

Overvåking av bakteriesamfunn i settefiskproduksjon

Fiskehelsen påvirkes direkte av den biologiske vannkvaliteten i landbaserte anlegg. Det er derfor avgjørende å ha god nok informasjon om sammensetningen av bakteriesamfunnene som bor der. SINTEF-prosjektet MonMic har nettopp gjennomført en overvåking i fem RAS-anlegg.

Av: Stine Wiborg Dahle, Deni Ribicic, Gunhild Hageskal, Anna Lewin og Roman Netzer (SINTEF)
Stine.w.dahle@sintef.no

Vi vet lite om bakteriesamfunnene i resirkuleringssystemer (RAS), og de er sannsynligvis forskjellige fra anlegg til anlegg. I kommersiell drift er det derfor viktig å innhente informasjon over tid. I SINTEF-prosjektet MonMic er det gjort en kvalitativ overvåking av bakteriesammensetningen i fem RAS-anlegg over 15 måneder for å få økt kunnskap om mikrobiota i settefiskanlegg for smolt. Dette er første gang mikrobiell vannkvalitet er målt med moderne analyseverktøy med hyppig prøvetaking sammenhengende over lang tid. Prosjektet gir økt kunnskap om bakteriedynamikken i RAS-anlegg, noe som kan danne grunnlag for å utvikle strategier for å kontrollere denne faktoren i lukkede anlegg i framtida.

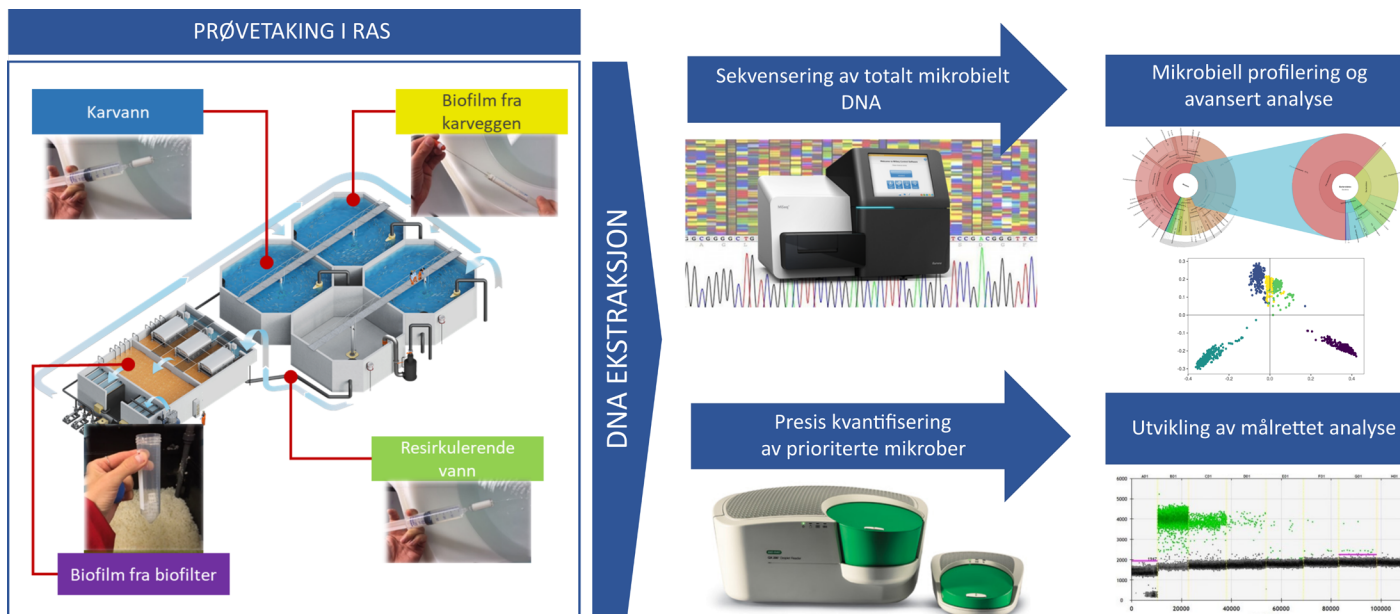
Produksjonsvekst øker behovet for kontroll av biologisk vannkvalitet

Mikroorganismer spiller en veldig viktig rolle for fiskehelsen, både i naturen og i oppdrettsanlegg. I landbaserte oppdrettsanlegg oppholder fisken seg i et lukket system. Sammensetningen av bakteriesamfunnet i anlegget er derfor svært viktig for den biologiske vannkvaliteten, ettersom det påvirker fiskehelsen direkte. En stadig økende produksjon i lukkede anlegg øker

behovet for kontroll av mikrobiota i vannet, og gode risikovurderinger blir derfor enda mer viktig. Overvåking av bakteriesamfunn i oppdrettsanlegg skjer i dag hovedsakelig ved utbrudd av sykdom. Diagnostiseringen skjer derfor lenge etter at sykdommen har skapt store problemer i anlegget. Metodene som benyttes gir også ofte tvetydige svar. I mange tilfeller er sammensetningen av bakteriearter mye viktigere for oppdrettssuksessen enn det absolutte antallet bakterier som er i fisketankene. Det vil være en stor fordel for oppdretterne dersom negative endringer i bakteriesamfunnet i anlegget registreres så tidlig som mulig. Da vil man i god tid kunne sette inn tiltak for å snu en negativ utvikling før fisken belastes, i forbindelse med planlegging av driftsoperasjoner hvor fisken kan bli utsatt for stress som igjen kan øke sårbarheten for infeksjon og sykdom.

MonMic-prosjektet overvåker bakteriesamfunn i kommersielle anlegg

Siden vi har begrenset kunnskap om bakteriesamfunnene som finnes i RAS er det viktig å skaffe denne informasjonen over tid ved normal og god drift. Det FHF-finansierte SINTEF-prosjektet MonMic fokuserer på kvalitativ overvåking av bakteriesammensetning i RAS for å få



Figur 1: MonMic-prosjektet har fulgt mikrobiotaen i vann og biofilm i fem kommersielle smoltanlegg i 15 måneder. Figuren viser hvor prøvene ble tatt i RAS-anleggene og hvilke analyser som er benyttet i prosjektet. Bilde av RAS-anlegg lånt av Scale AQ med tillatelse.

kunnskap om mikrobiota i settefiskanlegg under normal drift. Prosjektidéen kom som et resultat av et behov hos næringa for å forstå mer om denne elementære parameteren. Prosjektet har fulgt mikrobiotaen i vann og biofilm i fem kommersielle smoltanlegg i 15 måneder (Figur 1).

Det som er unikt med dette prosjektet er at mikrobiell vannkvalitet for første gang har blitt systematisk analysert med moderne

genteknologiske analyseverktøy, med hyppig prøvetaking sammenhengende over en lengre periode. Bakteriearter og -grupper som antas å være viktige i drift overvåkes, og endringer av bakteriesammensetning ble korrelert med kjemisk vannkvalitet. Samtidig brukes informasjonen til å utvikle verktøy for å kunne forutsi hendelser forårsaket av patogene bakterier.

Bakteriesamfunn i ulike RAS-anlegg

Resultatene fra MonMic-prosjektet viser at alle de fem anleggene i prosjektet hadde en egen unik mikrobiotaprofil, illustrert i **Figur 2**. Selv om alle anleggene filtrerer og desinfiserer inntaksvannet etter forskriften (FOR-1997-02-20-192), og så å si benytter samme fôr og rogn, utvikles mikrobiotaen inne i anlegget forskjellig. Dette har sannsynligvis sammenheng med ulik drift og design av RAS-anlegget. I dag er det ingen som produserer smolt på samme måte. Noen har desinfeksjon i resirkulerings-sløyfa, andre ikke. Det er ulik oppholdstid av vannet i tank, ulik salinitet, temperatur og produksjonsmetoder. Alt dette påvirker bakteriesammensetningen inne i anlegget. I tillegg fører også den lange oppholdstida av vannet i RAS-systemet (flere dager), til et seleksjonspress som danner en "hus-flora". Dette betyr også, som forventet, at vi ikke kan anbefale en generell liste med bakteriearter en bør ha i anlegget, men at det kanskje er viktigere å følge med på endringene i forhold til baseprofilen i hvert enkelt anlegg. Vi ser også at det er en viss sammenheng mellom lokalisasjon og mikrobiotaprofil.

Anleggene i midtre del av Norge har en mer lik profil enn anlegget i nord og i sør (**Figur 2**).

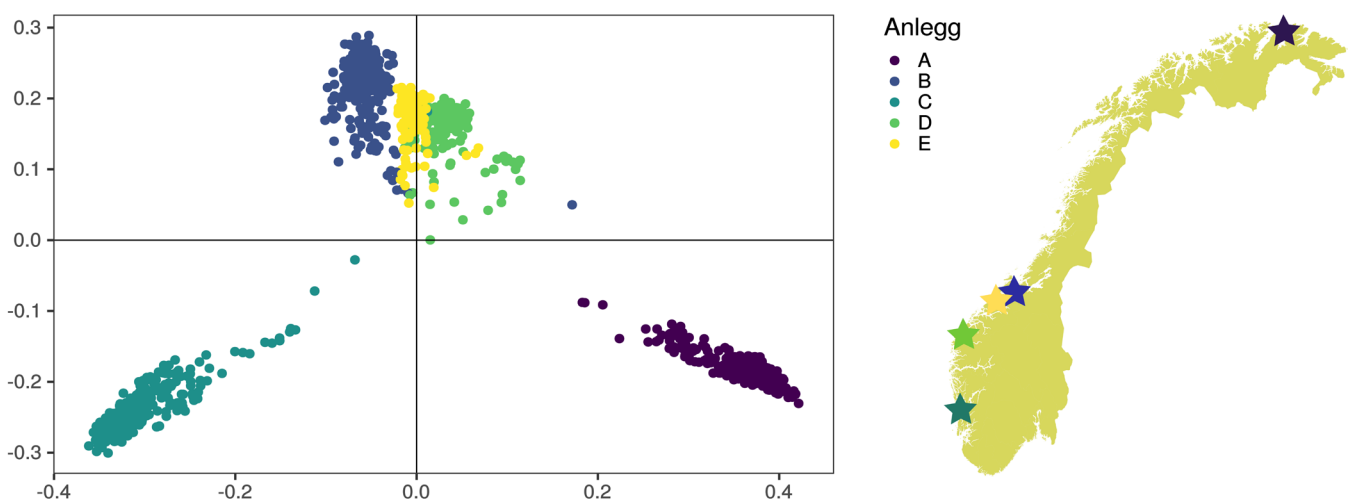
Biofilter har høy stabilitet

Diversitet i biofilter kan være et mål på hvor mange ulike bakteriearter som er til stede og kan si noe om hvilke typer bakterier samfunnet består av og hvor stabilt det er. Dette kan indikere en stabil og god sammensetning av bakterier. Ikke uventet hadde biofilter høyest diversitet i alle anleggene og var også prøvpunktet som hadde mest stabil mikrobiotasammensetning over tid. Biofilter i RAS har en stor overflate med mange bakterier som konkurrerer om næring. Dette miljøet er ufordelaktig for opportunistiske bakterier, som man ikke ønsker å ha i anlegget. Når bakteriene i biofilteret konsumerer det organiske materialet blir det mindre tilgjengelig næring igjen i vannet, og dermed grunnlag for færre bakterier i fiskekaret. Biofilteret motvirker derfor ukontrollert gjenvækst av bakterier, reduserer andelen opportunister og øker diversiteten og stabiliteten i bakteriesammensetningen i vannet. Lavest diversitet hadde biofilm på tankvegg. Denne biofilmen blir, i

motsetning til biofilteret, vasket bort jevnlig ved flytting av fisk inn og ut av tank. Det er derfor ikke uventet at denne har lavere diversitet og er mer ustabil over tid. Vasking og desinfeksjon av biofilm i tank kan selekere for oppvekst av opportunistiske bakterier, og disse beskyttes godt i biofilmen og kan frigjøres ut i vannet. Anlegget som flytter fisk oftest og dermed vasker og fjerner biofilm oftere enn de andre anleggene hadde lavere diversitet i biofilm fra tank, enn de andre anleggene. Ikke uventet ble det funnet at biofilm i biofilter og på karvegg var forskjellig fra hverandre, og består av en ulik sammensetning av bakteriearter (**Figur 3**). Hos noen anlegg var denne forskjellen stor, hos andre mindre.

Bakterier i vann

Bakteriesammensetningen i vannet var forskjellig fra den i biofilm (**Figur 3**). Når vi sammenliknet bakteriesammensetningen i vannet fra fisketank og vannet fra resirkulerings-sløyfa, fant vi at disse var svært like (**Figur 3**). Dette kan forklares med den lave oppholdstida vannet har i fisketankene (ca. 20 minutter). Bakteriene rekker ikke å vokse i selve tanken før det går videre i resirkulerings-sløyfa og



Figur 2: Venstre: Grafisk fremstilling av mikrobiotaprofil for de fem ulike anleggene som ble overvåket over 15 måneder. Hvert punkt i grafen representerer en mikrobiotaprofil som dannes fra mikrobiota sammensetningen for hver prøve. Hvert anlegg har hver sin farge. Når to punkter overlapper betyr det at de har identisk sammensetning, er de langt fra hverandre har de forskjellig. Av figuren kan man se at prøver fra samme anlegg grupperer seg sammen og at dermed alle anleggene har sin egen unike mikrobiota. Vi ser også at tre av anleggene grupperer seg mer sammen enn de andre to anleggene. Høyre: lokalisasjon av de fem anleggene, samme fargekode som i graf til venstre.

dermed vil de samme bakterietypene være både i tankvannet og sløyfa. Ulike driftsprosedyrer ved anleggene endrer sammensetningen av bakteriene, og noen prosedyrer påvirker mer enn andre. Vi fant også store forskjeller hos anleggene i stabilitet av bakteriesamfunn. Noen anlegg har upåvirket bakteriesammensetning som følge av prosedyrer, mens bakteriesamfunn i andre anlegg blir mer påvirket. Hvilken betydning dette har for fiskehelsen er foreløpig ukjent, men ingen av anleggene hadde økt dødelighet i periodene med mer ustabil bakteriesammensetning.

Positive og negative bakterier

De fem RAS-anleggene som deltok i dette prosjektet, hadde alle lav dødelighet i produksjonen gjennom de 15 månedene prøveinnsamlingen pågikk. Alle hadde også en god produksjon med god vekst. Resultatene fra dette prosjektet er derfor under normal og god produksjon. Påvisning av patogene ble allikevel gjort med ddPCR-teknologi. Svært lave nivå av *Yersinia ruckeri* og *Flavobacterium psychrophilum* ble identifisert i tankvannet hos tre av anleggene, uten

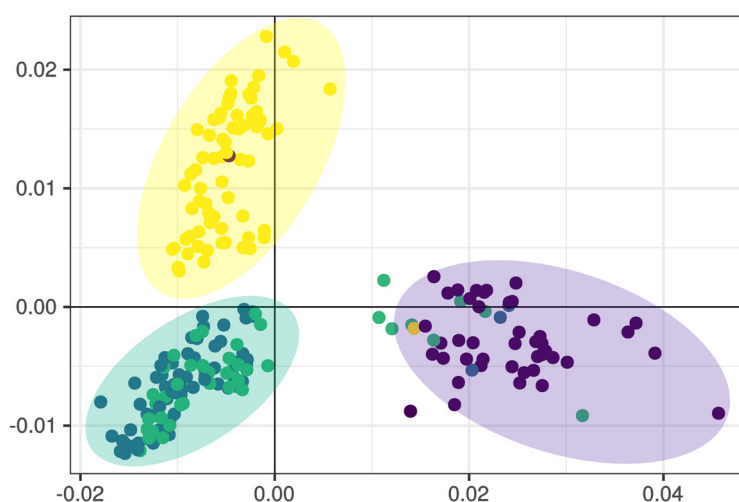
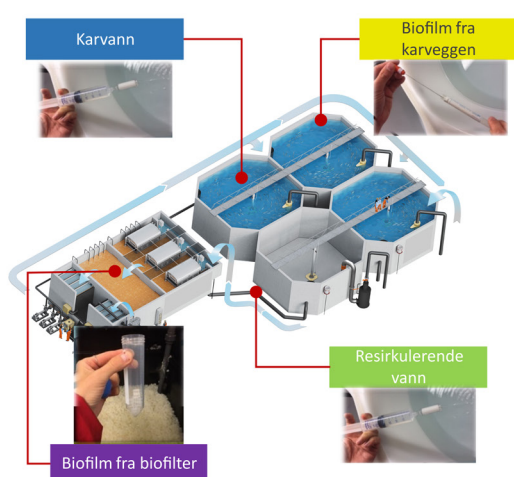
at det skapte problemer for fisken med tanke på dødelighet og vekst. Dette er bakteriearter som er kjent for å forårsake problemer for settefisk. Sannsynligvis var andre vannkvalitetsparametere gode i anlegget og stressnivået lavt, slik at nivåene av patogene bakterier var tolererbare for fisken. Potensielle probiotiske bakterier som kan ha positiv påvirkning på fiskehelsen ble detektert både i biofilm og vann hos alle anlegg. Nitrifiserende bakterier som omdanner skadelig ammonium til mindre skadelige nitrogenforbindelser som nitritt og nitrat fant man i både biofilm og vann. Ikke uventet hadde biofilteret høyest nivå av nitrifiserende bakterier hos alle anlegg.

Oppdage og varsle mulige problemer

MonMic-prosjektet har gjennomført en systematisk og grundig datainnsamling i mange anlegg over flere produksjonssykluser. Resultatene fra prosjektet gir derfor et godt grunnlag for å videre forstå dynamikken i mikrobiell vannkvalitet og for å kunne utvikle strategier som på sikt kan kontrollere denne faktoren i lukkede anlegg. Den utviklede modellen kunne klassifisere

prøvene etter hvilket anlegg de kom fra med 99 % nøyaktighet. For å utfordre modellen videre, trente vi den til å forutsi hvor i RAS-anlegget prøvene var tatt, i kar, biofilm eller biofilter. Igjen viste modellen 99 % nøyaktighet. Modellen kunne også forutsi om prøvene var tatt i fisketank med eller uten fisk (93 % nøyaktighet).

Kombinasjonen maskinlæring og mikrobiota viser seg å være et lovende verktøy for å forutsi hendelser i RAS i fremtida. Flere forsøk er nødvendig for å simulere ulike scenarier som kan være viktige for produksjon i RAS, som for eksempel sykdomsutbrudd og dårlig fiskehelse forårsaket av patogene bakterier og/eller H₂S kontaminering. På sikt kan disse modellene benyttes som et tidlig varslingsystem i fremtidige RAS-anlegg.



Figur 3. Mikrobiotaprofil til de ulike prøvene tatt hos et av anlegget i prosjektet. Hvert punkt i grafen representerer en mikrobiotaprofil som dannes fra den totale mikrobiota sammensetningen for hver prøve. Hvert prøvepunkt har hver sin farge. Når to punkter overlapper betyr det at de har identisk mikrobiota sammensetning, er de langt fra hverandre har de forskjellig sammensetning. Biofilm på tankvegg (gul), biofilm fra biofilter (lilla) og vann (grønn og blå) var ulike i sammensetning. Tankvann (blå) og vann i resirkuleringsløyfa (grønn) var derimot like. Bilde av RAS-anlegg lånt av Scale AQ med tillatelse.