. Fisk är dock ett djurslag där smittskydd är och kan upplevas som komplicerat. SVA har identifierat en rad olika orsaker till detta. Vilda och odlade fiskar lever väldigt nära varandra när odling sker i öppna system (kassar eller landbaserat med genomflöde). Vissa av de vilda fiskarna kan röra sig över stora geografiska ytor, vilket gör att smitta lätt kan spridas. Sjukdomarna kan även smitta vertikalt, exempelvis bakteriell njurinflammation (BKD), vilket innebär att smittan sprids från föräldragenerationen till avkomman och gör att avkomman är smittad redan som ägg. Vertikal smittspridning kan resultera i att sjukdomen kan få en snabb uppförökning då de är smittbärare redan som yngel. Symptom är inte alltid lätta att upptäcka vilket kan resultera i att sjukdomar upptäcks i ett för sent skede. För exempelvis BKD kan detta bero på asymptomatiska bärare samt att sjukdomen har ett långsamt förlopp, medan andra sjukdomar kan vara svåra att upptäcka i tid till följd av perakut former, vilket gör att djuret avlider innan sjukdomstecken uppvisas. Att det rör sig om vattenlevande djur förenklar inte sjukdomsövervakningen. Sjukdomar hos odlad fisk kan ge upphov till välfärdsproblem hos fiskarna samt stora ekonomiska förluster för producenten (Svenskt Vattenbruk 2022a). För att undvika smittspridning finns obligatoriska kontrollprogram (sedan 20 år tillbaka) där provtagning för BKD förekommer (Jordbruksverket 2024a). Denna provtagning innefattar inte de vilda bestånden, som undersöks i detta arbete.



## 3. Material och metoder

### 3.1 Insamling av tarm/provmaterial

Inom ramen för projektet *Fiskodling i norr* provtogs två sjöar under sensommaren/hösten 2024. Sjön Hornavan, belägen i Arjeplogs kommun, användes som referenssjö för arbetet. Sjön Storuman, i Storumans kommun, är en sjö som huserar flera fiskodlingar av kassodlingsmodell. Fiskar från båda sjöarna provtogs. Provmaterial för detta masterarbete samlades in under ovanstående projekts provtagningar under tre dagar i respektive sjö (Hornavan 13–15 augusti, Storuman 27–29 augusti). Fiskenät av typerna flytnät och bottennät användes vid materialinsamlingen. Näten hade varierande masktäthet, för att möjliggöra fångst av en variation av fiskar i olika storlekar och arter.

I sjön Storuman finns för närvarande tre fiskodlingar av kassmodell. Nätfisket som lade grund för arbetet skedde i huvudsak kring fiskodlingen belägen vid Kaskeluokt. Denna fiskodling grundades 2021 och har för närvarande en årlig produktion på 800 ton regnbåge.

Av de fiskar som fångades in provtogs många men inte samtliga. Salmonida arter prioriterades, men även andra fiskarter samlades in för att få en inkluderande population. Innan tarmarna avlägsnades från fiskarna mättes djuren, avseende längd och vikt, och könbestämde. Fiskarnas tarmar skars av distalt om magsäck/proximalt om pylorusbihangen och vid anus med hjälp av skalpellblad och avlägsnades med pincett. Detta gjordes med undantag för de första för 24 tarmproverna (märkta nr H1-18, H90-92 samt H98 och H99) från Hornavan då proverna istället togs distalt om pylorus fram till anus. Initialt fanns en viss osäkerhet om det skulle komma att påverka magsäcksproverna (som provtogs inom ramen för det större projektet *Fiskodling i norr*) om pylorusbihangen involverades i tarmundersökningen, därav var dessa första prover mindre omfattande. Skalpell och pincett rengjordes mellan varje fisk. Provmaterialet placerades i stomacherpåsar eller 1-liters fryspåsar, beroende på dess storlek. Påsarna placerades i -18 °C till dess att analys genomfördes.

Majoriteten av laxfiskarna som utgjorde grund för detta masterarbete provtogs även för BKD inom ramen för det större projektet. Samtliga fiskar som omfattas av detta arbete provtogs även för att fastställa magsäcksinnehåll samt ålder.

## 3.2 DNA-extraktion

### 3.2.1 Preparation av tarmpaket

Tarmarna skrapades med hjälp av pincett för att erhålla så mycket material som möjligt, både tarminnehåll och mukosa, med målet att få ett så inkluderande provsvar som möjligt då tarmfloran (som nämns i litteraturoversikten) kan variera mellan digesta och mukosa. Tarminnehållet placerades i eppendorfrör av storleken 2 ml. Sax och pincett desinficerades med 70 % etanol och därefter 10 % klorin mellan behandling av varje tarmpaket. Tarmpaketet från en abborre fångad i Hornavan fick kasseras vid ankomst till laboratoriet då denna var i för dåligt skick för att tarminnehåll skulle kunna prepareras fram.

Materialet för DNA-extraktion vägdes och om denna vikt överskred den önskade målvikten för DNA-extraktionen (250 µg) användes ett delprov av det totala tarminnehållet.

### 3.2.2 Extraktion

För DNA-extraktionen användes Qiagen's DNeasy's Powersoil Pro Kit. Extraktionen utfördes enligt tillverkarens protokoll, med undantag för följande modifieringar. I steg 2. användes en homogenisator av tillverkaren Fisherbrand™ Bead Mill 24 (på inställningen 2,6 m/s i 5 minuter). I protokollets sista steg gjordes eluering med mängden 60 µL av Tris-HCl för att erhålla extraerat DNA. Efter extraktionens slutliga steg mättes den totala mängden DNA individuellt för samtliga 185 prover. Totalt 2 µL DNA tillsattes till 198 µL av Invitrogen™ Qubit™ dsDNA High Sensitivity (HS) Assay Kit för att slutligen mätas med hjälp av Invitrogen™ Qubit™ 4 Fluorometer.

## 3.3 PCR

### 3.3.1 Bakteriespecifik PCR/16S rRNA PCR

Arbetet syftade till att undersöka den bakteriella art- och samhällssammansättningen i de erhållna proverna. Därför användes 16S rRNA PCR enligt ett protokoll utformat av Sinclair *et al.* (2015) och val av primers enligt Herlemann *et al.* (2011). För varje prov som analyserades blandades 12.5 µL Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix med HF Buffer tillsammans med 8,5 µL destillerat vatten och 1 µL av vardera av primerparet: 341F (CCTACGGGNGGCWGCAG) och 805NR (GACTACNVGGGTATCTAATCC).

Denna mängd multiplicerades med 185 för att erhålla en mastermix för samtliga prover, samt 2 extra för positiv och negativ kontroll. En volym av 23 µL placerades i vardera PCR-brunn varefter 2 µL av extraerade DNAs prover

tillsattes. Proverna placerades i PCR-maskinen (Applied Biosystems™ SimpliAmp™ Thermal Cycler) och följande program kördes:

98°C	-3 min	
98°C	-10 s	
48°C	-30 s	Denna cykel upprepades 25 gånger
72°C	-30 s	
72°C	-2 min	
4°C	-∞	

För varje prov gjordes duplikat.

### 3.3.2 Gelelektrofores och rening av DNA

För att visualisera första stegets PCR-produkter användes gelelektrofores. Agaros-gelen som användes var 1 %-ig och till denna tillsattes 5 µL gelröd/100 ml gel. 3 µL provmaterial togs från vardera individuellt PCR-prov och blandades med 1 µL Tritrack loading dye. DNA fragmenten storleksseparerades genom att applicera en spänning på 100 V i 30 min. Storleksmarkören som användes som referens för proverna innehöll fragment i storlekar upp till 1kb.

Efter att samtliga prover hade visualiserats med gelelektrofores renades produkten från det första PCR-steget med AMPure Purification Method. Cytivas Sera-Mag Select DNA Size Selection & PCR Clean-up Kit i proportionen 0,8 µL/µL PCR-produkt som adderades till vardera individuellt prov. Därefter följdes tillverkarens protokoll för rening av DNA, med modifierat steg 12, i vilket den renade PCR-produkten erhöles genom att tillsätta 20 µL destillerat vatten.

### 3.3.3 PCR 2

Inför Illumina-sekvensering taggades varje prov med en andra PCR där prov-specifika molekylära streckkoder introducerades. Dessa kan liknas vid etiketter som möjliggör identifiering av sekvensernas provtillhörighet efter poolning av produkter. Genom att använda en kombination av två olika primers med de tillhörande individuella molekylära streckkoderna kunde proverna poolas och genomgå följande program:

98 °C	-30 s	
98°C	-10 s	
62°C	-30 s	Denna cykel upprepades 10 gånger
72°C	-5 s	
72°C	-2 min	
4°C	-∞	

### 3.4 Sekvensering

Efter poolningen av samtliga prover utfördes DNA sekvensering. Detta gjordes med MiSeq, Illumina och reagens-kit av typen v3 och 2x300 cykler. Data som erhöles analyserades i DADA2 (version 1.16), en öppen programvara för bioinformatik i statistikprogrammet R (version 4.0.2). De erhållna sekvenserna jämfördes mot rRNA-databasen SILVA (Quast *et al.* 2012).

#### 3.4.1 Fördjupad analys av *Aeromonas* spp.

I enlighet med syftet ansågs det av särskild vikt att identifiera bakterier av genus *Aeromonas* till art- och underart-nivå. Artnivå erhöles genom att jämföra rådatan från Miseq mot National center for Biotechnology Information (NCBI) databas (BioSample: SAMN44844803, BioProjekt: PRJNA1188613). För att identifiera underarter av *Aeromonas salmonicida* i de 12 prover som synbarligen bar på denna art gjordes en riktad PCR för genen cpn60 med hjälp av primerparet: cpn60F (GAAATYGAACTGGAAGACAA) och cpn60r (GTYGCTTTTTCCAGCTCCA).

Från varje individuellt prov togs 4 µL extraherat DNA och tillsattes till en blandning bestående av 2 µL av vardera primer, 25 µL av ovan nämnda Mastermix och 17 µL destillerat vatten. PCR-produkten erhöles genom följande program.

95°C	-5 min	
95°C	-30 s	
60°C	-30 s	Denna cykel upprepades 35 ggr
72°C	-1 min	
72°C	-8 min	
4°C	-∞	

Därefter renades PCR-produkten med Invitrogen PureLink Quick PCR Purification kit i enlighet tillverkarens protokoll och därefter mättes DNA mängden med Qubit, beskrivet i avsnitt 3.2.2. Slutligen skickades PCR-produkten till ett externt laboratorium för Sangersekvensering.

### 3.5 Statistik

För att visualisera det erhållna resultatet användes statistikprogrammet R, paketet MicrobiotaProcess version 1.16.0, samt kalkylprogrammet Microsoft Excel. För att beräkna prevalensen av olika sjukdomar användes formeln

$$\text{Prevalens} = a/(a+b)$$

Där a är antalet individer hos vilka bakterien kunde påvisas i tarmfloran och b är de provtagna fiskar i populationen där bakterien inte kunde påvisas. Detta gjordes även på artnivå.

Tarmfloras sammansättning jämfördes både inom sjöarna, så kallad alfadiversitet, och mellan sjöarna, betadiversitet. När man beräknar alfadiversiteten användes fyra olika index, Chao1, Observed, Shannon och Simpson. Chao1 jämför artrikedomen genom att jämföra de minst vanligt förekommande taxa, Observed jämför artrikedomen baserat på alla de individuella taxa som förekommer i populationen. Shannon mäter både artrikedomen men också hur jämnt fördelade arterna är inom populationen. Simpson jämför hur sannolikt det är att två slumpvist valda individer uppvisar samma artsammansättning. För att beräkna betadiversiteten användes den relativa förekomsten och för att avgränsa signifikansen användes tröskelvärdet 4 för Log10 (LDA) för att exkludera bakterier ur tabellen som hade lägre skillnader i relativ förekomst. Alfa – och betadiversiteten beräknades i R.

## 4. Resultat

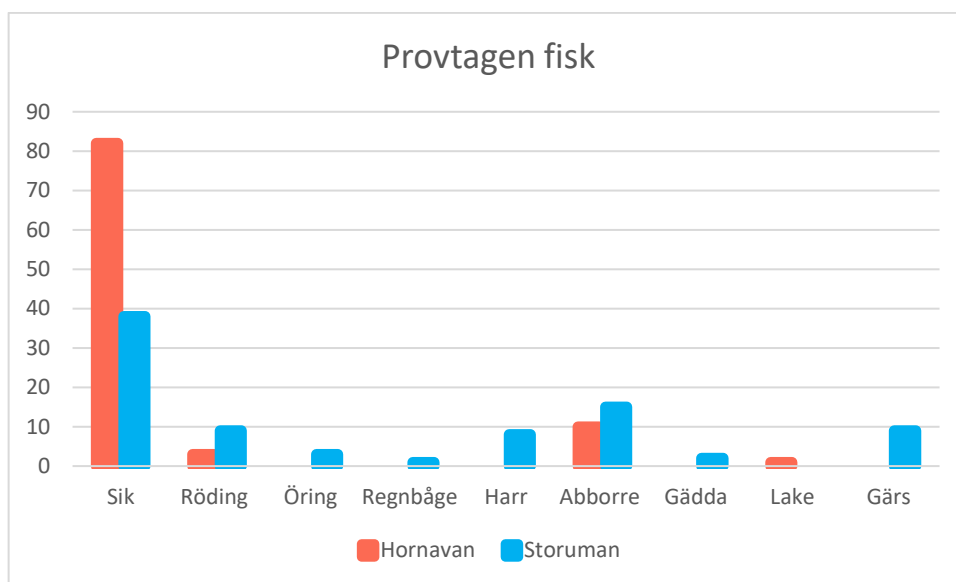
### 4.1 Provurval

Tarmar från totalt 186 fiskar samlades in: 96 av dessa kom från vilda fiskar från sjön Hornavan, 85 från vilda fiskar från sjön Storuman, samt fem från regnbågar från en av fiskodlingarna i Storuman (Tabell 1). Laxfiskar prioriterades vid provinsamlingen, men för att erhålla större mängd prover (upp emot 100 fiskar/sjö) valdes fiskar från andra arter ut slumpmässigt (Figur 2). Samtliga prover märktes med identifikationsnummer, H1-H99 för Hornavan (H45, H46, H75 samt H79 förekom inte) och S1-S85 för Storuman. Under provtagnings-perioden uppmättes vattentemperaturer på olika djup (ca 0,5 m till 65 m djup för Hornavan och ca 0,5 till 47 m djup för Storuman). Temperaturerna varierade mellan 4,4 och 13,4 °C för Hornavan och 5,8 och 14,2 °C för Storuman. Dessa värden mättes ej av författaren utan dokumenterades i samband med sedimentprovtagning.

Tabell 1. Antal insamlade fiskar, per art och sjö, samt antalet fiskar från fiskodlingen som provtogs (n=186).

Fiskart	Hornavan	Storuman	Fiskodling
Sik	82	38	-
Röding	3	9	-
Öring	-	3	-
Regnbåge	-	1	5
Harr	-	8	-
Abborre	10	15	-
Gädda	-	2	-
Lake	1	-	-
Gärs	-	9	-
Total salmonider	85	59	5
<b>Total</b>	<b>96</b>	<b>85</b>	<b>5</b>

Inom de insamlade provgrupperna förekom stora skillnader mellan individerna. Grupperna bestod både av honor, hanar, juvenila, könsmogna samt fiskar i lek-mogen storlek men med outvecklade gonader. Från Hornavan var den minsta fisken en röding som vägde 4 g medan den största fisken var en abborre som vägde 879 g. Från Storuman var den minsta fisken en öring som vägde < 1 g och den största en gädda som vägde 4730 g.



Figur 2. Antalet fiskar som provtogs, representerat i art per sjö (n=181). Figuren inkluderar ej de fem regnbågarna från fiskodlingen.

## 4.2 Okulära fynd

I samband med att tarmen avlägsnades upptäcktes en generell förekomst av parasitcystor visceralt på magsäck/kraniala delarna av tarmen. En abborre (S57) från Storuman hade tre stycken röda maskar, ca 0,7 cm stora, i tarminnehållet. Vidare diagnostik av dessa förändringar utfördes inte. Utöver fynden bedömdes resterande organ i bukhålan vara utan anmärkningar hos de vilda fiskarna.

## 4.3 Fylum

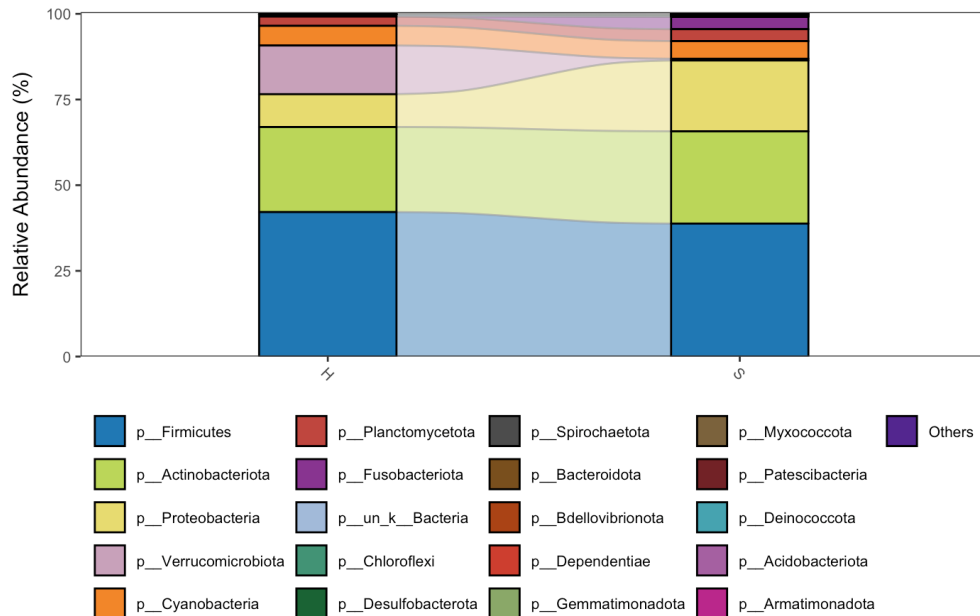
Genom att undersöka tarmfloras sammansättning på fylum-nivå kunde skillnader ses mellan de båda sjöarna (Figur 3). I Hornavan kunde man se att *Firmicutes* dominerande med 44 % av tarmfloras fylum, följt av *Actinobacteriota* 22 %, *Verrucomicrobiota* 18 %, och *Proteobacteria* 7 % (Figur 3).

Även i Storuman var *Firmicutes* det vanligast förekommande fylumet, 40 %, följt av *Proteobacteria* 25 %, *Actinobacteriota* 22 %, och *Cyanobacteria* 5 % (Figur 3). *Verrucomicrobiota*, som var tredje vanligaste förekommande fylumet i den naiva sjön utgjorde <1 % av den generella tarmfloran i fiskodlingsexponerade Storuman.

Även i tarmfloran från de fem fiskarna som kom från fiskodlingen dominerade *Firmicutes* och utgjorde då hela 70 % av den totala tarmfloran, följt av *Fusobacteriota* 22 % och därefter *Proteobacteria* 7 %. *Fusobacteriota* var mer vanligt

förekommande i tarmfloran från fiskodlingen samt Storuman än i Hornavan, där detta fylum endast utgjorde <1 %.

Flertalet mindre abundanta fyla som påvisade hos de vilda fiskarna, exempelvis *Cyanobacteria* och *Planctomycetota*, kunde inte påträffas, eller i så fall i sparsam mängd, hos de odlade fiskarna. Även det för Hornavan mycket vanliga fylumet *Verrucomicrobiota* kunde endast påvisas i låg halt hos fiskarna från fiskodlingen.

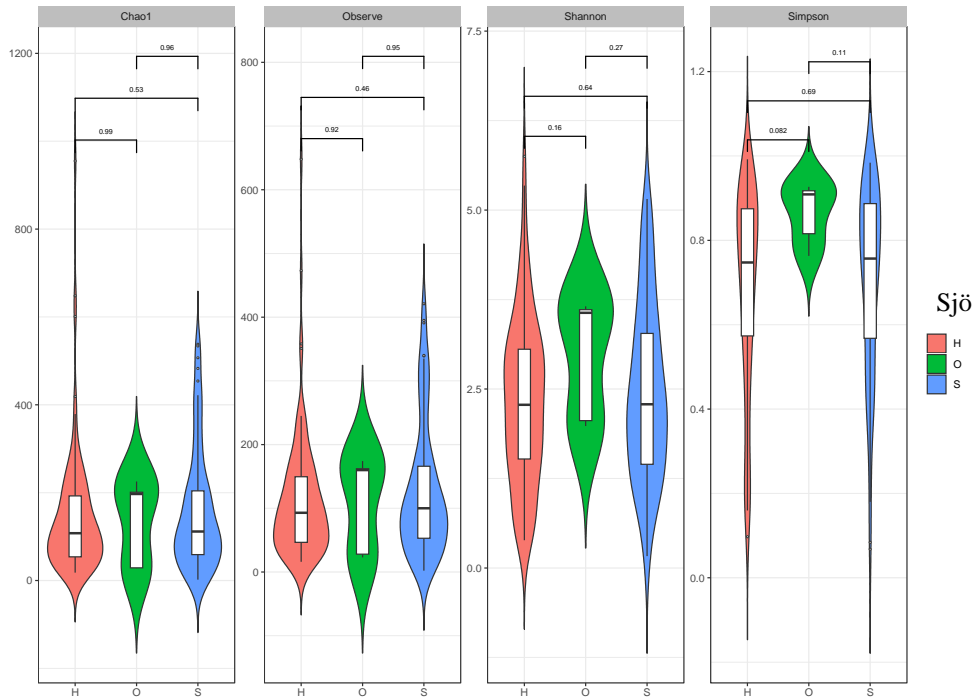


Figur 3. Relativa förekomsten av olika fylum (p) i de två olika sjöarna Hornavan (H) och Storuman (S).

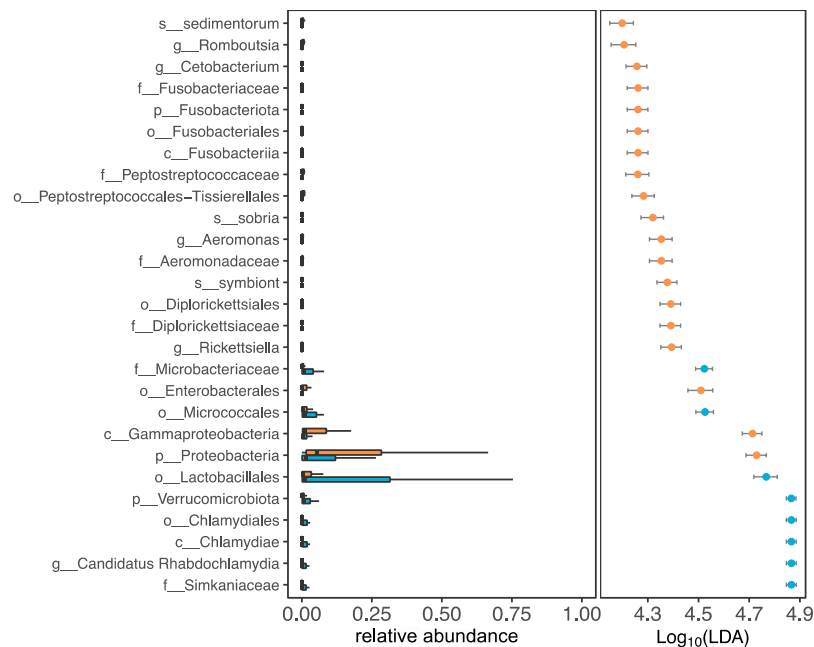
#### 4.4 Skillnader i tarmfloras sammansättning

Ingen tydlig skillnad kunde ses när man jämförde tarmfloras artrikedom (alfa-diversitet) inom sjöarna (Figur 4, samt Bilaga 1). Däremot kunde signifikanta skillnader ses om man jämförde bakteriesamhällets artsammansättning mellan sjöarna (betadiversitet). I Figur 5 kan man se att förekomsten av *Verrucomicrobiota* (till vilket understående taxonomiska nivåer hör: *Chlamydiales*, *Chlamydiae*, *Candidatus rhabdochlamydia* och *Simkaniceae*) är signifikant högre för Hornavan i jämförelse med Storuman. De bakterier vars relativa förekomst var signifikant högre i Storuman var exempelvis *Proteobacteria*, vilket även kan ses i Figur 2. Figur 5 åskådliggör även skillnaden i relativ förekomst av *Aeromonas* spp. mellan sjöarna, som är signifikant högre för Storuman.





Figur 4. Fioldiagramet visar alfadiversitet (artrikedom) inom sjöarna med hjälp av fyra olika index (Chao1, Observe, Shannon och Simpson) där H =Hornavan, O= fiskodling och S=Storuman.

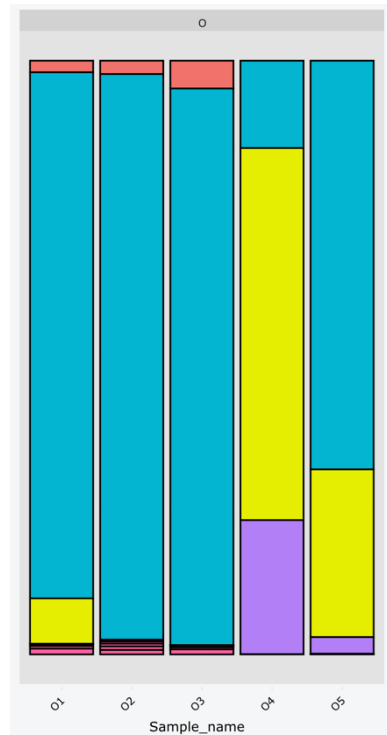


Figur 5. Till vänster: Den relativa förekomsten av olika bakteriegrupper på olika taxonomiska nivåer: fylum (p), klass (c), ordning (o), familj (f), genus (g) och art (s). Till höger: signifikansen i skillnaden mellan sjöarna, med LDA cut-off på 4.

## 4.5 Skillnader i tarmfloran hos de odlade fiskarna

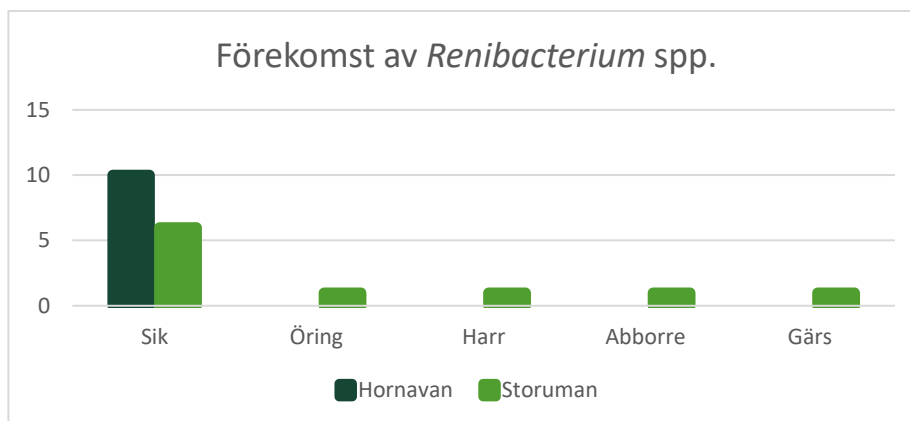
Två olika huvudprofiler sågs i tarmfloran hos de odlade fiskarna, där tre (O1-O3) hade en profil som skilde sig mycket från de andra två (O4-O5) (Figur 6). I den första profilen dominerade *Firmicutes* med viss förekomst av *Actinobacteriota* samt andra samlade fylum som förekom i sparsam mängd. I den andra huvudprofilen var *Fusobacteriota* och *Proteobacteria* betydligt mer vanligt förekommande.

Figur 6. Tarmfloras sammansättning hos de fem fiskar (O1-O5) som kom från fiskodlingen. Fylum representerade i olika färger. Rött=Actinobacteriota, blått=Firmicutes, gult=Fusobacteriota, lila=Proteobacteria, rosa/svart=sammanslagning av många olika fylum.



## 4.6 Förekomst av *Renibacterium* spp.

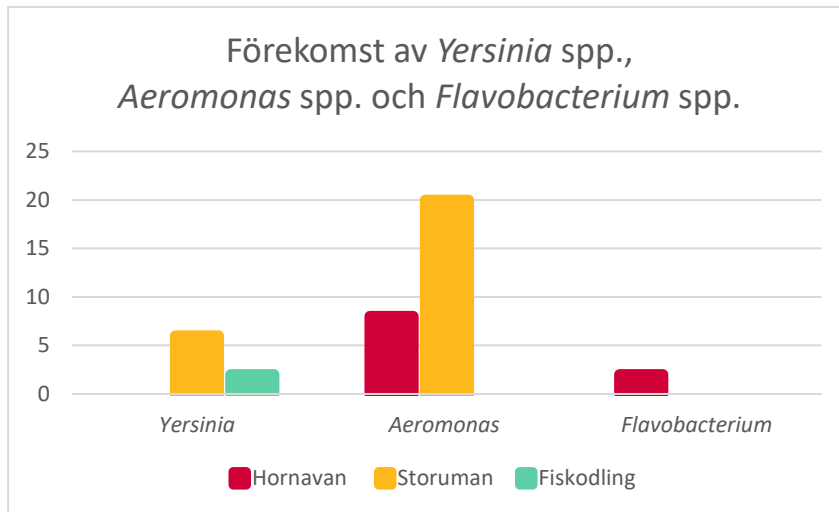
*Renibacterium* spp. förekom i tarmfloran från fiskar i båda sjöarna (Figur 7). Då *R. salmoninarum* är enda arten som förekommer inom genuset krävdes ingen ytterligare diagnostik för att fastställa att det var denna bakterie som påvisats. I Hornavan kunde *R. salmoninarum* påvisas i tarmen hos tio fiskar, motsvarande 11 % av alla provtagna fiskar (12 % av laxfiskarna som provtogs) (Figur 7). Även i Storuman kunde bakterien påvisas i tarmen hos tio fiskar motsvarande 12 % av population (14 % av laxfiskarna). Bakterien kunde inte påvisas i de fem tarmproverna från fiskodlingen.



Figur 7. Antalet prover där *Renibacterium* spp. kunde påvisas, sorterat efter fiskart för respektive sjö (n=20).

## 4.7 Förekomst av opportunistiska bakterier

Förekomst av opportunistiska bakterier i tarmfloran hos de provtagna fiskarna visas i Figur 8.



Figur 8. Antal fiskar per sjö som hade förekomst av de olika bakterierna *Yersinia* spp., *Aeromonas* spp. samt *Flavobacterium* spp. ( $n=37$ ).

### 4.7.1 *Flavobacterium* spp.

*Flavobacterium* spp. förekom i ytterst liten mängd bland samtliga tarmprover. Bakterien kunde enbart påvisas hos två sikar från Hornavan (2,1 % av tarmproverna från Hornavan och 2,4 % salmonid-tarmproverna från sjön) (Figur 8). Hos de fiskar där bakterien förekom gjorde den det i låg halt. Totalt identifierades <10 sekvenser per fisk, motsvarande <0,2 % av dessa fiskars totala identifierade sekvensantal. Man kunde således inte se något signifikant samband mellan förekomsten, eller snarare avsaknaden, av *Flavobacterium* spp. mellan sjöarna.

### 4.7.2 *Yersinia* spp.

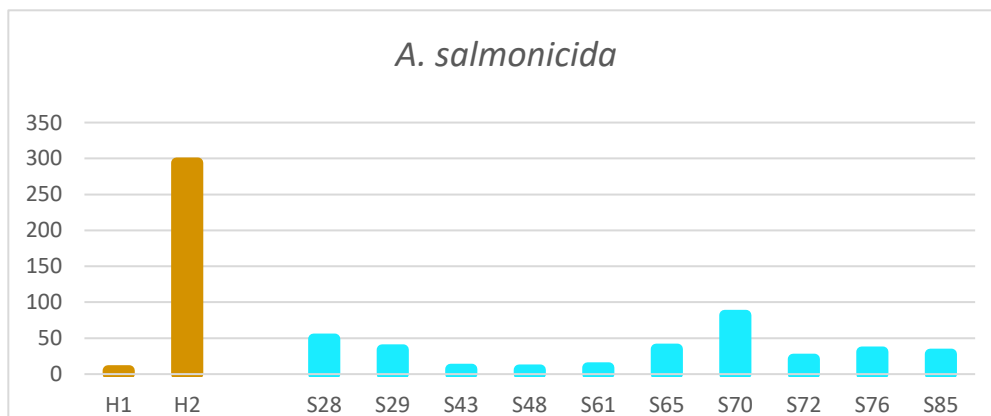
*Yersinia* spp. kunde påvisas hos sex vilda fiskar (två sikar, en regnbåge, en gädda, en abborre och en gärs), varav samtliga var från Storuman (7 % av sjöns provtagningspopulation, 5 % av sjöns salmonida provtagningspopulation) (Figur 8). Mer specifikt kunde *Y. ruckeri* identifieras i tarmfloran hos tre av dessa vilda fiskar (regnbågen, en av sikarna och gäddan). Utöver de vilda fiskarna kunde förekomst av *Y. ruckeri* även identifieras i tarmen hos två fiskar från fiskodlingen. Sammanfattningsvis kunde *Yersinia* inte påvisas i tarmfloran hos fiskar från Hornavan utan endast från fiskar i Storuman samt i fiskodlingen belägen i den sistnämnda sjön.

### 4.7.3 *Aeromonas* spp.

*Aeromonas* spp. förekom i tarmfloran hos fiskar från båda sjöarna, åtta från Hornavan och 19 från Storuman (8 % respektive 24 % av provtagningspopulationerna). Från Hornavan kom samtliga tarmprover där *Aeromonas* kunde påvisas från sik (9 % av den salmonida provtagningspopulationen) medan förekomst i Storuman inkluderade olika fiskarter: sju sikar, sju abborrar, två gärsar, en öring, en regnbåge och en röding (17 % av salmonida proverna från sjön).

I samband med NGS kunde vissa av *Aeromonas* spp. urskiljas på artnivå mot rRNA-databasen SILVA: *A. sobria*, *A. popoffii* och *A. salmonicida*. Resterande *Aeromonas* spp. som ej hade kunnat identifieras på artnivå jämfördes mot NCBI Reference Sequence Database, efter vilket samtliga *Aeromonas* kunde identifiera. *Aeromonas*arter så som *A. sanarellii*, *A. taiwanensis*, *A. finlandensis*, *A. veronii* och *A. aquatica* förekom. Två *Aeromonas* spp. matchade mot andra arter, *Plesiomonas shigelloides* och *Yersinia ruckeri*, dock endast med 97,2 % sekvensidentitet.

Intresset för att klassificera *A. salmonicida* till underart med hänsyn till förekomst *A. salmonicida* subsp *salmonicida* och *A. salmonicida* atypisk motiverade till ytterligare diagnostik för de 12 proverna där *A. salmonicida* kunde påvisas (Figur 9).



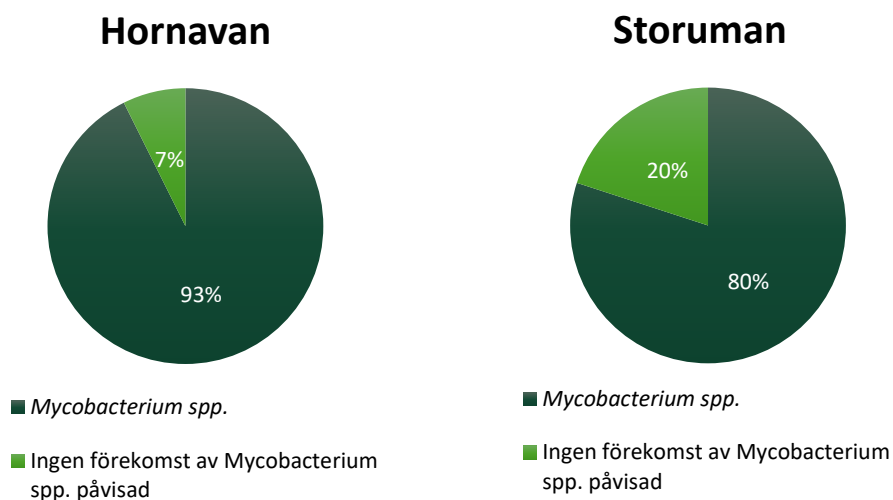
Figur 9. Tarmprover från Hornavan (H) markerat i gult och tarmprover från Storuman (S) i blått (n=12). X-axeln visar antalet sekvenser av *A. salmonicida* som kunde identifieras hos vardera fisk.

Ytterligare diagnostik med Sanger-sekvensering avseende underarter av *A. salmonicida* gav inget resultat.

## 4.8 Potentiellt zoonotiska bakterier

Prevalensen av *Mycobacterium* spp. i tarmfloran var hög i de båda sjöarna. Från tarmfloran insamlad från Hornavan kunde bakterien påvisas hos 88 fiskar: 77 sikar, tre rödingar och åtta abborrar (93 % av alla prover från sjön och 94 % av salmonida proverna från sjön) (Figur 10). Från Storuman kunde bakterien påvisas i tarmfloran hos 68 fiskar: 36 sikar, nio rödingar, sju harrar, tre öringar, en regnbåge, 12 abborrar, nio gärsar och två gäddor (80 % av alla prover från sjön och 90 % av sjöns salmonida prover). Prevalensen av *Mycobacterium* spp. var således högre i Hornavan än i Storuman. *Mycobacterium* spp. förekom även hos fyra av fiskarna från fiskodlingen.

Sex olika arter av *Mycobacterium* spp. identifierades: *M. arabiense*, *M. rhodesiae*, *M. hodleri*, *M. madagascariense* och *M. grossiae*. Kliniska fall av sjukdom hos människa där *M. rhodisea* (Chen *et al.* 2024), *M. grossie* (Paniz-Mondolfi *et al.* 2017) och *M. madagascariense* (Ballester *et al.* 2013) har kunnat påvisas har förekommit, dock ytterst få till antal rapporterade.



Figur 10. Prevalensen av *Mycobacterium* spp. i tarmfloran hos fiskar från Hornavan och Storuman.

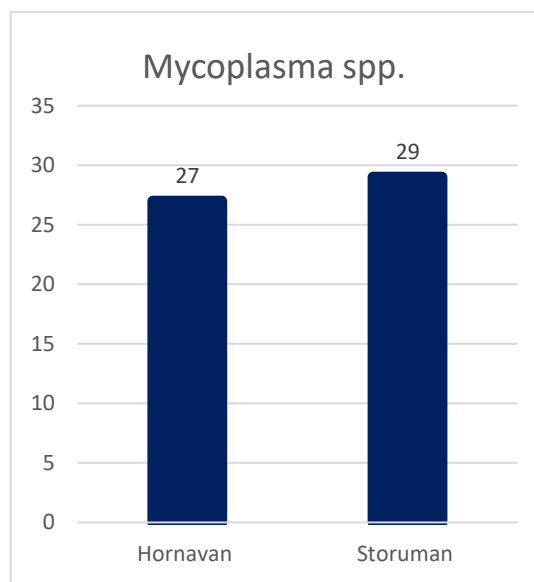
### 4.8.1 Övriga zoonoser:

Övriga zoonoser som var av intresse att undersöka var *Aeromonas hydrophila*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* samt *Vibrio* spp. *Aeromonas hydrophila* kunde inte påvisas i tarmfloran hos någon av fiskarna, varken vild eller odlad. *Erysipelothrix* spp. kunde endast identifieras på taxonomisk genusnivå, och påvisades i tarmfloran hos en vild fisk (en sik från Storuman) samt hos en odlad fisk. Hos båda

dessa fiskar förekom *Erysipelothrix* spp. i låg halt. Endast en bakterie tillhörande genus *Vibrio* kunde identifieras i tarmproverna, *Vibrio metschnikovii*, en bakterie som kan orsaka diarré och hudsår vid human infektion (Konechnyi *et al.* 2021) och har även visat sig kunna vara en möjlig patogen hos fisk, exempelvis stör (Xiao *et al.* 2022). Den vilda fisk där *V. mescthinkovii* kunde påvisas var den sik från Storuman som även bar på *Erysipelothrix* spp.

#### 4.9 *Mycoplasma* spp.

I litteraturöversikten omnämns *Mycoplasma* spp. som en bakteriegrupp av relevans i tarmfloran hos laxfiskar (Rasmussen *et al.* 2021). Mykoplasma kunde ses i tarmfloran hos fisk från båda sjöarna (Figur 11). I Hornavan förekom *Mycoplasma* spp. i 27 tarmprover (23 sikar, tre rödingar och en abborre) (28 % av sjöns totala prov och 31 % av sjöns salmonida prover). I Storuman förekom den i tarmfloran hos 29 fiskar (åtta sikar, åtta abborrar, fem rödingar, två gärsar, två harrar, två gäddor, en regnbåge och en öring) (34 % av sjöns prover och 29 % av sjöns salmonida prover). Det gick ej att påvisa någon signifikant skillnad i förekomst av *Mycoplasma* spp. mellan de båda sjöarna.



Figur 11. Antal fiskar med förekomst av *Mycoplasma* spp. i tarmfloran (n=56).

## 5. Diskussion

### 5.1 Generell jämförelse mellan Hornavan, Storuman och fiskodlingen

#### 5.1.1 Fylum

I detta arbete genomfördes en av de första studierna i Sverige med mål att undersöka tarmfloras bakteriella sammansättning hos vilda fiskar, med det extra syftet att undersöka om kassodlingssystem kan påverka tarmfloran hos de vilda fiskarna som lever i samma sjö. Resultatet visar på tydliga skillnader på fylum-nivå sjöarna emellan. Både i Hornavan, Storuman och fiskodlingen var *Firmicutes* dominerande fylum, följt av *Actinobacteriota* och *Verrucomicrobiota*, 18 %, för Hornavan (Figur 3). I Storuman utgjorde *Verrucomicrobiota* endast <1 % av de avlästa sekvenserna av sjöns sammanlagda tarmflora. Den höga förekomsten av *Verrucomicrobiota* i Hornavan var inte förväntad. *Verrucomicrobiota* är ett fylum som visat sig vara vanligt förekommande i våtmarksområden (Ivanova & Dedysh 2023). Gruppen innehåller även bakterier, exempelvis *Akkermansia muciniphila*, som har visat sig vara en symbiont med probiotiska egenskaper hos människor (Zhang *et al.* 2019). Artiklar beträffande samspelet mellan *Verrucomicrobiota* och fiskars tarmflora är få och skulle behöva undersökas ytterligare för att se vad förekomsten av detta fylum innebär för fiskarnas hälsa.

#### 5.1.2 Fynd i förhållande till tidigare litteratur

Av de två tarmfloroprofilerna från de vilda bestånden återspeglade inte den tidigare litteraturen som har berörts i litteraturöversikten beträffande storleksordningen av representerade fylum i tarmfloran. Huyben *et al.* (2018) rapporterade *Tenericutes* som ett dominerande fylum, dock går det inte att likställa det resultatet med resultatet i denna studie. Detta eftersom databasen som användes, senast uppdaterad 2021, inte särskiljer *Tenericutes* från *Firmicutes*, det fylum som *Tenericutes* tidigare räknades som en del av. Att *Tenericutes*, innehållande *Mycoplasma* spp., är viktigt att ta i beaktande är tydligt när man jämför med tidigare studier, där förekomsten av Mykoplasma hos de salmonida fiskarna har visat sig möjligen kunna ha en betydande roll för fiskarna avseende metabolism och immunförsvar (Rasmussen *et al.* 2021).

#### 5.1.3 Jämförelse av tarmfloran avseende individ, art och nät

När man jämförde tarmfloran hos fiskarna på individnivå kunde inga tydliga skillnader ses mellan sjöarna. Tarmproverna jämfördes även avseende fiskart och från vilket nät de hade fångats, där kunde man inte heller se grupperingar (Bilaga 1). Att skillnader inte kan visualiseras skulle kunna förklaras av den höga bio-

diversiteten hos varje individuell fisk. Detta i sig skulle kunna förklaras av den varierande provtagningspopulationen: olika arter, varierande storlekar (både vikt och längd), olika åldrar, olika kön samt varierande grad av könsmognad samt fångst på olika djup. Dock kunde man se skillnader mellan sjöarna och fiskodlingen, men vid tolkning av detta resultat behöver man ta hänsyn till storlekskillnaden mellan provantalen. Även inom denna lilla, till synes homogena grupp på fem individer kunde man se två skilda tarmfloreprouver (Figur 6). Enligt uppgifter från fiskodlaren var samtliga tagna från samma kasse. Teoretiskt sett skulle de kunna komma från olika vatten innan de hamnade i samma kasse då man vanligtvis jämnar ut gruppstorlekar inom fiskodlingar. Då skulle de ha kunnat utsättas för olika faktorer som påverkar tarmfloras sammansättning, eller så talar detta för att det finns en stor individvariation i tarmfloran hos odlad fisk. Större provpopulationer, både av vilda och odlade fiskar, hade kunnat ge en mer representativ bild av den verkliga tarmfloran i de båda sjöarna.

## 5.2 Förekomst av patogener och opportunist

### 5.2.1 *Renibacterium salmoninarum*

Förekomsten av den obligata patogenen *Renibacterium salmoninarum* kunde påvisas i tarmfloran från fisk från båda sjöarna. Hur bakterien har hamnat i dessa sjöar kan man enbart spekulera kring, om det exempelvis skulle kunna härstamma från fiskodlingar, inplanterade fiskar, andra antropogena aktiviteter, eller något helt annat. Upprepade utbrott av BKD har förekommit i fiskodlingar längs med Umeälven (SVA 2020), till vilken Storuman är ett huvudavrinningsområde. Således förekommer bakterien i vattnet och utbrott i fiskodlingar skulle kunna vara en av orsakerna till att bakterien kunde påvisas i tarmen hos de vilda fiskarna. I de fem tarmprover som kom från fiskodlingen kunde ingen *R. salmoninarum* påvisas, trots förekomst hos de vilda fiskarna som lever runt kassarna i sjön. Detta kan vara till följd av att populationen som provtogs från fiskodlingen var liten i förhållande till de vilda populationerna, att det inte förekom just i det provmaterialet som kom från tarmen, att dessa individer är fria från bakterien, etc. De studier som i skrivande stund utförs kring förekomst av BKD hos vilda fiskbestånd, som innefattar delar av populationen som ligger till grund för detta masterarbete, kommer kunna förtälja om förekomsten av *R. salmoninarum* i tarmen innebär att det även går att påvisa i njurarna hos fisken. I Sverige förekommer strikta krav på fiskodlingar för att undvika smitta av BKD, påvisad smitta resulterar i spärr av anläggningen samt sanering. Om förekomst av *R. salmoninarum* i tarmfloran kan ge upphov till BKD utgör inte detta endast ett hot mot välfärden bland de vilda fiskarna utan kan även ge ekonomiska konsekvenser om vild fisk smittar odlad.



### 5.2.2 *Flavobacterium* spp.

*Flavobacterios* och *kolumnaresjuka* är i förhållande till de andra bakteriella sjukdomarna som kan drabba laxfisk, en vanligt förekommande diagnos hos sjuka fiskar (Axén 2024). Trots detta var förekomsten av *Flavobacterium* spp. nästintill obefintlig i tarmproverna från de båda sjöarna. *Flavobacterium* spp. kunde endast påvisas i två av de 185 tarmproverna som undersöktes i studien. Infektionsport för dessa agens är inte helt klarlagd men gälar och hud har föreslagits som möjliga vägar för bakterierna att ta sig in och manifesteras i fisken, särskilt då det oftast rör sig om hudinfektioner (SVA 2023a; e) Detta skulle kunna förklara den låga förekomsten i tarmen, och att det skulle kunna finnas större risk att påträffa denna bakterie på dessa på fiskarnas kropp. Det skulle också kunna vara möjligt att dessa vilda bestånd, samt de fem fiskarna från odlingen, är fria från sjukdomen.

### 5.2.3 *Yersinia ruckeri* och *Aeromonas* spp.

*Yersinia ruckeri* har i tidigare studier visat sig vara en hydrofil bakterie som kan fästa på material och utrustning vid fiskodlingar (Coquet *et al.* 2002), vilket skulle kunna resultera i att denna opportunistiska bakterie, vid förekomst i fiskodlingar, lätt skulle kunna spridas till fiskar som uppehåller sig kring kassodlingarna. Opportunisten *Yersinia ruckeri* kunde identifieras i tarmfloran hos vilda fiskar från Storuman och även i tarmfloran hos fiskar från fiskodlingen. I tarmproverna från Hornavan kunde ingen *Yersinia* spp. påvisas. Fiskodlingen skulle således kunna vara orsaken till att bakterien förekommer i den fiskodlingsexponerade sjön och inte i den naiva. Vidare var förekomsten av *Aeromonas* spp. i tarmfloran hos fiskarna från Storuman högre än i Hornavan (Figur 5), samtidigt som den inte kunde påvisas hos de fiskarna som kom från fiskodlingen. Förekomsten av *Aeromonas salmonicida* var även den högre i Storuman än i Hornavan. *Aeromonas salmonicida* anses inte vara ubikvitär och anses inte smitta med vatten utan snarare vara en smitta som sprids mellan djuren, vilket styrker ett samband mellan förekomst av denna bakterie hos vilda fiskar i samband med exponering för fiskodling.

## 5.3 *Mycobacterium* spp. och andra zoonoser

Inom genus *Mycobacterium* spp. förekommer både kommensaler och patogener där de mest patogena för människor inte återfinns i akvatiska miljöer. Den relativa förekomsten av *Mycobacterium* spp. var hög i både sjöarna, mer så i Hornavan än i Storuman, dock sågs inte den skillnaden som signifikant. Förekomsten av andra potentiellt zoonotiska bakterier var låg i de båda sjöarna. Av de andra nämnda potentiella zoonoserna kunde endast *Erysipelothrix* spp. identifieras i tarmfloran och då enbart hos en fisk. På genusnivå var det inte möjligt att avgöra om denna *Erysipelothrix* är patogen eller ej, dock påvisades den zoonotiska bakterien *Vibrio*

*metschnikovii* hos samma fisk. Halten av dessa två bakterier i denna individuella fisk ska nämnas var mycket låg, och skulle således kunna anses försumbar ur ett zoonosperspektiv.

## 5.4 Riskfaktorer och förbättringsförslag

För denna studie finns en rad faktorer som kan ha kommit att påverka resultatet. För det första kan det vara av intresse att känna till att utsättning av totalt 8000 öringar sker årligen i den för studien naiva sjön Hornavan. Detta ifrågasätter hur opåverkad av fiskodling man kan klassificera sjön, då det ändå varje år tillkommer fiskar som inte är vilda, utan odlade. Det är värt att känna till att ingen öring fångades in från Hornavan i samband med studiens provfiske. För det andra finns det en landbaserad fiskodling belägen nedströms i Hornavan (mellan Hornavan och Uddajaur). Utvatten från denna odling, efter centrifugeringsrening, släpps ut i sjön. Trots att det ligger nedströms finns det en risk att fiskarna som samlades in från Hornavan skulle kunna vandrat förbi utvattnet och på så vis inte heller kunna räknas som helt opåverkade av fiskodling. Dessa två faktorer gör att man kan ifrågasätta graden av naivitet hos sjön. För det tredje grundades fiskodlingen i Storuman, kring vilken majoriteten av provfisket skedde, först 2021, vilket väcker frågeställningen hur momentan den möjliga påverkan av fiskodling är på de vilda bestånden. Är en period på tre år tillräckligt för att påverka tarmfloran? Dock förekommer andra odlingslägen i sjön, tillhörande samma företag, och mellan vilka det kan ske slussning av fisk. Detta gör att sjön i sig har varit exponerad för fiskodling under en betydligt längre period än 3 år (ca 20–40 år). Vidare rapporterade SVT (Forsgren 2022) om ett sabotage som en av fiskodlingarna i Storuman utsattes för 2022 vilket resulterade i att 20 ton fisk lyckades rymma. I SVT-artikeln kommenterar Västerbottens länsfiskekonsulent det faktum att denna smitning skulle kunna komma att påverka vilda bestånd, exempelvis genom konkurrens om lekyta, men kommenterade även att dessa odlade fiskars överlevnadsmöjligheter inte var ljusa till följd av fiskarnas oförmåga att hitta föda i det vilda. För detta masterarbets syfte (fiskarnas tarmflora) är det svårt att säga vad denna rymning skulle kunna ha haft för betydelse.

Att det endast var ett sjöpar som utgjorde studiepopulationen medför att denna studie inte med säkerhet kan bekräfta fiskodlingars påverkan på tarmfloran hos de vilda fiskarna. Tarmfloras bakteriella sammansättning skulle kunna skilja sig mellan fisk från de olika sjöarna, oberoende av förekomsten av fiskodling. Det man kan uttala sig om är skillnader mellan de båda sjöarna, jämföra med tarmfloran hos de odlade fiskarna och resonera därifrån. För att skaffa sig ett starkare studieunderlag skulle tarmfloran från fisk från fler sjöar, med och utan fiskodling kunna jämföras, samt fler fiskar från fiskodlingar, för att fastställa samband.

Ett gott komplement till studien för att kunna definiera den absoluta förekomsten av olika bakterier skulle kunna vara qPCR för att se den kvantitativa skillnaden i förekomst av olika bakterier i tarmfloran. Det hade även varit intressant att kartlägga den totala tarmfloren hos fiskarna genom att även undersöka sammansättningen av andra delar som bygger upp tarmfloran; virus, protozoer, jäst- och mögelsvampar, för att se om dessa kan påverkas av förekomsten av fiskodlingar. Detta är möjligt att undersöka med det DNA som extraherats i denna studie.

## 5.5 Konklusion

Den generella tarmfloran hos de provtagna fiskarna var olika mellan de båda sjöarna. I den naiva sjön Hornavan dominerade fylumet *Firmicutes*, följt av *Actinobacteriota* och *Verrucomicrobiota*. I den fiskodlingsexponerade sjön Storuman dominerade *Firmicutes*, följt av *Proteobacteria* och *Actinobacteriota*. *Renibacterium salmoninarum* kunde påvisas i tarmarna från fiskar från båda sjöarna. Även *Aeromonas* spp. kunde påvisas i tarmfloran i båda sjöarna. *Yersinia ruckeri* återfanns endast i den fiskodlingsexponerade sjön samt i dess fiskodling, medan *Flavobacterium* spp. endast kunde påvisas i tarmprover från den naiva sjön. Fiskarna var till synes friska i samband med provtagningen, trots förekomst av patogener och opportunisterna i tarmfloran.

Ytterligare forskning anses motiverat för att kunna dra ytterligare slutsatser kring om förekomst av patogener i tarmfloran hos vilda fiskar påverkas av förekomsten av kassodlingssystem. Denna forskning skulle vara avgörande för att utforma ett effektivt smittskydd mellan odlade fiskar och vilda bestånd.



# Referenser

- Agstam-Norlin, O., Nilsson, J., Carlberg, H., Huser, B. & Futter, M. (2023). *Ökad kunskap om kassodlingens miljöeffekter med fokus på fosfor*. (Rapport 2023:9) Institutionen för vatten och miljö, Sveriges lantbruksuniversitet.  
<https://pub.epsilon.slu.se/31171/1/agstam-norlin-o-et-al-20230704.pdf>
- Austin, B. & Austin, D.A. (2016). *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish*. Sixth edition, Springer International Publishing AG.  
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-32674-0>
- Axén, C. (2024). *Klimatutmaningar kopplat till sjukdomar, hälsa och välfärd*. [Föreläsning]. Statens veterinärmedicinska anstalt.  
[https://www.nkfv.se/images/Charlotte\\_Ax%C3%A9n\\_SVA\\_-\\_klimat\\_sjukdomar\\_och\\_smittskydd.pdf](https://www.nkfv.se/images/Charlotte_Ax%C3%A9n_SVA_-_klimat_sjukdomar_och_smittskydd.pdf) [2024-10-24]
- Ballester, F., Alcaide, F., Pujol, I., Hernández-Flix, S., Simó, J.M., Joven, J. & Camps, J. (2013). First human isolate of *Mycobacterium madagascariense* in the sputum of a patient with tracheobronchitis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 51 (2), e35–e36. <https://doi.org/10.1515/cclm-2012-0321>
- Bates, J.M., Mittge, E., Kuhlman, J., Baden, K.N., Cheesman, S.E. & Guillemin, K. (2006). Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation. *Developmental Biology*, 297 (2), 374–386.  
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.05.006>
- Björger, H., Li, Y., Kortner, T.M., Krogdahl, Å. & Koppang, E.O. (2020). Anatomy, immunology, digestive physiology and microbiota of the salmonid intestine: Knowns and unknowns under the impact of an expanding industrialized production. *Fish & Shellfish Immunology*, 107, 172–186.  
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.09.032>
- Chen, S., Sun, W., Liu, R., Yao, L. & Peng, Q. (2024). Intracranial infection caused by *Mycobacterium rhodesiae* with specific imaging findings and good response to medication: a case report and literature review. *Frontiers in Medicine*, 11, 1414369. <https://doi.org/10.3389/fmed.2024.1414369>
- Coquet, L., Cosette, P., Junter, G.-A., Beucher, E., Saiter, J.-M. & Jouenne, T. (2002). Adhesion of *Yersinia ruckeri* to fish farm materials: influence of cell and material surface properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 26 (4), 373–378.  
[https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(02\)00023-1](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(02)00023-1)
- Du, Y., Tang, X., Sheng, X., Xing, J. & Zhan, W. (2017). The influence of concentration of inactivated *Edwardsiella tarda* bacterin and immersion time on antigen uptake and expression of immune-related genes in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Microbial Pathogenesis*, 103, 19–28.  
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.12.011>

- European Medicines Agency (red.) (2023). *Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2022: trends from 2010 to 2022: thirteenth ESVAC report*. Publications Office of the European Union. <https://doi.org/10.2809/766171>
- Evelyn, T.P.T. (1996). 9 - Infection and Disease. I: Iwama, G. & Nakanishi, T. (red.) *Fish Physiology*. Academic Press. 339–366. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60279-4](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60279-4)
- Fletcher, T.C. & White, A. (1972). Antibody production in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.) after oral and parenteral immunization with *Vibrio anguillarum* antigens. *Aquaculture*, 1, 417–428. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(72\)90045-2](https://doi.org/10.1016/0044-8486(72)90045-2)
- Forsgren, T. (2022). *Fiskodling utanför Storuman utsatt för allvarligt sabotage – över 20 ton fisk kan ha rymt*. SVT Nyheter Västerbotten. <https://www.svt.se/nyheter/lokalt/vasterbotten/fiskeodling-utanfor-storuman-utsatt-for-allvarligt-sabotage-over-20-ton-fisk-kan-ha-rymt> [2024-11-11]
- Gauthier, D.T. (2015). Bacterial zoonoses of fishes: A review and appraisal of evidence for linkages between fish and human infections. *The Veterinary Journal*, 203 (1), 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.10.028>
- Grammes, F., Reveco, F.E., Romarheim, O.H., Landsverk, T., Mydland, L.T. & Øverland, M. (2013). *Candida utilis* and *Chlorella vulgaris* counteract intestinal inflammation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *PLoS ONE*, 8 (12), e83213. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083213>
- Herlemann, D.P.R., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J.J. & Andersson, A.F. (2011). Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *The ISME Journal*, 5 (10), 1571–1579. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.41>
- Huyben, D., Sun, L., Moccia, R., Kiessling, A., Dicksved, J. & Lundh, T. (2018). Dietary live yeast and increased water temperature influence the gut microbiota of rainbow trout. *Journal of Applied Microbiology*, 124 (6), 1377–1392. <https://doi.org/10.1111/jam.13738>
- Ivanova, A.A. & Dedysh, S.N. (2023). Phylogenetic diversity of *Verrucomicrobiota* in fens of Northern Russia. *Microbiology*, 92 (1), S7–S11. <https://doi.org/10.1134/S0026261723603573>
- Johnson, L.E., McMeans, B., Rooney, N., Gutgesell, M., Moccia, R. & McCann, K.S. (2018). Asymmetric assimilation of an anthropogenic resource subsidy in a freshwater food web. *Food Webs*, 15, e00084. <https://doi.org/10.1016/j.fooweb.2018.e00084>
- Jordbruksverket (2019). *Vattenbruk - en möjlighet för dig att utveckla ditt företag*. <https://jordbruksverket.se/utveckla-foretagande-pa-landsbygden/vattenbruk-och-fiske/vattenbruk> [2024-09-23]
- Jordbruksverket (2023). *Vattenbruk 2022*. <https://jordbruksverket.se/om-jordbruksverket/jordbruksverkets-officiella-statistik/jordbruksverkets-statistikrapporter/statistik/2023-08-31-vattenbruk-2022> [2024-11-11]

- Jordbruksverket (2024a). *Nationella åtgärder för att förebygga och hindra spridning av bakteriell njurinflammation (BKD) hos vattenlevande djur*. (6.2.17-04485/2021). <https://jordbruksverket.se/download/18.2d3fb92b18f08b2c6276205/1713945921897/Rapport-nationella-atgarder-bkd-tga.pdf> [2024-11-27]
- Jordbruksverket (2024b). *Statistik över anmälningsskyldiga djursjukdomar*. <https://jordbruksverket.se/djur/personal-inom-djurens-halso--och-sjukvard/anmalningsskyldighet/statistik-over-anmalningsskyldiga-djursjukdomar> [2024-11-29]
- Jordbruksverket (2024c). *Vattenbruk 2023*. <https://jordbruksverket.se/om-jordbruksverket/jordbruksverkets-officiella-statistik/jordbruksverkets-statistikrapporter/statistik/2024-08-15-vattenbruk-2023> [2024-12-09]
- Keerthisinghe, T.P., Wang, F., Wang, M., Yang, Q., Li, J., Yang, J., Xi, L., Dong, W. & Fang, M. (2020). Long-term exposure to TET increases body weight of juvenile zebrafish as indicated in host metabolism and gut microbiome. *Environment International*, 139, 105705. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105705>
- Kiessling, A. (2024a). *Fiskodling i norr - en livsmedelsproduktion med miljöpotential*. [Forskningsinformation]. Institutionen för tillämpad husdjursvetenskap och välfärd (Aquakultur), Sveriges lantbruksuniversitet. <https://www.slu.se/fakulteter/vh/forskning/forskningsprojekt/vilt-och-fisk/fiskodling-i-norr---en-livsmedelsproduktion-med-miljopotential/> [2024-09-18]
- Kiessling, A. (2024b). *Miljö-kassen – ett led i cirkulär matproduktion*. [Forskningsinformation]. Institutionen för tillämpad husdjursvetenskap och välfärd (Aquakultur), Sveriges lantbruksuniversitet. <https://www.slu.se/fakulteter/vh/forskning/forskningsprojekt/vilt-och-fisk/miljokassen/> [2024-10-22]
- Konechnyi, Y., Khorkavyi, Y., Ivanchuk, K., Kobza, I., Sękowska, A. & Korniychuk, O. (2021). *Vibrio metschnikovii*: Current state of knowledge and discussion of recently identified clinical case. *Clinical Case Reports*, 9 (4), 2236–2244. <https://doi.org/10.1002/ccr3.3999>
- Livsmedelsverket (2023). *Tarmfloran*. <https://www.livsmedelsverket.se/matvanor-halsa--miljo/sjukdomar-allergier-och-halsa/tarmfloran> [2024-09-17]
- Luan, Y., Li, M., Zhou, W., Yao, Y., Yang, Y., Zhang, Z., Ringø, E., Erik Olsen, R., Liu Clarke, J., Xie, S., Mai, K., Ran, C. & Zhou, Z. (2023). The fish microbiota: Research progress and potential applications. *Engineering*, 29, 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2022.12.011>
- Migliore, L., Rotini, A. & Thaller, M.C. (2013). Low doses of tetracycline trigger the *E. coli* growth: A case of hormetic response. *Dose-Response*, 11 (4). <https://doi.org/10.2203/dose-response.13-002.Migliore>
- MSD (2023). Necrotic enteritis in poultry - Poultry. *MSD Veterinary Manual*. <https://www.msdsvetmanual.com/poultry/necrotic-enteritis/necrotic-enteritis-in-poultry> [2024-10-31]

- NORM/NORM-VET 2023 (2024). *Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway*. Tromsø / Ås / Oslo. ISSN:1502-2307 (print) / 1890-9965 (electronic).
- Nyqvist, O. (2021). *Fiskar i svenska sjöar de senaste 40 åren*. SVT Datajournalistik. <https://www.svt.se/datajournalistik/fiskar-i-svenska-sjoar-de-senaste-40-aren/> [2024-11-11]
- Panigrahi, A., Kiron, V., Kobayashi, T., Puangkaew, J., Satoh, S. & Sugita, H. (2004). Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 102 (4), 379–388. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.08.006>
- Paniz-Mondolfi, A.E., Greninger, A.L., Ladutko, L., Brown-Elliott, B.A., Vasireddy, R., Jakubiec, W., Vasireddy, S., Wallace, R.J., Simmon, K.E., Dunn, B.E., Jackoway, G., Vora, S.B., Quinn, K.K., Qin, X. & Campbell, S. (2017). *Mycobacterium grossiae* sp. nov., a rapidly growing, scotochromogenic species isolated from human clinical respiratory and blood culture specimens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67 (11), 4345–4351. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002216>
- Parenti, L.R. & Weitzman, S.H. (2024). Fish. *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/animal/fish/The-digestive-system> [2024-09-16]
- Powell, D.B. (2000). Chapter 26 - Immune System. I: Ostrander, G.K. (red.) *The Laboratory Fish*. Academic Press. 441–449. <https://doi.org/10.1016/B978-012529650-2/50032-9>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J. & Glöckner, F.O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41 (Database issue), D590. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Rasmussen, J.A., Villumsen, K.R., Duchêne, D.A., Puetz, L.C., Delmont, T.O., Sveier, H., Jørgensen, L. von G., Præbel, K., Martin, M.D., Bojesen, A.M., Gilbert, M.T.P., Kristiansen, K. & Limborg, M.T. (2021). Genome-resolved metagenomics suggests a mutualistic relationship between *Mycoplasma* and salmonid hosts. *Communications Biology*, 4 (1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02105-1>
- Rombout, J.H.W.M., Abelli, L., Picchietti, S., Scapigliati, G. & Kiron, V. (2011). Teleost intestinal immunology. *Fish & Shellfish Immunology*, 31 (5), 616–626. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.09.001>
- Rombout, J.H.W.M. & van den Berg, A.A. (1989). Immunological importance of the second gut segment of carp. I. Uptake and processing of antigens by epithelial cells and macrophages. *Journal of Fish Biology*, 35 (1), 13–22. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1989.tb03388.x>
- Rombout, J.H.W.M., Lamers, C.H.J., Helfrich, M.H., Dekker, A. & Taverne-Thiele, J.J. (1985). Uptake and transport of intact macromolecules in the intestinal epithelium



- of carp (*Cyprinus carpio* L.) and the possible immunological implications. *Cell and Tissue Research*, 239 (3), 519–530. <https://doi.org/10.1007/BF00219230>
- Romero, J. & Navarrete, P. (2006). 16S rDNA-based analysis of dominant bacterial populations associated with early life stages of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Microbial Ecology*, 51 (4), 422–430. <https://www.jstor.org/stable/25153335> [2024-10-29]
- Salinas, I. (2015). The mucosal immune system of teleost fish. *Biology*, 4 (3), 525–539. <https://doi.org/10.3390/biology4030525>
- Sinclair, L., Osman, O.A., Bertilsson, S. & Eiler, A. (2015). Microbial community composition and diversity via 16S rRNA gene amplicons: Evaluating the Illumina Platform. *PLOS ONE*, 10 (2), e0116955. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116955>
- SLU (2024). *Databasen för provfiske i sjöar - NORS*. [Databas]. Sveriges lantbruksuniversitet. <https://www.slu.se/institutioner/akvatiska-resurser/databaser/databas-for-sjoprovfiske-nors/> [2024-11-11]
- SVA (2020). *Provtagning avseende renibakterios/BKD i vild laxfisk i Umeälven, Ångermanälven, Faxälven och Ljungan*. (Delrapport, Dnr HaV: 803–20). Statens veterinärmedicinska anstalt. <https://www.sva.se/media/eyclgzgm/provtagning-renibakterios-bkd-i-vild-laxfisk.pdf>
- SVA (2022). *Bakteriell njurinflammation (BKD) hos fisk*. Statens veterinärmedicinska anstalt. <https://www.sva.se/amnesomraden/djursjukdomar-a-o/bakteriell-njurinflammation-bkd-hos-fisk/> [2024-11-11]
- SVA (2023a). *Flavobakterios hos fisk*. Statens veterinärmedicinska anstalt. <https://www.sva.se/amnesomraden/djursjukdomar-a-o/flavobakterios-hos-fisk/> [2024-09-19]
- SVA (2023b). *Furunkulos (ASS) hos fisk*. Statens veterinärmedicinska anstalt. <https://www.sva.se/amnesomraden/djursjukdomar-a-o/furunkulos-ass-hos-fisk/> [2024-11-02]
- SVA (2023c). *Hälsoövervakning av vildlevande fisk och skaldjur, ur Smittläget i Sverige*. Statens veterinärmedicinska anstalt. <https://www.sva.se/vilda-djur/fisk-kraftdjur-musslor-och-ostron/halsolage-for-vildlevande-fisk-kraftdjur-musslor-och-ostron/halsoovervakning-av-vildlevande-fisk-och-skaldjur-ur-smittlaget-i-sverige/> [2024-11-12]
- SVA (2023d). *Infektiös dermatit (ASA) hos fisk*. Statens veterinärmedicinska anstalt. <https://www.sva.se/amnesomraden/djursjukdomar-a-o/infektios-dermatit-asa-hos-fisk/> [2024-11-23]
- SVA (2023e). *Kolumnaresjuka hos fisk*. Statens veterinärmedicinska anstalt. <https://www.sva.se/amnesomraden/djursjukdomar-a-o/kolumnaresjuka-hos-fisk/> [2024-11-29]
- SVA (2023f). *Vibrio vulnificus-infektion hos fisk*. Statens veterinärmedicinska anstalt. <https://www.sva.se/amnesomraden/djursjukdomar-a-o/vibrio-vulnificus-infektion-hos-fisk/> [2024-11-18]

- SVA (2023g). *Yersinios/rödmunsjuka (ERM) hos fisk*. Statens veterinärmedicinska anstalt. <https://www.sva.se/amnesomraden/djursjukdomar-a-o/yersinios-rodmonsjuka-erm-hos-fisk/> [2024-09-18]
- SVA (2023h). *Zoonoser hos fisk*. Statens veterinärmedicinska anstalt. <https://www.sva.se/produktionsdjur/fisk-kraftdjur-musslor-och-ostron/zoonoser-hos-fisk/> [2024-11-18]
- SVA (2024a). *Fisk, kräftdjur, musslor och ostron*. Statens veterinärmedicinska anstalt. <https://www.sva.se/vilda-djur/fisk-kraftdjur-musslor-och-ostron/> [2024-09-23]
- SVA (2024b). *Klostridios hos får*. Statens veterinärmedicinska anstalt. <https://www.sva.se/amnesomraden/djursjukdomar-a-o/klostridios-hos-far/> [2024-10-31]
- Svenskt vattenbruk (2022a). *Djurskydd och djurhälsa*. <https://www.svensktvattenbruk.se/46/smittskydd-och-djurskydd/vanliga-smittor.html> [2024-11-27]
- Svenskt vattenbruk (2022b). *Driva vattenbruk*. <https://www.svensktvattenbruk.se/46/att-driva-vattenbruk/vattenbruksinriktning-och-teknik/vattenbruk-i-kassar.html> [2024-10-21]
- Svenskt vattenbruk (2022a). *Kompensationsodling*. <https://www.svensktvattenbruk.se/46/att-driva-vattenbruk/vattenbruksinriktning-och-teknik/kompensationsodling.html> [2024-11-12]
- Svenskt vattenbruk (2022b). *Sättfisk*. <https://www.svensktvattenbruk.se/46/att-driva-vattenbruk/vattenbruksinriktning-och-teknik/sattfiskodling.html> [2024-11-11]
- SJVFS 2021:10 *Statens jordbruksverks föreskrifter och allmänna rådom biosäkerhetsåtgärder samt anmälan och övervakning av djursjukdomar och smittämnen*. Statens jordbruksverk.
- Swedres-Svarm (2024). *Sales of antibiotics and occurrence of antibiotic resistance in Sweden (2023)*. Folkhälsomyndigheten och Statens veterinärmedicinska anstalt. <https://www.sva.se/media/rrrbjnyl/svkom230-2023-v1-swedres-svarm-2023.pdf>
- Uren Webster, T.M., Rodriguez-Barreto, D., Consuegra, S. & Garcia de Leaniz, C. (2020). Cortisol-related signatures of stress in the fish microbiome. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1621. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01621>
- Vera-Ponce de León, A., Hensen, T., Hoetzing, M., Gupta, S., Weston, B., Johnsen, S.M., Rasmussen, J.A., Clausen, C.G., Pless, L., Veríssimo, A.R.A., Rudi, K., Snipen, L., Karlsen, C.R., Limborg, M.T., Bertilsson, S., Thiele, I., Hvidsten, T.R., Sandve, S.R., Pope, P.B. & La Rosa, S.L. (2024). Genomic and functional characterization of the Atlantic salmon gut microbiome in relation to nutrition and health. *Nature Microbiology*, 9 (11), 3059–3074. <https://doi.org/10.1038/s41564-024-01830-7>
- Wallace, K.N., Akhter, S., Smith, E.M., Lorent, K. & Pack, M. (2005). Intestinal growth and differentiation in zebrafish. *Mechanisms of Development*, 122 (2), 157–173. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2004.10.009>

- Xiao, Z., Li, X., Xue, M., Zhang, M., Liu, W., Fan, Y., Chen, X., Chu, Z., Gong, F., Zeng, L. & Zhou, Y. (2022). *Vibrio metschnikovii*, a potential pathogen in freshwater-cultured hybrid sturgeon. *Animals*, 12 (9), 1101.  
<https://doi.org/10.3390/ani12091101>
- Zhang, T., Li, Q., Cheng, L., Buch, H. & Zhang, F. (2019). *Akkermansia muciniphila* is a promising probiotic. *Microbial Biotechnology*, 12 (6), 1109–1125.  
<https://doi.org/10.1111/1751-7915.13410>
- Östman, M. (2018). *Antimicrobials in sewage treatment plants: occurrence, fate and resistance*. Diss. Umeå universitet. <https://umu.diva-portal.org/smash/record.jsf?pid=diva2%3A1255290&dswid=5620>

# Populärvetenskaplig sammanfattning

Tarmfloran hos fisk är ett område som man sedan några år tillbaka har börjat undersöka närmare, detta för att man vill förstå hur den kan påverka fiskarnas hälsa. Majoriteten av dessa studier är gjorda på fiskar som lever i fångenskap, antingen på laboratorier eller tankar/kassar på fiskodlingsanläggningar. Studierna har bland annat undersökt vad som kan påverka tarmfloran hos fiskarna och då sett att foder, läkemedel, stress, vattentemperatur och hur gammal fisken är kan påverka tarmfloras sammansättning. Dock finns det väldigt få studier på tarmfloran hos vilda fiskar, som man skulle kunna tänka ha annorlunda tarmflora då de lever så olikt fiskarna i fångenskap.

Det vanligaste sättet att odla matfisk i Sverige är genom kassodling. Kassodling går ut på att fiskarna hålls i nätkassar utplacerade i sjöar och i vattendrag. Näten gör att restmaterial från fiskodlingen så som foderrester, läkemedel, avföring och urin, kan komma ut i vattnet och i miljön och på så vis nå de vilda fiskarna. Därför finns det orsak att misstänka att förekomsten av fiskodling kan påverka vilda fiskar.

Denna studie undersöker skillnader i den bakteriella tarmfloran hos fiskar från två olika sjöar ur tre olika aspekter. Först undersöktes den generella sammansättningen av bakteriefloran i tarmen, sedan undersöktes om det fanns några skillnader i förekomst av bakterier som kan ge upphov till sjukdom hos fisk och slutligen undersöktes om det var någon skillnad i bakterier som kan ge upphov till sjukdom hos människor. Fiskarna som undersöktes och jämfördes kom från två olika sjöar i Norrland och fångades med nät. Tarmar samlades in från totalt 185 fiskar, 95 från den naiva sjön Hornavan och 85 från sjön Storuman, där det förekommer flera fiskodlingar av kassmodell. Utöver hos dessa 180 vilda fiskar undersöktes även tarmfloran hos fem fiskar från fiskodlingen. Dessa fem användes som referens för att kunna avgöra likheter och skillnader mellan de båda sjöarna. För att ta reda på vilka bakterier som förekom i tarmen användes DNA-baserade metoder.

Studiens resultat visade att det förekom skillnader i den generella sammansättningen av bakterier i tarmfloran mellan fiskar från de olika sjöarna. Även skillnader i förekomst av specifika bakterier kunde ses. Det var framför allt bakterien *Aeromonas salmonicida*, som kan ge upphov till sjukdom hos fisk, och som var mer vanligt förekommande i sjön med fiskodling i jämförelse med sjön utan fiskodling. Detta är en bakterie som framför allt smittar från djur till djur och skulle kunna vara en effekt av fiskodlingen i sjön. Även den bakterie som orsakar yersinos/rödmunsjuka var mer vanligt förekommande i den sjö som hade fiskodlingar. Bakterien som ger upphov till den anmälningspliktiga sjukdomen BKD

kunde påvisas i tarmen hos vilda fiskar från båda sjöarna. Förekomsten av vissa bakterier som skulle kunna orsaka sjukdom hos människa var hög i båda sjöarna och ingen tydlig skillnad kunde ses mellan sjöarna.

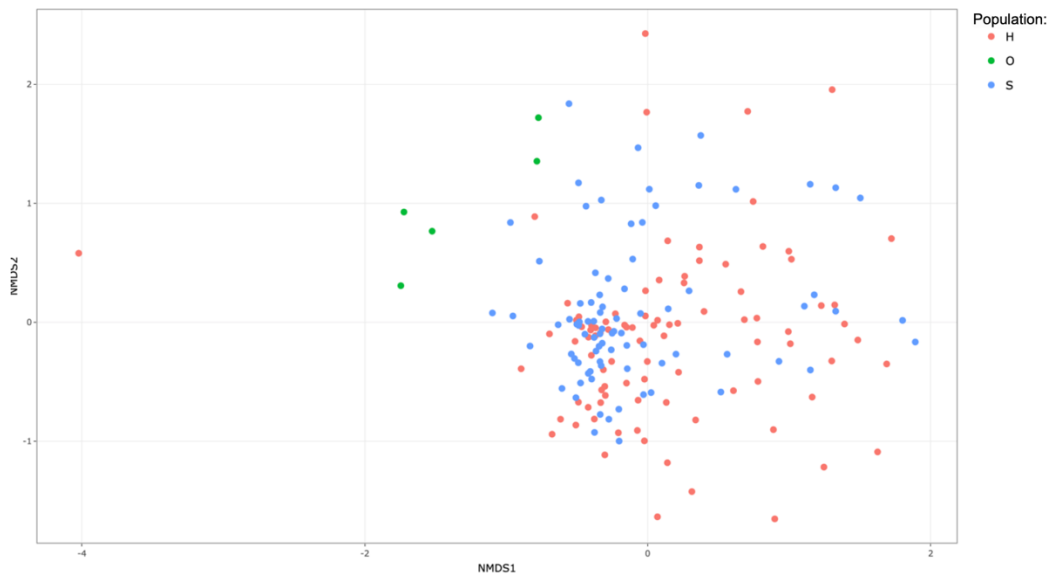
Sammanfattningsvis kunde skillnader i tarmfloran hos fisk mellan de båda sjöarna ses. Ytterligare forskning krävs dock för att styrka resultatet från studien, för att se att de skillnader som upptäcktes här även kan ses i andra sjöar med och utan fiskodling. Denna forskning är viktig för att förstå hur smitta kan spridas mellan odlade och vilda fiskar och på så vis kunna förhindra att sjukdomsutbrott sker.

# Tack

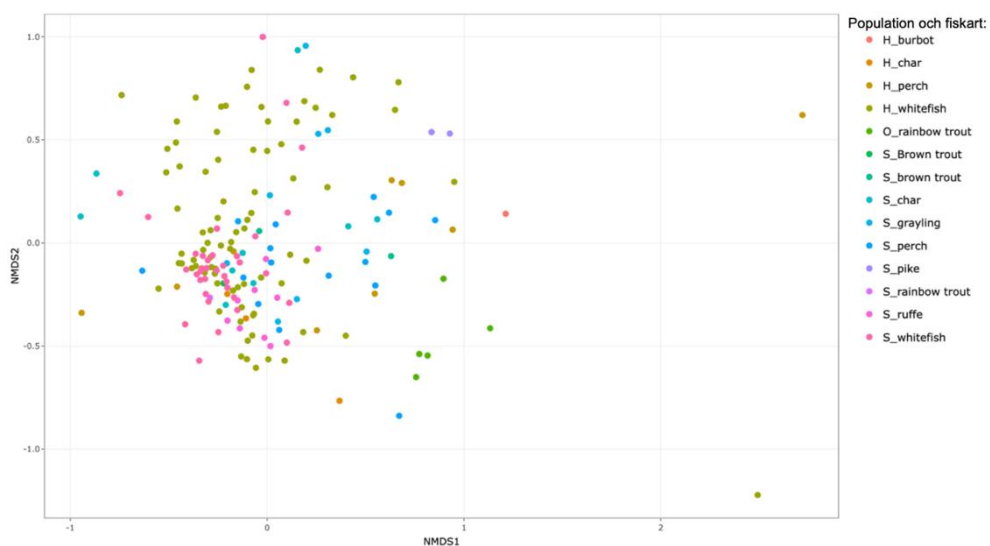
Jag vill rikta ett stort tack till alla som gjorde detta examensarbete möjligt. Först och främst vill jag tacka min handledare, Charlotte Axén, för hennes stora engagemang och stöd. Även tack till min biträdande handledare Stefan Bertilsson samt forskare Tong Liu och stödet de gav mig i laboratoriearbete samt bearbetning av studiens resultat. Slutligen vill också tacka *Familjen Kamprads stiftelse* för finansiering av detta projekt och som på så vis gjorde detta examensarbete möjligt. Det har varit ovärderligt.

# Bilaga 1

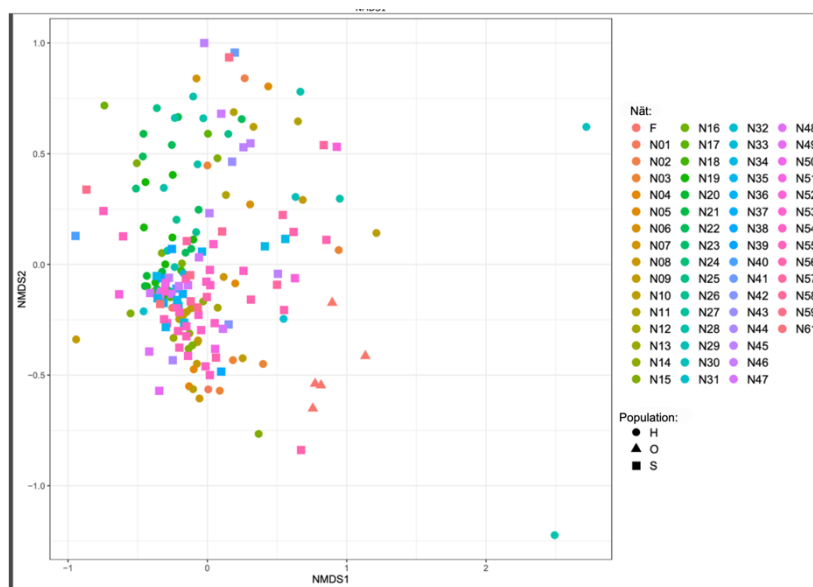
Nedan visas tre olika diagram (Figur 1-3) där man jämfört tarmfloran mellan de tre olika populationerna. NMDS (Non-metric multidimensional scaling) vilket är ett tvådimensionellt sätt att visualisera multidimensionell data. NMDS1 och NMDS2 är de två första dimensionerna. Ju närmare punkterna i diagrammet är, desto mer lika är de. Värdena är "rarefied" till 2000 i antal sekvenser som gjordes i R innan analysen genomfördes.



Figur 1. Tarmfloran hos de olika populationerna representerade av olika färger.



Figur 2. Alla individers tarmflora indelad färgmässigt efter sjö och art.



Figur 3. Tarmfloran hos alla provtagna fiskar, visas i nät (färg) och population (form).



## Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Även om du inte publicerar fulltexten kommer den arkiveras digitalt. Om fler än en person har skrivit arbetet gäller krysset för samtliga författare. Du hittar en länk till SLU:s publiceringsavtal på den här sidan:

- <https://libanswers.slu.se/sv/faq/228316>

JA, jag ger härmed min/vår tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

NEJ, jag ger inte min/vår tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.