

Er lav partikkelbelastning i RAS fordelaktig?

Produksjon av laks i resirkuleringssystemer (RAS) innebærer annerledes vannkvalitet med mer partikler enn i gjennomstrømsystemer (FTS). Høy belastning av partikler og organisk materiale i RAS-vannet gir grunnlag for et mangfoldig mikrobielt samfunn som kan påvirke biofilteret og fiskens helse. Økt forståelse av sammenhengene mellom vannkvalitet, mikrobiomer i RAS-miljøet og laksens helse vil kunne bidra til optimaliserte driftsbetingelser, og dermed bedre forhold for fisk og reduserte kostnader for oppdretterne. I denne artikkelen vil vi presentere resultater om effekter av to forskjellige partikkelbelastninger i RAS, fra det FHF-finansierte forskningsprosjektet MikroRAS.

Ole-Kristian Hess-Erga, Paulo M. Fernandes, Sara Calabrese, Simen Fredriksen, Håkon Dahle, Mark Powell, Irene Roalkvam, Melanie Andrews, Paula Rojas-Tirado, Endre Steigum, Ludvik Wolfgang Forbord Fiksdal, Leif Refsnes Bø, Stian Ringbakken Stenhaug, Ingrid Bakke.

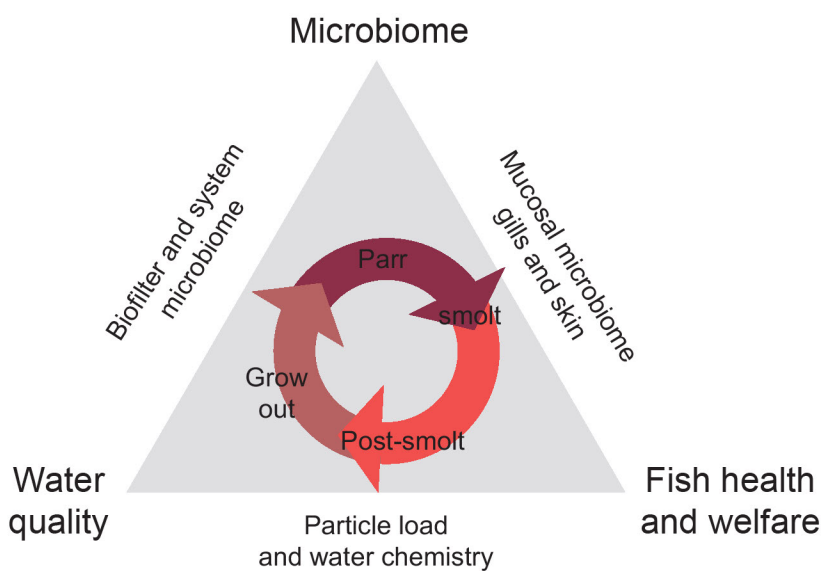
Ole-Kristian.Hess-Erga@niva.no

Bakgrunn

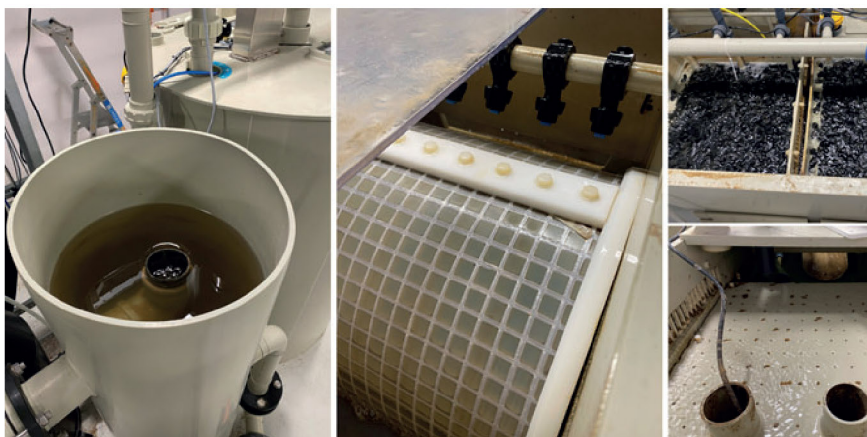
I RAS resirkuleres vann og vannrensing er nødvendig for å fjerne avfallsprodukter som organisk materiale fra fôr og feces, ammonium fra nedbryting av protein og CO₂ fra fisk og bakteriers respirasjon. Ammonium omdannes til den mindre giftige forbindelsen nitrat, via nitritt, ved hjelp av nitrifiserende bakterier i biofiltere. Hvordan disse og de øvrige mikrobe-samfunnene (mikrobiomer) påvirkes av driftsbetingelsene i RAS, er dårlig forstått. For eksempel kan økt organisk belastning medføre utfordringer knyttet til oppblomstring av heterotrofe bakterier i vannet og biofilmen (Guerdat et al. 2011). I tillegg finnes det bakteriesamfunn, eller mikrobiomer, suspendert i vannet og i biofilm på kar- og rørvegger, samt i fiskens slimhinner. Mikrobiomene formes av de fysiske og kjemiske omgivelsene, men påvirker samtidig den

kjemiske vannkvaliteten og fiskens helse (Blancheton et al. 2013). Et RAS-anlegg kan derfor sees som et komplekst mikrobielt økosystem (Vadstein et al. 2018), men hvordan disse mikrobiomene interagerer med hverandre er dårlig forstått.

Produksjon av laksesmolt og storsmolt i RAS har blitt en vanlig driftsform som kan ha gunstige effekter også i sjøfasen, men også gi nye utfordringer (f.eks. Ytrestøyl et al. 2018, Tørud et al. 2019, Remen et al. 2020). De komplekse fysiologiske og anatomiske endringene som oppstår under smoltifisering og tilpasningen til det marine miljøet er energikrevende prosesser, noe som gjør postsmolt mer følsom for stressfaktorer (Jarungsriapisit et al. 2016). Det er vist at både tarm- og skinn-mikrobiomene endrer seg hos laks etter utsetting i sjø (Dehler et al. 2017), men hvilken betydning dette har for fiskens slimhinnehelse er ikke kjent.



Figur 1. Sammenheng mellom laksens mikrobiom, fiskehelse/-velferd og vannkvalitet.



Figur 2. Vannbehandling i RAS; swirl separator (464 mm Ø), trommelfilter (40 µm), biofilter (0,58 m³ MBB, KSK saddle chips 1.0, 625 m²/m³, 65% fyllingsgrad), og CO₂-luffer.

Dette er MikroRAS-prosjektet

MikroRAS-prosjektet - Mikrobiota assosiert med atlantisk laks i overgangen fra ferskvann til sjøvann i RAS: effekt av høy/lav partikkelbelastning og konsekvenser for fiskevelferd og -helse er et samarbeid mellom NIVA, NTNU, UiB og RASLab. Prosjektet startet i 2021 og er finansiert av Fiskeri og havbruksnæringens Forskningsfinansiering (FHF). Les mer om prosjektet i FHF's prosjektbase: www.fhf.no/prosjekter/prosjektbasen/901735/ og på NIVAs prosjektside: www.niva.no/prosjekter/mikroras.

Ifølge teorier innen mikrobiell økologi kan plutselige endringer øke sannsynligheten for oppblomstring av opportunistiske og patogene bakterier (Rojas-Tirado et al. 2019), men om laksens mikrobiomer er involvert i sykdom etter overføring til sjø er ikke kjent.

Økt forståelse av sammenhengen mellom vannkvalitet, laksens mikrobiomer og dens velferd og helse (Figur 1) i smolt/postsmolt-RAS og påfølgende påvekst, er nødvendig for å kunne optimalisere driftsbetingelser og dermed på lengre sikt kunne bidra til vesentlige kostnadsbesparelser i form av bedre produksjon, lavere dødelighet, og mindre sykdom for enkeltoppdrettere og for næringen som helhet.

Forsøksoppsett

I forskningsprosjektet MikroRAS har vi fulgt utviklingen av mikrobiomene, fiskehelsen og biofilter-funksjonen i 6 identiske 2,5 m³ RAS-enheter ved lav og høy partikkelbelastning (3 replikate RAS for hver betingelse; Figur 2) gjennom fire måneder, først i ferskvann fulgt av en periode med smoltifisering i brakkvann. Den høye partikkelbelastningen tilsvarer en konsentrasjon som ofte sees i kommersielle anlegg. Dette ble oppnådd ved å reintrodusere spylevannet fra trommelfilteret og slammet som sedimenterte i swirl-separatoren. Lav partikkelbelastning ble oppnådd ved å la nevnte vannrenseutstyr fungere best mulig. Biofilter-media ble byttet ved overgangen til brakkvannsfasen. Ved slutten av RAS fasen simulerte vi transport (Figur 3), og



Figur 3. Klargjøring av kar for simulert transport og overførsel til sjø. Høy tetthet krever god utlufting og tilførsel av oksygen.



Figur 4. Sara Calabrese demonstrerer hvordan det tas prøver av fiskegjeller. Fra venstre Kamilla Furseth, Sara Calabrese, Andrea Knutsen, Thomas Alexander Bondevik og Simen Fredriksen.

fulgte fisken i tre ytterligere måneder i gjennomstrømmingstanker med sjøvann. I denne artikkelen vil vi presentere overordnede resultater fra RAS-fasen.

Resultat og diskusjon

Forsøket ble gjennomført iht. tidsplanen og uten dødelighet. Det ble tatt ut prøver av blod, skinn, gjelle og tarm fra 6 individer per enhet på 11 prøvetidspunkt (**Figur 4, 5 og 6**) til analyser av mikrobefunn og fiskehelse. I tillegg ble det tatt prøver av 5 biofilmbærere per RAS per prøvetidspunkt til kartlegging av mikrobiomer, samt vannkvalitetsprøver før og mellom alle prøveuttak av fisk (**Figur 7**). Lengde og vekt av all fisk ble registrert 5 ganger i forsøket for å kunne følge vekstindikatorer på individbasis i de ulike fasene i eksperimentet. All prøvetatt fisk ble også vurdert med hensyn på eksterne velferdsindikatorer, kardiosomatisk-, hepato-somatisk- og gonadosomatisk indeks.

Masteroppgaver

Ludvik Wolfgang Forbord Fiksdal 2023. *Comparative Assessment of Water Quality and Biofilter Performance in Recirculating Aquaculture Systems (RAS) Exposed to High and Low Particle Loading*. Masteroppgave UiB, <https://bora.uib.no/bora-xmlui/handle/11250/3074609>.

Leif Refsnes Bø 2023. *The effect of high and low particle load on smoltification of Atlantic Salmon (Salmo salar) in RAS*. Masteroppgave UiB, <https://bora.uib.no/bora-xmlui/handle/11250/3108575>

Stian Ringbakken Stenhaug 2023. *The effect of organic load on the rearing water and biofilter biofilm microbiota across the freshwater and brackish water phases in RAS with Atlantic salmon (Salmo salar)*. Masteroppgave NTNU, <https://ntnuopen.ntnu.no/ntnu-xmlui/handle/11250/3096231>.



Figur 5. Prøvetaking av fisk på RASLab. Fra forgrunnen Ingrid Bakke, Mark Powell, Leif Refsnes Bø, Kamilla Furseth, Sara Calabrese, Ole-Kristian Hess-Erga, Håkon Dahle og Melanie Andrews.

Siden hovedmålet med prosjektet og forsøkene er å fremskaffe økt kunnskap om sammenhengene mellom laksens mikrobiomer, produksjonsmiljø, vannkvalitet og fiskehelse/-velferd, ble det etterstrebet tilsvarende betingelser som i industrien. I RAS-fasen ble det valgt en partikkelbelastning (**Figur 8**) som tilsvarer forhold som finnes i industrien (høy TSS, 7-8 mg/l) og forhold som kanskje flere ønsker å oppnå (lav TSS, 1-2 mg/l). RAS-enhetene ble driftet med $55,9 \pm 1,8$ l/min (hele systemvolumet sirkulerer 1,34 ganger per time), tilsvarende spedevannsforbruk og føring (**Figur 9**), $12,3 \pm 0,8$ °C, oksygenmetning $93,0 \pm 5,6$ %, pH 7,2-8,2 (FV) og 7,0-8,1 (BV) og en saltholdighet på $1,4 \pm 0,1$ (FV) og $14,5 \pm 1,0$ (BV).

Partikkelbelastningen i RAS-enheten med høy TSS var gjennomsnittlig 6,77 mg/l TSS i ferskvannssystemene og 7,31 mg/l TSS i brakkvannssystemene. Tilsvarende tall for systemene med lav TSS var henholdsvis 1,13 og 2,06 mg/l TSS. Konsentrasjonen av TSS varierte relativt mye mellom høy TSS-systemene og i løpet av perioden, men steg mot slutten av hver fase da systemene ble utfordret litt ekstra (**Figur 10**). Vannet i systemene med høy partikkelbelastning hadde høyere andel av større partikler og naturlig nok noe høyere turbiditet og totalt organisk karbon (TOC), enn systemene med lav partikkelbelastning. Den høye partikkelbelastningen førte også til noe redusert biofilterfunksjon (**Figur 11 a, b og c**), med litt høyere konsentrasjon av totalt ammonium nitrogen (TAN) og nitritt (NO_2), samt lavere nitrat (NO_3). Mot slutten av både ferskvannsfasen og brakkvannsfasen minket konsentrasjonen av nitrat, sannsynligvis på grunn av økt spedevannsforbruk.

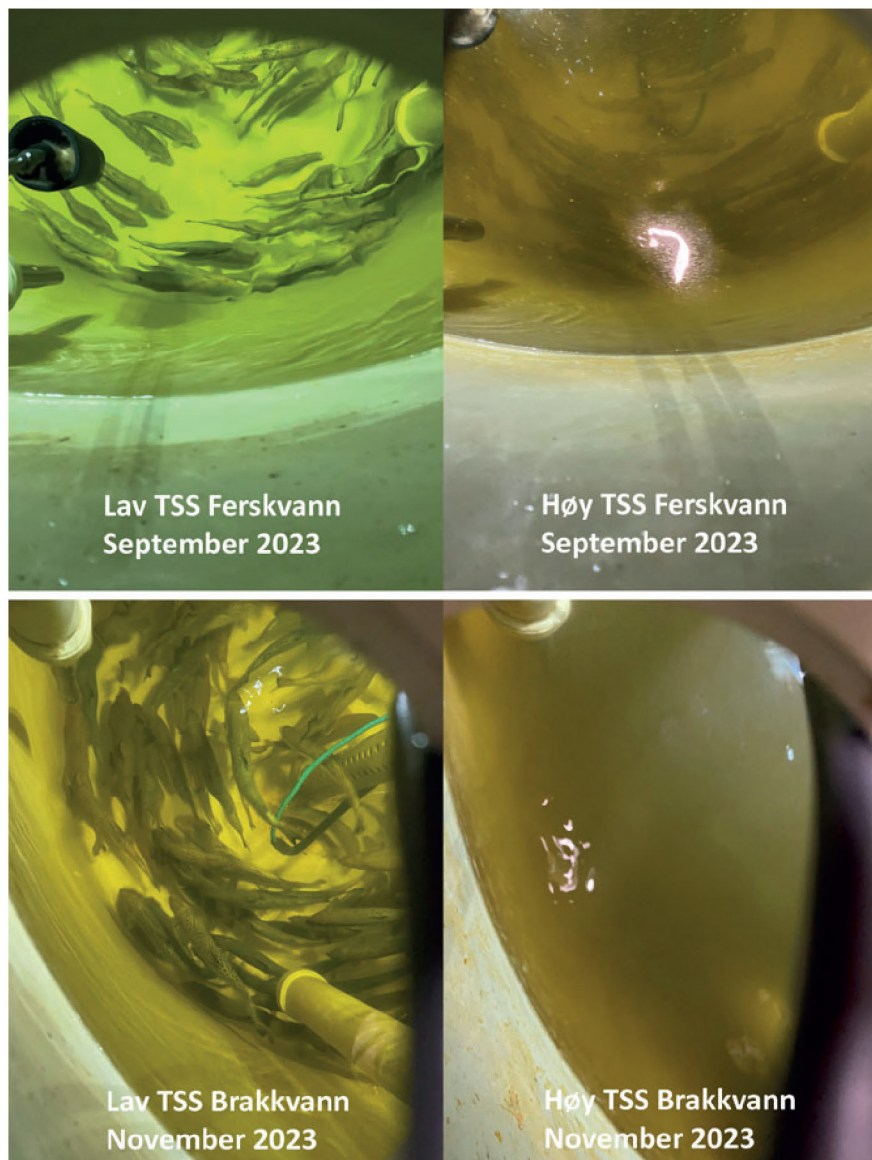
Konsentrasjonen av ammonium var som nevnt noe høyere i RAS med høy partikkelbelastning (**Figur 11a**), og dette var trolig på grunn av endringer i mikrobefolkningen i biofiltrene. Telling av bakterier i vannet ved hjelp av flow cytometer (FCM) viste at RAS med høy partikkelbelastning hadde høyere konsentrasjon av bakterier i vannet, særlig etter overgangen til brakkvann da bakteriekonsentrasjonen økte i alle systemene. I brakkvannsfasen var sammensetningen av det bakterielle samfunnet i biofilteret også påvirket av partikkelbelastningen (**Figur 12**).



Figur 6. Prøvetaking av fisk på RASLab. Fra venstre Helga Øen Åsnes, Leif Refsnes Bø, Kamilla Furseth, Sara Calabrese og Melanie Andrews.



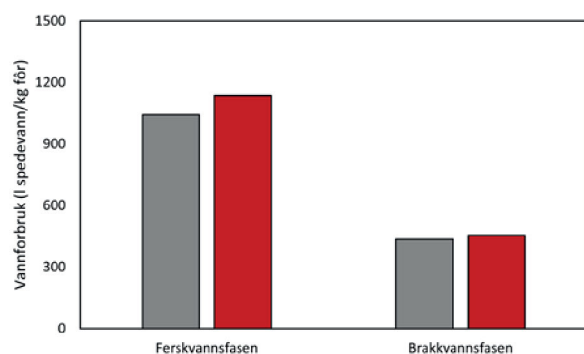
Figur 7. Vannprøvetaking på RASLab. I forgrunnen Ludvik Wolfgang Forbord Fiksdal, i bakgrunnen fra venstre Endre Steigum og Paulo M. Fernandes.



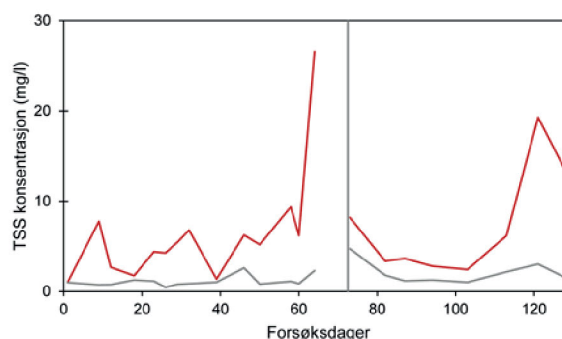
Figur 8. Sikt i vannet ved lav og høy TSS, i ferskvann (øverst) og i brakkvann (nederst).

Foreløpige analyser av biofilmmikrobiomene i biofilterne fra brakkvanns-RAS med høy partikkelbelastning indikerer økt forekomst av heterotrofe bakterier i familiene *Rhodobacteraceae* og *Flavobacteriaceae*. Biofilm-mikrobiomene i ferskvannsfasen var imidlertid lite påvirket av partikkelbelastningen. Analysen av mikrobiomene i skinn og gjeller pågår, og resultatene vil forhåpentligvis avsløre flere sammenhenger mellom vannkvalitet, laksens mikrobiom og fiskehelse/-velferd.

Fiskene i RAS med både høy og lav partikkelbelastning viste normal smoltutvikling, men noe forsinket smoltfiseringsstart i RAS med høy partikkelbelastning, vist gjennom signifikant lavere genuttrykk av sjøvanns-formen av $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ (en ionepumpe som sørger for riktig ionebalanse i fisken i forhold til saliniteten i vannet). Na^+ og Cl^- ionene i blodet var innenfor normalen i begge gruppene, men var mer stabil i RAS med lav partikkelbelastning. Dette kan indikere at partikkelbelastning påvirker ionebalansen. Høy partikkelbelastning førte til redusert fiskevekst (SGR 1,18 ift. 1,23) og høyere FCR (1,36 ift. 1,09) i smoltfiseringsperioden og i brakkvannsfasen, hvor fisken i RAS med lav partikkelbelastning hadde signifikant høyere gjennomsnittsvekt ved RAS-fasens slutt.



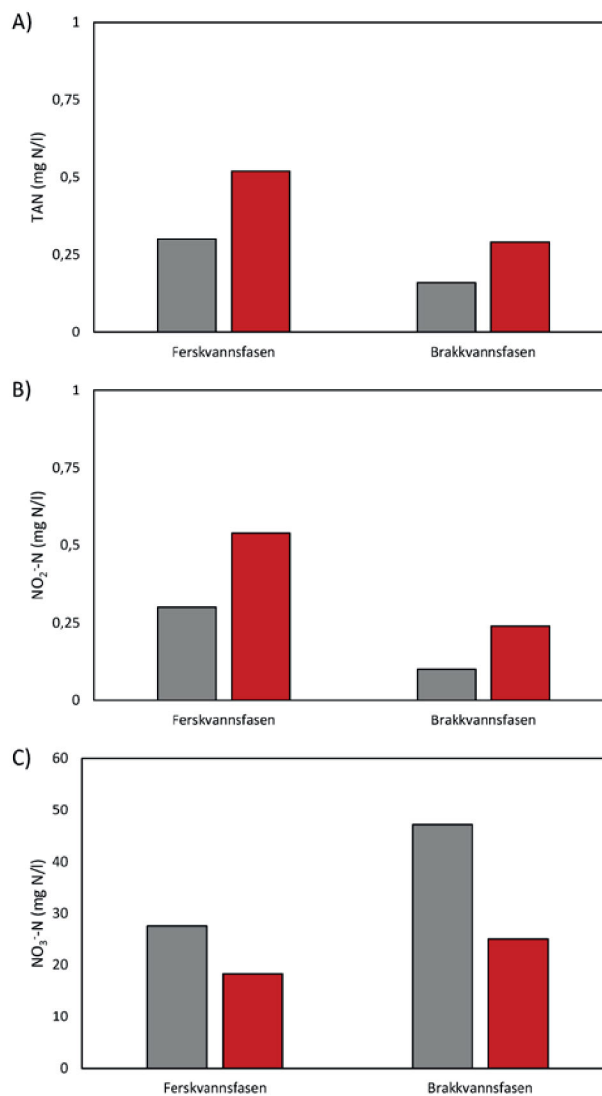
Figur 9. Gjennomsnittlig spede vannsforbruk per kg fôr i RAS med lav (blå søyle) og høy TSS (rød søyle) i ferskvannsfasen og brakkvannsfasen.



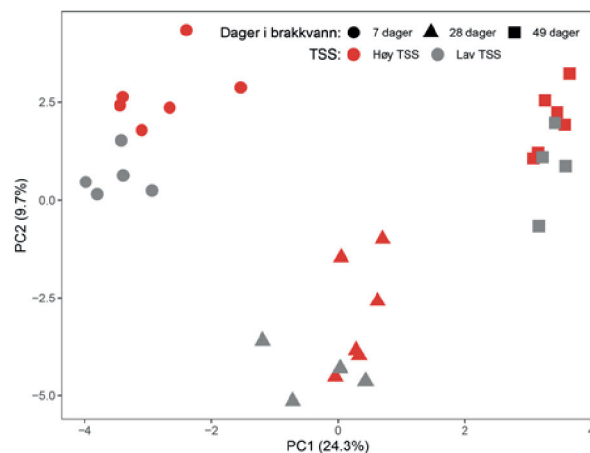
Figur 10. TSS konsentrasjon i RAS med lav (blå linje) og høy TSS (rød linje) i ferskvannsfasen og brakkvannsfasen. Den svarte vertikale streken indikerer overgangen fra ferskvann til brakkvann.

Referanser

- Blancheton, J.P., Attramadal, K.J.K., Michaud, L., d'Orbcastel, E.R., Vadstein, O., 2013. *Insight into bacterial population in aquaculture systems and its implication*. Aquac. Eng. 53, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2012.11.009>.
- Dehler, C.E., Secomber, C.J., Martin, S.A.M. 2017. *Environmental and physiological factors shape the gut microbiota of Atlantic salmon parr (salmo salar L.)*. Aquaculture 467: 149-157.
- Guerdat, T.C., Losordo, T.M., Classen, J.J., Osborne, J.A., DeLong, D., 2011. *Evaluating the effects of organic carbon on biological filtration performance in a large scale recirculating aquaculture system*. Aquac. Eng. 44 (1), 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2010.10.002>.
- Jarungsriapisit, J., Moore, L.J., Taranger, G.L., Nilsen, T.O., Morton, H.C., Fiksdal, I.U., Stefansson, S., Fjelldal, P.G., Evensen, Ø. and Patel, S. 2016. *Atlantic salmon (Salmo salar L.) post-smolts challenged two or nine weeks after seawater-transfer show differences in their susceptibility to salmonid alphavirus subtype 3 (SAV3)*. Virology Journal 13(1): 66.
- Remen, M., Bloch-Hansen, K., Sørflaten, J., Skjåvik, H., Hårstad, H., Robertsen, C., 2020. *Er postsmolt fra RAS en hardhaus?* TEKSET konferansen 2020, Clarion Hotel & Congress, Trondheim 12.02.20.
- Rojas-Tirado, P., Pedersen, P.B., Pedersen, L-F. 2019. *Microbial dynamics in RAS water: Effects of adding acetate as a biodegradable carbon-source*. Aquaculture Engineering 84: 106-116.
- Tørud, B., Jensen, B.B., Gåsnes, S., Grønbech, S., Gismervik, K. 2019. *Dyrevelferd i settefiskproduksjonen – SMÅFISKVEL*. Veterinærinstituttet, Rapport 14-2019.
- Vadstein O, Attramadal KJK, Bakke I et al. 2018. *K-Selection as microbial community management Strategy: A method for improved viability of larvae in aquaculture*. Frontiers in Microbiology 2018; 9:2730.
- Ytrestøyl, T., Bæverfjord, G., Kolarevic J., Solheim, M., Hjelle, E., Mørkøre, T., Brunsvik, P., 2018. *Hva betyr produksjonsstrategier for ytelse, helse og velferd i sjøfasen (BENCHMARK)*. Rapport 38/2018.



Figur 11. Gjennomsnittlig a) ammonium-, b) nitritt- og c) nitrat-konsentrasjon i RAS med lav (blå søyle) og høy TSS (rød søyle) i ferskvannsfasen og brakkvannsfasen.



Figur 12. Forskjellen i biofilmmikrobiomene i biofilterne, visualisert ved med "principal component analysis" (PCA). Mikrobiomene utviklet seg over tid, men systemene med høy og lav TSS forble forskjellige gjennom hele brakkvannsfasen.