

2020:00470 - Åpen

Rapport

Sluttrapport MonMic (FHF 901392)

Overvåking av bakteriesamfunn i settefiskproduksjon. En studie av fem RAS-anlegg.

Stine Wiborg Dahle, Roman Netzer, Anna Lewin, Gunhild Hageskal, Tone Haugen, Deni Ribicic



Rapport

Sluttrapport MonMic (FHF 901392)

Overvåking av bakteriesamfunn i settefiskproduksjon. En studie av fem RAS-anlegg.

RAPPORTNR	PROSJEKTNR	VERSJON	DATO
2020:00470	302002645	1	2020-06-29

EMNEORD:

RAS
Mikrobiota
Smolt
Vannkvalitet
Patogene
Biofilter
Maskinlæring

FORFATTER(E)

Stine Wiborg Dahle, Roman Netzer, Anna Lewin, Gunhild Hageskal, Tone Haugen, Deni Ribicic

OPPDRAKSGIVER(E)

FHF

OPPDRAKSGIVERS REF.

Sven Martin Jørgensen

ANTALL SIDER OG VEDLEGG:

75 + Vedlegg

GRADERING

Åpen

GRADERING DENNE SIDE

Åpen

ISBN

978-82-14-06535-0

SAMMENDRAG


I MonMic ble det gjennomført en overvåking av biologisk vannkvalitet i 5 RAS-anlegg over 15 mnd. For første gang mikrobiota har blitt systematisk overvåket med moderne analyseverktøy over lang tid, og prosjektet har gitt innsikt i mikrobefunn i RAS. Anleggene hadde alle en unik mikrobiota, sannsynligvis som et resultat av ulik drift/design og geografisk beliggenhet. Noen anlegg hadde en stabil mikrobiotasammensetning over tid, mens andre hadde mer variasjon. Parametere som påvirket de mikrobielle samfunnene mest var fôr-type, salinitet, temperatur, antall fisk i kar og alkalinitet. Biofilteret var prøvepunktet som var mest stabil over tid og hadde høyest diversitet. Det ble observert en viss sammenheng mellom plassering av desinfeksjon i sløyfa og diversitet i resirkulerende- og karvann. Alle anleggene hadde en god produksjon med lav dødelighet og det ser ut til at det er flere ulike normaltilstander av mikrobielle samfunn hos anleggene som fungerer bra. Dette betyr at man ikke kan anbefale en liste med bakteriearter, men at det er viktigere å følge med på endringene i baseprofilen i hvert anlegg. Det ble funnet lave nivåer av *Yersinia ruckeri* og *Flavobacterium psychrophilum*, ved ny molekylærbiologisk teknologi. Kombinasjonen mikrobiota og maskinlæring viser seg å være et lovende verktøy for å forutsi hendelser i RAS og ble for første gang benyttet i settefiskproduksjon. Flere forsøk er nødvendig for å simulere ulike scenarier, som f.eks. sykdomsutbrudd og H₂S kontaminering. I tillegg kan diversitet i biofilter/vann være gode indikatorer i produksjonen. På sikt kan disse modellene benyttes som et tidlig varslingsystem i fremtidige RAS-anlegg.

**UTARBEIDET AV**

Stine Wiborg Dahle

KONTROLLERT AV

Roman Netzer


Roman Netzer (Aug 9, 2020 20:33 GMT+2)

GODKJENT AV

Aleksander Handå



Innholdsfortegnelse

1	Sammendrag	4
2	Summary	4
3	Innledning	5
4	Problemstilling og formål	7
5	Prosjektgjennomføring	7
	Arbeidspakke 1: Kartlegging av oppdrettsanlegg og prøvetaking	8
	Arbeidspakke 2: Analyse av mikrobiota	10
	Arbeidspakke 3: Identifisering og kvantifisering av patogene mikroorganismer	12
	Arbeidspakke 4: Robotisering av prøve-preparering og DNA/RNA isolering.....	13
	Arbeidspakke 5: Evaluering, integrering og kommunikasjon av resultater	13
6	Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon	16
6.1	Etablering av "Standard Operating Procedures" (SOPer)	16
6.2	Anleggsinformasjon	16
6.3	Sammensetning av mikrobielle samfunn for alle anlegg	17
6.4	Mikrobiota fra de ulike prøvepunktene hos hvert anlegg	18
6.4.1	Anlegg A	19
6.4.2	Anlegg B	25
6.4.3	Anlegg C	30
6.4.4	Anlegg D	35
6.4.5	Anlegg E	40
6.4.6	Sammendrag mikrobiota sammensetning og dynamikk hos alle anlegg	45
6.5	Dødelighet.....	47
	Anlegg A	48
	Anlegg B	48
	Anlegg C	49
	Anlegg E.....	51
6.6	Data analyse – korrelasjon kjemiske parametere og mikrobiota	52
	Anlegg A	53
	Anlegg B	55
	Anlegg C	57
	Anlegg D	59
	Anlegg E.....	60
6.6.1	Oppsummering av ulike parameter og deres mulige påvirkning på de mikrobielle samfunnene	62

6.6.2	Maskinlæring som et tidlig varslingsystem	63
6.7	Patogene bakterier	63
6.8	Robotisering av DNA-isolering	66
7	Hovedfunn i prosjektet	68
8	Fremtidig arbeid og anbefalinger	69
9	Leveranser i prosjektet	70
10	Utdanning	71
11	Publisering og media	71
11.1	Vitenskapelig.....	71
11.2	Populærvitenskapelig.....	72
11.3	Konferanser.....	72
11.4	Media	72
12	Samarbeid.....	73
13	Referanser.....	74

BILAG/VEDLEGG

Kjemisk og fysisk vannkvalitet Anlegg A, B, C, D og E

1 Sammendrag

I MonMic ble det gjennomført en overvåking av biologisk vannkvalitet i 5 RAS-anlegg over 15 mnd. Dette er første gang mikrobiota har blitt systematisk overvåket med moderne analyseverktøy over lang tid, og prosjektet har gitt innsikt i mikrobefunn i RAS. De 5 anleggene hadde alle en unik mikrobiota, sannsynligvis som et resultat av ulike drift og design, samt geografisk beliggenhet. Noen anlegg hadde en stabil mikrobiotasammensetning over tid, mens andre hadde mer variasjon. Parametere som påvirket det mikrobielle samfunnene mest var fôr-type, salinitet, temperatur, antall fisk i karet og alkalinitet. Biofilteret var prøvepunktet som var mest stabil over tid og hadde høyest diversitet. Man så en viss sammenheng mellom plassering av desinfeksjon i sløyfa og diversitet i resirkulerende- og karvann. Anleggene hadde en god produksjon med lav dødelighet og det ser ut til at det er flere ulike normaltillstander av mikrobielle samfunn hos anleggene som fungerer bra. Dette betyr at man ikke kan anbefale en liste med bakteriearter en bør ha i anlegget, men at det er viktigere å følge med på endringene i baseprofilen i hvert anlegg. Det ble funnet lave nivåer av *Yersinia ruckeri* og *Flavobacterium psychrophilum*, ved hjelp av en ny molekylærbiologisk teknologi. Kombinasjonen mikrobiota og maskinlæring viser seg å være et lovende verktøy for å forutsi hendelser i RAS og ble for første gang benyttet i settefiskproduksjon. Flere forsøk er nødvendig for å simulere ulike scenarioer som kan være viktige, som f.eks. sykdomsutbrudd og H₂S kontaminering. I tillegg kan diversitet i både biofilter og vann være gode indikatorer for drift av anlegg. På sikt kan disse modellene benyttes som et tidlig varslingsystem i fremtidige RAS-anlegg.

2 Summary

Fish health is directly affected by biological water quality in the land-based recirculating aquaculture systems (RAS). However, the main drivers of water quality are microorganisms. It is therefore crucial to have knowledge about the composition of bacterial communities these plants have over time. In the MonMic project, monitoring of microbial communities was carried out in five RAS facilities over 15 months period. This is the first time the microbiota has been monitored with modern analysis tools for a long time, and the project has provided insights into microbial community composition and dynamics of five different RAS. The five facilities had a unique microbiota, probably as a result of different operations, designs and perhaps geographical origin. Some facilities had a stable microbiota composition over time, while others had more variable

communities. Parameters that affected most the microbial communities in all five RAS were feed type, salinity, temperature, number of fish in the tanks and alkalinity. In general, the biofilter was the most stable location within all RAS facilities over monitored time. The facilities had a good production with low mortality, yet low levels of *Yersinia ruckeri* and *Flavobacterium psychrophilum* were found using a new molecular method. The combination of microbiota composition and machine learning proves to be a promising tool for predicting events in RAS in the future and was used for the first time in hatcheries. Further experimental work is needed in order to make microbiota-based machine learning approaches more useful. This can be achieved by simulating different scenarios that may be important for production in RAS, such as disease outbreaks and / or H₂S contamination. In addition, diversity in both biofilter and water can be good indicators. In the long term, these models can be used as an early warning system in future RAS facilities.

3 Innledning

Sammensetning mikrobefunn i landbaserte anlegg

Mikroorganismer spiller en veldig viktig rolle for fiskehelsen i lukkede oppdrettsanlegg. Sammensetningen av bakteriesamfunnene i anlegget er derfor svært viktig for den biologiske vannkvaliteten, ettersom det påvirker fiskehelsen direkte. Noen typer bakterier bryter ned organisk materiale og bidrar til oksygenkonsum og avfallsproduksjon som forringer den fysiokjemiske vannkvaliteten, mens andre omdanner giftig ammoniakk til mindre giftig nitrat, og er en nødvendig del av vannrensinga i resirkuleringsystemer (RAS) (Martins et al. 2010). Mens noen mikrober kan beskytte fisk mot sykdom kan patogene bakterier og virus påvirke fiskehelsen negativt og gi økt dødelighet. Biofilter er en kritisk komponent i RAS. Biofilter i RAS har en stor overflate med mange bakterier og høy diversitet som konkurrerer om næring. Et slikt miljø 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, ved riktig drift, motvirker derfor ukontrollert gjenvækst av bakterier, reduserer andelen opportunister og øker diversiteten og stabiliteten av bakteriesammensetningen i vannet. I biofilteret finner man typisk nitrifiserende bakterier som skal sørge for å holde ammonium nivå (NH₃) under giftige konsentrasjoner (Blancheton et al. 2013). Det mikrobielle miljøet i RAS er komplekst og kan påvirkes av fôr og

fôringsregime, drift, fiskens mikroflora, spede vannet og seleksjonspress i biofilter og system (Blancheton et al. 2013). Stabile mikrobielle samfunn er også foreslått å fremme fiskehelse (De Schryver et al. 2014) samt at endringer i bakteriesamfunnet i vannet kan brukes som indikator for fiskehelsen (Attramadal et al. 2014). Overvåking av mikrobefunn i oppdrettsanlegg er derfor viktig for å sikre god produksjon (Blancheton et al. 2013, Bakke et al. 2017), samt for å skaffe mer kunnskap om de komplekse mikrobielle samfunnene i RAS for å oppnå bedre kontroll på vannkvaliteten. En stadig økende produksjon i lukkede anlegg øker behovet for kontroll av mikrobiota i vannet, og gode risikovurderinger blir derfor enda mer viktig. Per i dag vet man lite om normalsituasjonen og –variasjonen for mikrobefunn gjennom året i vanlig produksjon, siden arbeidet med å forstå mikrobiotaen i anleggene først og fremst har satt søkelys på sykdomsutbrudd. Mikrobefunn kan reagere raskt på endringer i miljøet ved å forandre artssammensetningen. Endringer i mikrobefunn kan gi bedre eller dårligere vilkår for fisken. Det er en mulighet for at detaljert informasjon om normaltilstanden og endringer i mikrobefunn kan brukes som lovende indikator for god drift og for tidlig varsling av problemer i lukkede oppdrettsanlegg. En forutsetning for å kunne vurdere og utnytte denne muligheten er et omfattende og systematisk oppbygd datagrunnlag. Sammensetning og dynamikk i mikrobefunn knyttet til problemperioder og ikke minst ved normal god produksjon har ikke blitt studert systematisk og detaljert hittil, men er avgjørende for kontrollert og god drift.

Karakterisering av mikrobefunn

De siste årene har det blitt stadig enklere og billigere å karakterisere artssammensetningen i mikrobefunn med DNA-sekvensering. Andre generasjons sekvenseringsteknologi gir detaljert kvalitativ informasjon om sammensetning av mikrobiota, samt om de relative andelene av artene i samfunnet. Sekvensering er kjent teknologi og brukes i forskningsprosjekter, men er ikke tidligere brukt til å overvåke normalmikrobiotaen over lengre tid og ved normal drift i flere kommersielle anlegg. PCR-metodene som brukes i dag for å screene for patogene mikroorganismer er mye påvirket av inhibitorer og bakgrunnsstøy i miljøprøver, og er også typisk avhengig av og måles opp mot en referanse. For å kunne bestemme absolutt antall spesifikke mikrober (f.eks. kjente patogener) nøyaktig, kan i stedet tredje generasjons digital PCR-teknologi (droplet digital PCR, ddPCR) brukes. I kombinasjon med mikrobefunnsstudier vil det også være mulig å identifisere nye problem- eller indikatorarter som har relevans for fiskehelsen. Moderne molekylærbiologiske

analysemetoder er tids-, ressurs- og kostnadsintensive. Standardiserte prosesser med "high-throughput" robotsystemer for automatisert DNA-isolering vil kunne øke reproduserbarheten og analysekapasiteten betraktelig.

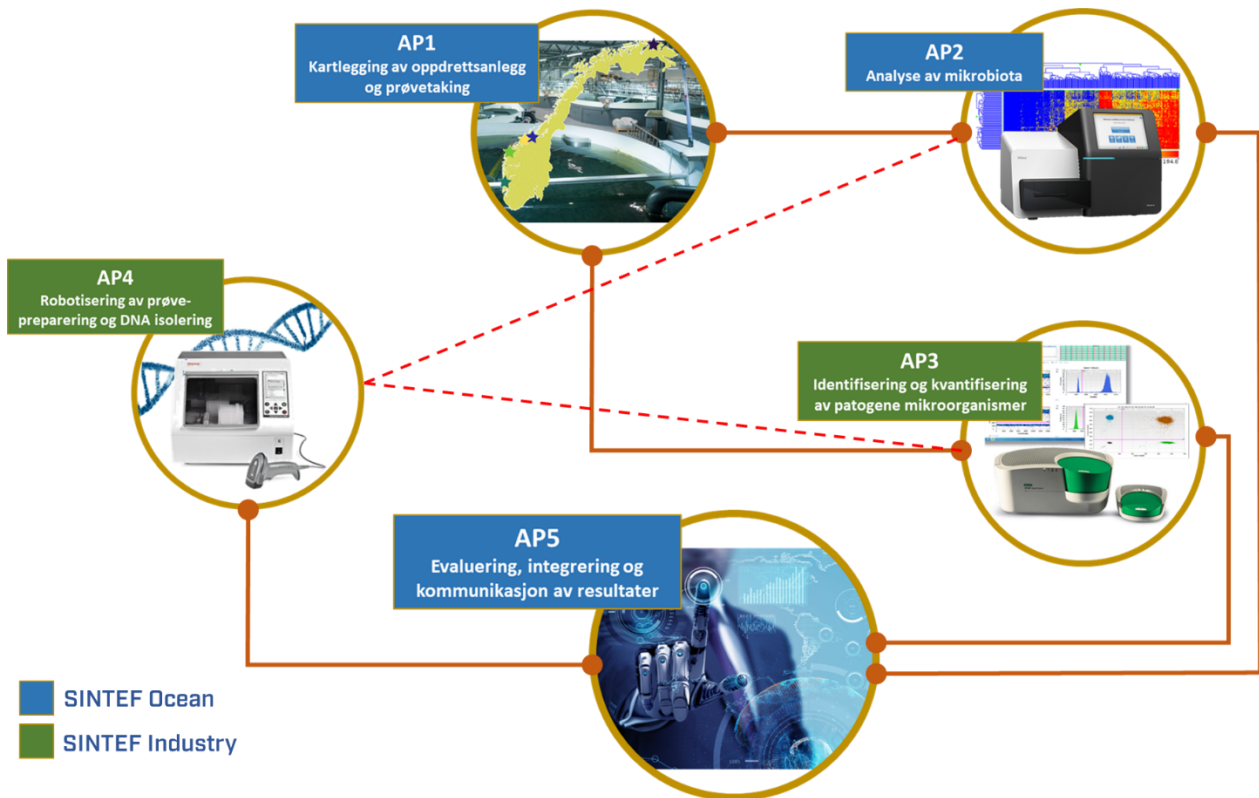
4 Problemstilling og formål

Formålet med prosjektet:

1. Skaffe kunnskap og informasjon om mikrobielle samfunn i landbaserte RAS-anlegg over tid
2. Etablering av Standard Operating Procedures (SOPer) for prøvetaking, transport og opparbeiding av prøver, standardisering av databehandling og framstilling, evaluering og rapportering av resultater.
3. Evaluere overføring av tidkrevende manuelle DNA-isoleringsprosedyrer til robotiserte systemer for å øke analysekapasitet (samtidig redusere kostnader) og reproduserbarhet
4. Utvikling av en metode for absolutt kvantifisering av utvalgte patogene mikrober som kan brukes i et overvåkingsprogram i anleggene.
5. Sammenstille mikrobefundet med anleggenes vannkvalitetsmålinger og dokumentasjon av hendelser, drift og fiskehelse i samme tidsrom på en systematisk måte.

5 Prosjektgjennomføring

Prosjektet var finansiert av FHF og de fem deltakende anleggene, og pågikk fra 2017 til 2020. Prosjektet var delt inn i fem ulike arbeidspakker (se Figur 1), med interaksjon mellom de ulike arbeidspakkene. Prosjektet ble ledet av SINTEF Ocean som hadde ansvar for tre arbeidspakker, SINTEF Industri hadde ansvar for to arbeidspakker. Deltakere fra SINTEF Ocean: Stine Wiborg Dahle, Roman Netzer, Marianne Aas og Deni Ribicic, SINTEF Industri: Gunhild Hageskal, Anna Lewin og Tone Haugen. Styringsgruppen besto av representanter fra hver av de fem anleggene.



Figur 1: Skjematisert oversikt over arbeidspakker i MonMic-prosjektet.

Arbeidspakke 1: Kartlegging av oppdrettsanlegg og prøvetaking

Hovedfokus i denne arbeidspakken var å etablere standardiserte prøvetakingsprotokoller (SOP) og deretter samle inn prøver fra alle de fem anleggene over 15 mnd. Det ble tatt ut prøver hver andre uke fra alle anlegg. De fem deltakende anleggene i MonMic var Lerøy AS (to anlegg), Mowi ASA (to anlegg) og Bremnes SeaShore AS, og lokalitetene ligger nord, midt og sør i Norge. Alle anleggene er store nasjonale produsenter av smolt. Tre av anleggene startet prøvetaking i november 2017, mens to anlegg startet prøvetaking i april 2018.



1.1 Utvikling og validering av SOPer for prøvetaking, transport og opparbeiding

Det ble utviklet detaljerte SOPer for prøvetaking, transport og opparbeiding av prøver. Disse er tilgjengelig som PDF samt video.

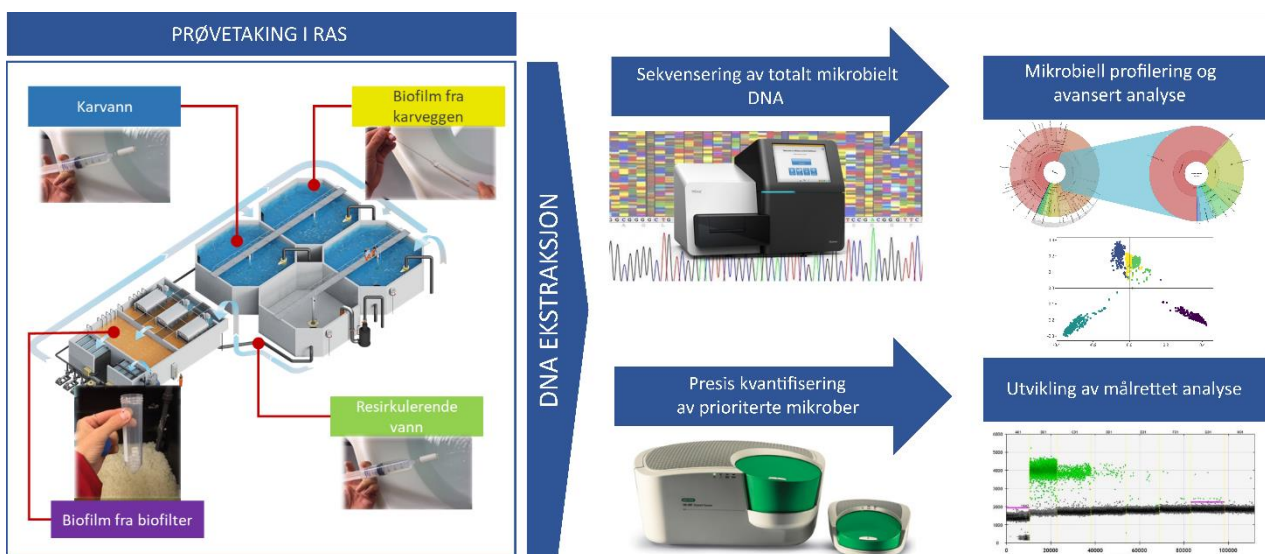
1.2 Innsamling av prøvemateriale

Prøver fra de deltagende anleggene ble samlet, lagret og systematisert for videre bruk i prosjektet.

Fra hver av de fem deltagende anleggene ble det tatt triplikate prøver fra følgende prøvepunkt:

1. Biofilm fra biofilter (biolegemer eller biofilm)
2. Biofilm fra karvegg (2 ulike fiskekar)
3. Vann fra fiskekar (2 ulike fiskekar)
4. Vann fra resirkuleringsløyfa

Figur 2 oppsummerer hvor disse prøvene ble tatt i RAS-anleggene.



Figur 2: Prøvetaking fra de ulike prøvelokasjonene og ulike analyser benyttet i prosjektet.

Vann (150-200 ml) ble filtrert ved hjelp av Sterivex-filter (Millipore) og tilhørende Omnifix® sprøyte. Biofilm fra karvegg ble tatt ut ved hjelp av swabs fra Copan. Biofilm fra biofilter ble tatt ut på to ulike måter, anlegg som hadde Moving Bed Biofilter (MBBF) plasserte biolegemer i eppendorfrør hvor biofilm ble isolert fra disse, mens anlegg med Fixed Bed Biofilter (FBBF) tok ut biofilmprøve fra biofilter ved hjelp av swabs.

Arbeidspakke 2: Analyse av mikrobiota

Hovedfokuset i denne arbeidspakken var å etablere en kvalitetssikret arbeidsflyt for analyse av mikrobefolkningen i anleggene. Innsamlet prøvemateriale (Arbeidspakke 1) ble brukt til isolering av total DNA for deretter 16S sekvensering hos CeBiTec (Tyskland). Resultatene ble bearbejdet med bioinformatiske verktøy og presentert i form av interaktive kakediagrammer (krona diagram) og multivariat analyseplot. I tillegg ble det benyttet maskinlæring for å finne sammenhenger mellom ulike vannkjemiske parametere/drift og mikrobiota.

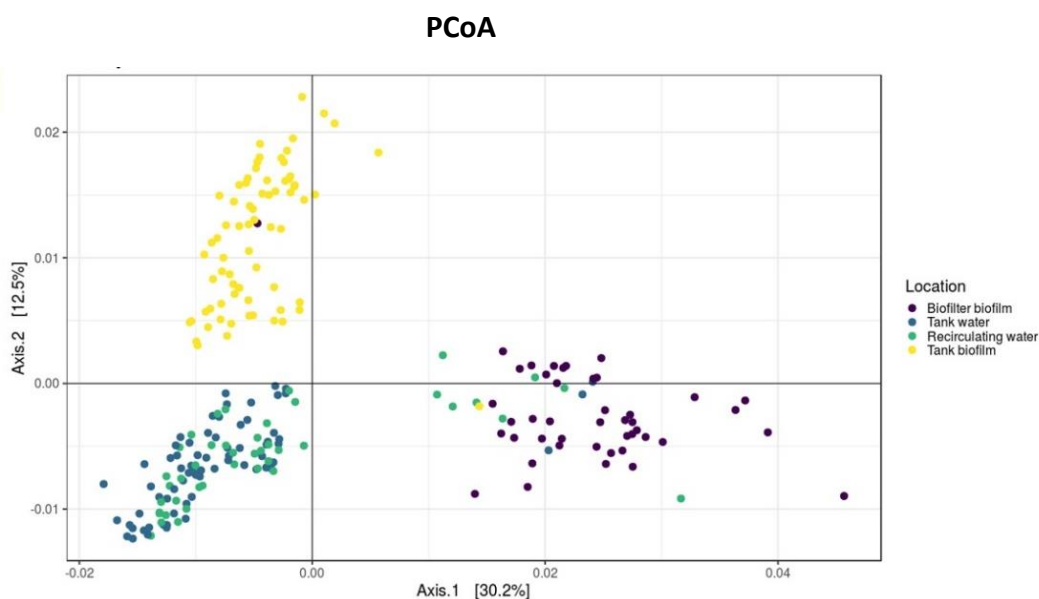
2.1 Analyse av mikrobielle samfunn

Innsamlede prøver ble transportert til SINTEFs laboratorier i isoporesker med kjøleelementer og lagret ved -80°C for videre analyse. DNA ekstraksjon ble utført med kit fra Zymo Research (Zymo Biomics DNA mini kit). Konsentrasjoner og kvalitet av ekstrahert DNA ble analysert med Qubit 3.0 og Nanodrop 1000 instrumenter (ThermoFisher Scientific) før dem ble sendt videre til CeBiTec ved Bielefeld University i Tyskland for opprettelse av 16S rRNA amplicon bibliotek og sekvensering. Bibliotek-tillaging ble utført etter standard Illumina prosedyrer. 16S rRNA gen sekvens ble amplifisert ved å benytte F (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3') and R (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3') primere som dekker V3-V4 16S rDNA regionen (Klindworth et al. 2013). Amplikoner ble videre sekvensert på Illumina MiSeq platform (2x300 basepar). Sekvensene ble behandlet med Microbial Ecology 2 (QIIME2) pipeline (Bolyen et al. 2019). Read frem og tilbake av hver prøve ble lastet inn i QIIME2. Kvalitetskontroll (basert på median Phred verdi >19), and "Amplicon Sequence Variants" (ASV) ble utført ved bruk av DADA2 algoritme (Callahan et al. 2016). DADA2 ble benyttet for å sammenstille komplimentære ASV for read frem og tilbake og tabeller inneholdende ASVer og tellinger ble dannet for hver prøve. I tillegg ble chimera sekvenser screenet og filtrert basert på DADA2 de novo

tilnærming. Representative sekvenser ble innregulert ved å bruke MAFFT (de novo multiple sequence aligner) (Kato et al. 2009), maskert (Lane 1991) og fylogenetisk tre ble generert med FastTree (Price et al. 2009). Til slutt ble taksonomiske tildelinger for hver av de representative sekvensene gjort med Silva Classifier (v.132). Statistiske analyser ble utført i R ved bruk av Phyloseq (McMurdie et al. 2013), microbiomeSeq (<https://github.com/umerijaz/microbiomeSeq>) og Vegan (Oksanen et al. 2010). Prøver med <5000 reads og grupper med 0 treff ble fjernet fra datasettet. Alpha-diversitet ble kalkulert og ANOVA-parvis sammenlikning ($p < 0.05$) mellom ulike anlegg og prøvepunkt ble utført ved bruk av plotanova_diversity funksjonen fra metagenomeSeq R. Analyse av Beta-diversitet ble utført med plot_ordination funksjonen fra Phyloseq R package (unweighted UniFrac dissimilarity index). Videre, statistikk med parvise adonis (pairwise.adonis2.R, <https://github.com/pmartinezarbizu/pairwiseAdonis/tree/master/pairwiseAdonis/R>) ble utført for å finne signifikans mellom anlegg og prøvepunkter.

2.2 Grafisk fremstilling

I rapporten er det benyttet mange **PCoA-plot** som er en grafisk fremstilling av mikrobiota sammensetning. Denne metoden visualiserer likheter og ulikheter mellom data. Hvert punkt i grafen representerer en mikrobiotaprofil som dannes fra mikrobiota sammensetningen for hver prøve. Når to punkter overlapper hverandre indikerer det at de har en identisk sammensetning av mikrobiota, er de langt fra hverandre indikerer det at de har forskjellig sammensetning.



2.3 Maskinlæring (ML)

Maskinlæring utvikler algoritmer som gjør datamaskiner i stand å lære fra og utvikle atferd basert på empiriske data. Et hovedfokus er å automatisk lære gjenkjenning av komplekse mønstre og gjøre intelligente beslutninger basert på store datasett. Dette gjorde de store dataene fra MonMic velegnet for et slikt formål. En vanlig strategi er å sekvensere bare markørgener (e.g. 16S rRNA) og slutte klassifisering basert på varierende deler av et sekvensert gen. Analysene resulterer deretter i "operational taxonomic units" (OTUs) eller "amplicon sequence variants" (ASVs), avhengig av tilnærmingen. Vanligvis blir disse gruppert med en sekvenslikhet på >97%. Dette resulterer i OTU tabeller som indikerer antall OTUer i hver prøve og dette er et vanlig utgangspunkt for maskinlæring. For flere detaljer om metode se Ribicic et al. in prep; Dahle et al in prep.

Arbeidspakke 3: Identifisering og kvantifisering av patogene mikroorganismer

Per i dag er det et begrenset antall kjente patogene bakterier og virus som påvirker fiskehelsen negativt i et oppdrettsanlegg. Droplet digital PCR (ddPCR), som representerer nyeste generasjon av PCR teknologi, gir en absolutt kvantifisering av et gen, og er veldig følsom, med kapasitet til å måle ned mot 7 gen-kopier per mL prøve. Antall gen-kopier kan brukes for nøyaktig kvantifisering av tilsvarende mikrober på artsnivå og denne teknologien har derfor stort potensiale for å brukes til tidlig varsling for økt mengde av utvalgte mikroorganismer. Ved sammenligning med RT-PCR så har ddPCR-metodikk brukt på vannprøver vist seg å være en både raskere og mer kostnadseffektiv (ca. 50 % total kostnad) metode. Denne teknologien må tilpasses formål og prøvemateriale for å detektere relevante arter. Når metodikken er etablert vil det være mulig å bestemme konkrete antall av utpekte bakteriearter i løpet av 3 arbeidsdager etter mottak av prøve. I et lengre perspektiv er det et mål å bruke molekylærbiologiske metoder til å utvikle såkalte "Dip-Slide test kits" for enkle risikoanalyser "on-site".

3.1 Identifisere de viktigste patogene mikrobenene

En liste over de mest aktuelle patogene mikrobenene i oppdrettsanlegg i Norge ble laget basert på litteratur og i samarbeid med deltagende anlegg. Det vil bli gjort en inndeling og prioritering av patogenenes viktighet og nytten ved overvåkning og tidlig varsling.

3.2 Uttesting av potensialet ved å bruke ddPCR for tidlig varsling av utvalgte patogene bakterier

Prøvematerialet fra arbeidspakke 1 vil bli brukt til isolering av DNA. Sammen med de allerede isolerte DNA-prøvene i 2.1 vil dette bli brukt til deteksjon og absolutt kvantifisering av utvalgte mikrober, som bedømmes som de mest problematiske patogene organismene i oppdrettsanlegg.

Arbeidspakke 4: Robotisering av prøve-preparering og DNA/RNA isolering

For å øke muligheter for rask prøvebearbeiding og kapasitet for håndtering av et stort antall prøver samtidig er det behov for robotisering av både prøve-preparering og DNA/RNA isolering. Ved å kjøre analyser i et robotisert format vil analysen gå fra tid- og personell- krevende multiple manuelle trinn til robotisert prøveopparbeiding og DNA/RNA isolering. Robotiserte analyser vil også redusere faren for forurensning av prøvematerialet og menneskelige feilkilder. Dette vil kreve at prøvematerialet nedskaleres og overføres til plate-format. I SINTEF Industris avd. Bioteknologi og Nanomedisin pågår for tiden et internt finansiert prosjekt for å robotisere prøveopparbeidelse og RNA-isolering av mikro-RNA fra humant hår for bruk i ddPCR metodikk. Erfaringer fra dette prosjektet vil bli brukt som grunnlag for utvikling av robotiserte prosedyrer i det foreslåtte prosjektet. Selv om prøvematerialet er forskjellig, vil metoder og resultater være av stor verdi som basis for videreutvikling av disse prosedyrer til preparasjon av prøver fra oppdrettsanlegg, da metodikken kan overføres og tilpasses nye typer prøvematerialer.

4.1 Trinnvis utvikling av protokoll for robotisering

For å tilnærme metodebearbeidings-pipelines til robotiserte prosedyrer vil protokollen utarbeides trinnvis, først fra rør-baserte metoder til brønnplateformat, deretter til robotiserte oppsett, eller delvis robotiserte prosedyrer avhengig av startmaterialet. Ved å overføre utarbeidete prosedyrer fra arbeidspakke 2 og 3, og/eller optimere metodene og modifisere dem til robotiserte formater, vil prøvekapasiteten øke og muliggjøre håndtering av et stort antall prøver parallelt og kortere prosesseringstider.

Arbeidspakke 5: Evaluering, integrering og kommunikasjon av resultater

Denne arbeidspakken inneholder sammenstilling, tolking og formidling av resultater og kommunikasjon med industrien, samt fortløpende innhenting og vurdering av data og informasjon om og fra anleggene og integrering av resultater fra arbeidspakkene 2-4.

5.1. Kommunikasjon med industrien og innhenting av informasjon

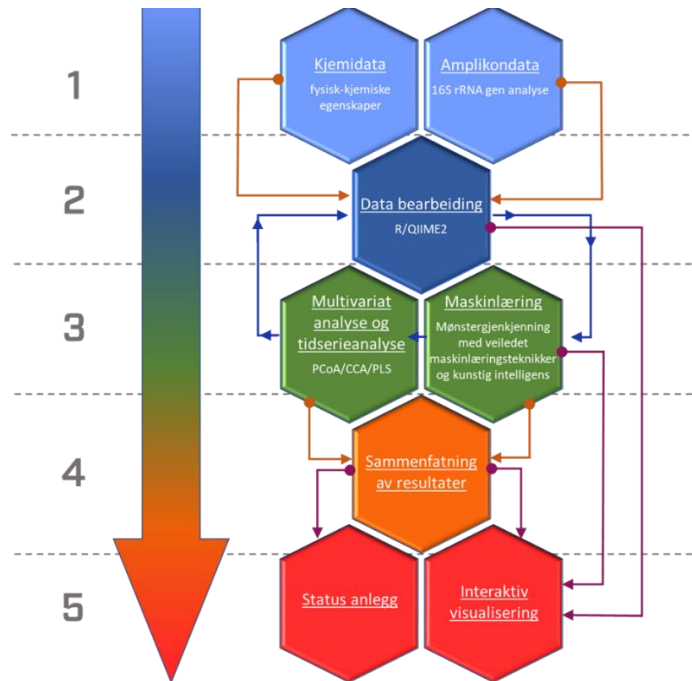
Industripartnerne bidro med informasjon/data om anleggsutforming, vannbehandling, målte kjemiske vannkvalitetsparametere, fiskehelse, hendelser i anlegget, drift og operasjon, vekst og overlevelse for fisk og annen relevant informasjon om forhold som kan påvirke mikrobiotaen i anlegget.

5.2 Sammenstilling og tolkning av data

Informasjonen fra anleggene (kjemisk vannkvalitet, vekst, overlevelse og drift) ble satt i sammenheng med resultatene fra overvåkingen av mikrobiotaen i anleggene. For sammenstilling av data fra alle de analytiske metodene ble det benyttet data science verktøy for analyser av tidsserier og store datamengder (Kapittel 2.1). **En rekke maskinlæringsverktøy ble benyttet for å besvare viktige spørsmål som:**

- Er det korrelasjon mellom problemperioder, sykdom og endringer i mikrobiotaen i anlegget?
- Klarer man å oppdage en kommende problemperiode og/eller infeksjon ved å overvåke mikrobiotaen over tid?
- Hvor store endringer kan man forvente i mikrobiotasammensetningen i baselineprofilen til et anlegg over tid og i forbindelse med endringer i drift eller ved uforutsette eller planlagte hendelser?

Figuren under oppsummerer dataflyt og prosessering i prosjektet: Nivå 1: Lagring og innsamling av rådata. Nivå 2: bearbeiding av data for nivå 3 som vil være grunnlaget for identifisering av baselinjeverdier mht. naturlig variasjon og endringer samt avvik fra baselinje. Nivå 4: utvelgelse av beste modeller/framgangsmåte å beskrive status for anleggene i nivå 5.



6 Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon

For første gang har mikrobiota blitt overvåket med moderne analyseverktøy over lang tid hos flere anlegg, som har gitt innsikt i mikrobefund i RAS under normal produksjon. Biofilm fra biofilter og karvegg, vann i fiskekar og i resirkuleringsløyfe har blitt overvåket over 15 mnd.

6.1 Etablering av "Standard Operating Procedures" (SOPer)

Det ble utviklet "Standard Operating Procedures" (SOPer) for prøvetaking og transport av prøver. Dette er fremstilt i en protokoll og video hvor målet var å sikre at prøver blir tatt ut på en riktig og reproducerbar måte i prosjektet. Denne protokollen kan benyttes for fremtidige prosjekter.

6.2 Anleggsinformasjon

Alle de 5 anleggene produserer smolt på hver sin måte, noe som er karakteristisk for smoltproduksjon i Norge i dag. Noen har desinfeksjon i resirkuleringsløyfa (4 anlegg), andre ikke (1 anlegg). Noen benytter UV (2 anlegg), andre ozon (2 anlegg). Effekten av desinfeksjonen på konsentrasjon og sammensetning av bakterier er derimot ukjent. Tre av anleggene med desinfeksjon i løyfa har dette på full vannstrøm, mens ett har på deler av vannstrømmen. Oppholdstida av vannet i kar er ulikt mellom anleggene, noen har kort tid (25 minutter) andre har lengre (60 minutter). Noen har Moving Bed Biofilter (1 anlegg), andre har Fixed Bed Biofilter (2 anlegg) og to anlegg har begge i kombinasjon (Tabell 1). Anleggene har ulik salinitet (0-15 ‰), hvor noen bruker sjøvann (2 anlegg) og andre har salttilsetning (3 anlegg). Saliniteten varierte for noen av anleggene igjennom perioden (se Vedlegg). Det varierer hvor lenge biofilter har vært operativt, fra 3 måneder til 5 år og om biofilter tas ned regelmessig (1 anlegg) eller ikke (4 anlegg). Noen modner biofilter mellom innlegg av fisk, andre ikke. Anleggene har også ulike prosedyrer for vasking av kar, vasking av biofilter, partikkelfjerning osv. Dette betyr at det ikke vil være mulig å direkte sammenlikne anleggene når det gjelder hvilke driftsparametere som gir den mest stabile mikrobiotaen. At et anlegg har en mer stabil mikrobiota enn et annet kan ikke direkte relateres til en spesifikk driftsparameter.

Tabell 1. Noen utvalgte anleggsspesifikasjoner og driftsparametere for anleggene i studien (A-E). FBBF=Fixed Bed Biofilter, MBBF=Moving Bed Biofilter.

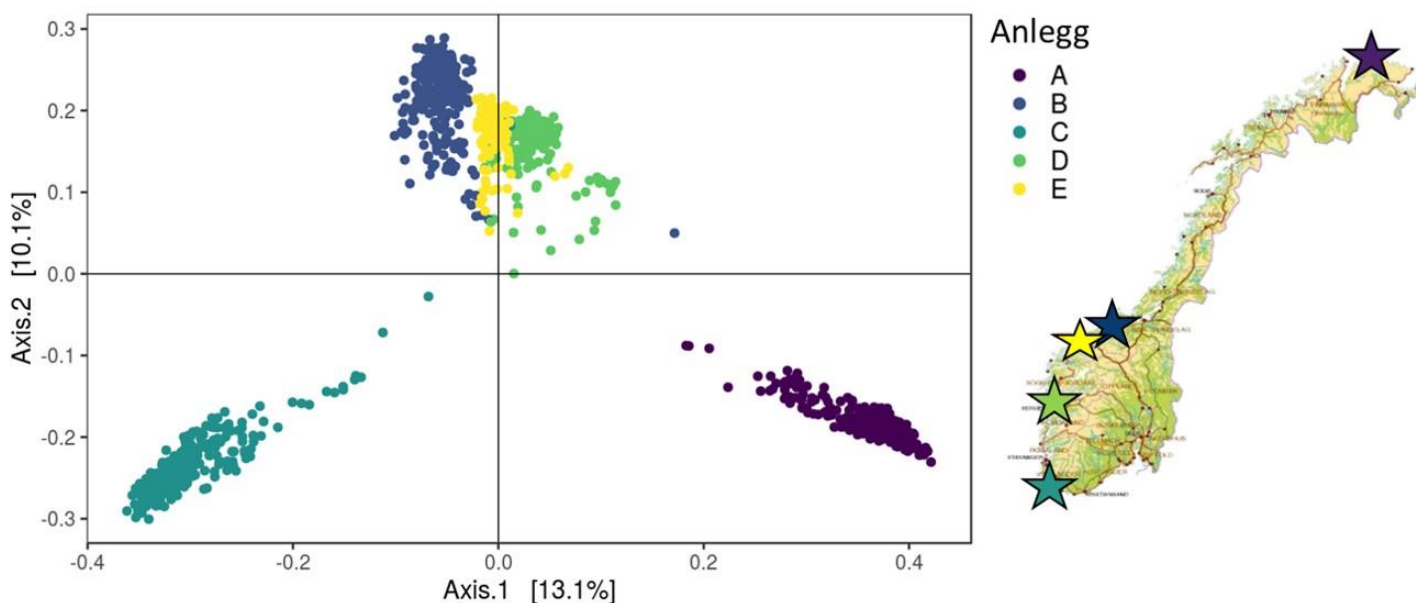
	Anleggskode				
	A	B	C	D	E
Størrelse fisk (g)	50-250	0.2-3	30-150	40-200	50-500
Desinfeksjon inntaksvann	UV	UV	UV	UV	UV + Ozon
Desinfeksjon i sløyfa	UV	UV	Ozon	Ingen	Ozon
Hel vannstrøm/deler av vannstrøm behandlet med desinf.	Hel	Hel	Hel	-	Deler
Rekkefølge komponenter	Filter, FBBF, UV, MBBF, CO ₂ , R, O ₂	Filter, FBBR, R, Filter, O ₂ , UV	Filter, R, O ₃ , MBBR, CO ₂ , O ₂	Filter, MBBF, R, CO ₂ , O ₂	Filter, CO ₂ , MBBF, CO ₂ , R, O ₃
Oppholdstid karvann (min)	25	28	30	45-50	60
Biofilter	FBBF+MBBF*	FBBF	FBBF+MBBF*	MBBF	FBBF
Tar ned biofilter regelmessig	Nei	Nei	Nei	Nei	1 gang pr år
Biofilter vært operativt**	3 år	5 år	3 mnd	1 år	7 mnd
Temperatur (°C) i snitt	14	14	12	10	14
Salinitet min-max (‰)	5-15	0.1-5	0-0.2	1-3***	1-3
Kilde sjøvann	Sjøvann	Salt	Salt	Sjøvann	Salt
Maks biomasse (kg)	100.000	3.000	228.000	300.000	240.000
Type kar	Rundt	Rundt	Rundt	Åttekantet	Rundt
Overflate kar	Glassfiber	PE	Glassfiber	Betong+membran	Betong+membran

R=hvor prøve av resirkulerende vann ble tatt, *=hvor biofilmprøve er tatt fra ** ved oppstart november 2017 for anlegg A, B og C, april 2018 anlegg D og E. ***ble endret fra t1, ved t0 var salinitet rundt 15 promille.

6.3 Sammensetning av mikrobielle samfunn for alle anlegg

Mikrobiota ble analysert over 15 måneder, to ganger pr måned som til sammen ga 33 ulike prøvepunkter hos hvert anlegg. Resultatene viser at alle de fem anleggene i prosjektet hadde en unik mikrobiotaprofil, som var forskjellig fra hverandre. Dette er illustrert i Figur 3. Selv om alle anleggene filtrerer og desinfiserer inntaksvannet etter forskriften (FOR-1997-02-20-192) utvikles

mikrobiotaen inne i anleggene forskjellig. Dette har sannsynligvis sammenheng med ulike drift og design av RAS-anlegget (Tabell 1) som påvirker bakteriesammensetningen inne i anlegget. I tillegg fører også den lange oppholdstida av vannet i RAS-systemet (flere dager), til at det dannes et seleksjonspress som gir en "hus-flora". Dette er karakteristisk for RAS-anlegg. Hvert anlegg har dermed sin egen "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 er viktigere å følge med på endringene i forhold til baseprofilen til hvert enkelt anlegg. Man kunne også se fra Figur 3 at prøvene fra anleggene grupperte seg ut fra geografisk opprinnelse. Anlegg A og C er fra nord og sør i Norge og grupperte seg langt fra hverandre og de andre anleggene. Anlegg B, D og E ligger mye mer nærme hverandre geografisk (Midt-Norge) enn A og C, og grupperer seg nærmere hverandre i figuren. Dette kan dermed forklares med mikrobiotasammensetningen av det lokalet inntaksvannet.



Figur 3. Grafisk fremstilling (PCoA-plot) av mikrobiotaprofil for de fem ulike anleggene (A-E) 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 indikerer det at de har identisk sammensetning, er de langt fra hverandre indikerer det forskjellig. Kartet viser geografisk opprinnelse for de fem anleggene i grafen.

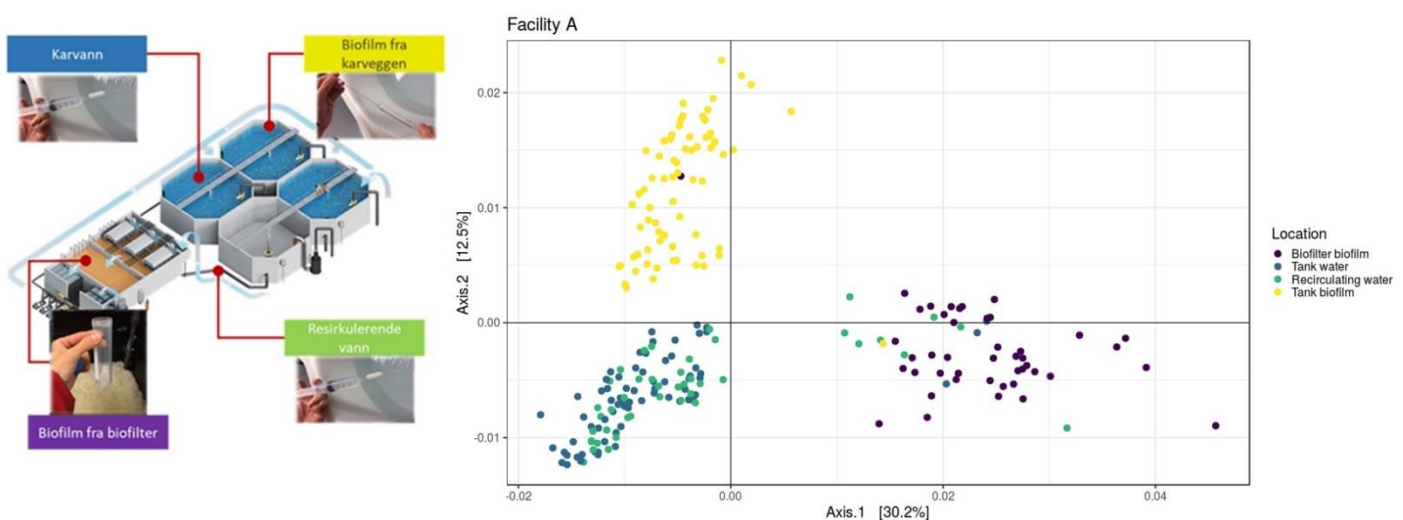
6.4 Mikrobiota fra de ulike prøvepunktene hos hvert anlegg

I dette kapittelet vil sammensetningen og dynamikken av mikrobielle samfunn bli presentert og diskutert. Hos hvert anlegg ble seks ulike prøvepunkt undersøkt: Biofilter i biofilm (B) (n=1), biofilm fra karvegg (S) (n=2), karvann (K) (n=2) og resirkulerende vann (R) (n=1). n indikerer antall

replikater for hvert prøvepunkt. Overvåking ble utført over 15 måneder med prøveuttak hver andre uke. Det ble også analysert replikater fra hver prøve i starten av prosjektet, men da disse var svært like, ble disse slått sammen.

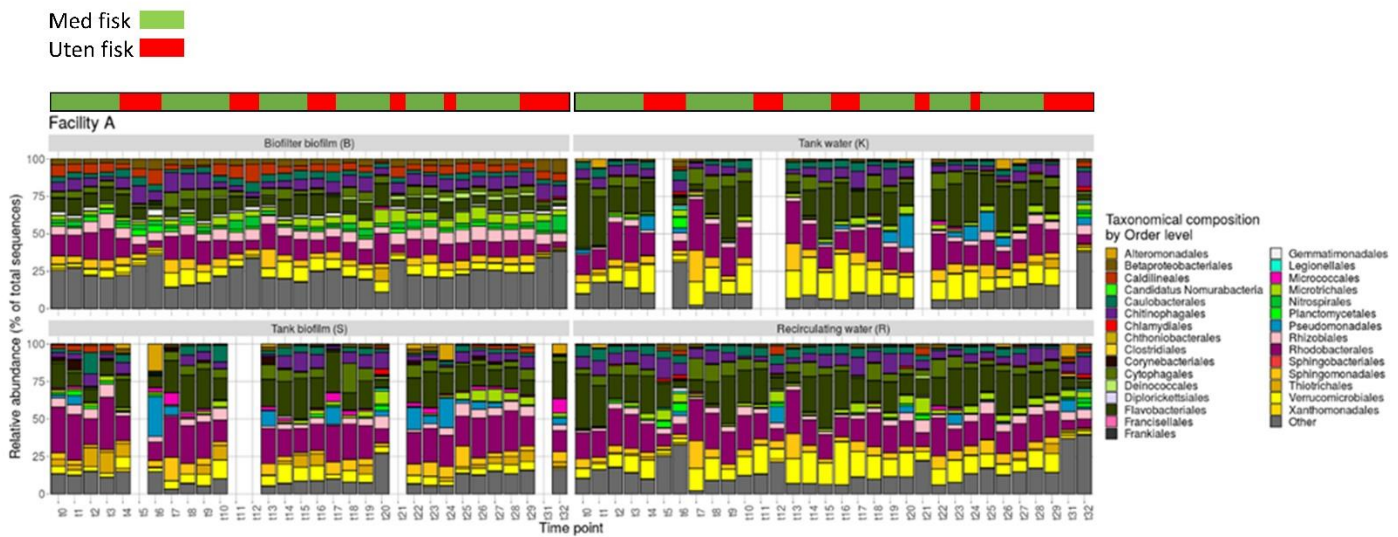
6.4.1 Anlegg A

Anlegg A hadde seks fiskegrupper i produksjon i RAS-enheten i perioden. Anlegg A hadde tydelige grupperinger av mikrobielle samfunn, og var delt inn i: 1) Biofilm fra karvegg (gul), 2) biofilm fra biofilter (lilla) og 3) vann (blå og grønn), som indikerte et spesifikt "avtrykk" blant de ulike prøvepunktene i systemet (Figur 4). Resirkulerende og karvann var dermed like i sammensetning.



Figur 4. Mikrobiotaprofil (PCoA) til de ulike prøvene tatt hos Anlegg A 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. Bilde av RAS-anlegg lånt av Scale AQ med tillatelse.

Anlegg A var det anlegget som hadde mest stabil mikrobiota over tid (Figur 5). Både biofilter, karvann, biofilm på karvegg og resirkulerende vann var relativt stabil over de 15 månedene som anlegget ble fulgt, hvor biofilteret var mest stabilt. Anlegget benytter både MBBF og FBBF i sløyfa med desinfeksjon (UV) mellom og skiller seg noe ut fra de andre anleggene i design. FBBF kan redusere organisk materiale, som gjør UV-behandlingen effektiv, og gi gode forhold i MBBF. Om dette kan forklare den stabile sammensetningen av mikrobiota er vanskelig å slå fast.



Figur 5. Relativt nivå (%) av ulike bakterier på orden nivå for anlegg A. Biofilter, karvann, biofilm karvegg og resirkulerende vann fra t0 (november 2017) til t32 (februar 2019). Seks fiskegrupper var i systemet i perioden. Bakteriegupper er representert på orden nivå og bare grupper som hadde nivå > 10% er vist. Alle bakterieorden under 10% er under gruppen "Other".

I kontrast til Figur 5, viser Tabell 2 baseprofilen for hvert av de fire prøvepunktene. Bare grupper som var til stede i alle prøver og var representert med >50 sekvenser er inkludert. Baseprofilen viste at biofilter hadde høyest diversitet, som forventet og lavest i biofilm fra karvegg. Karvann hadde litt høyere diversitet enn resirkulerende vann.

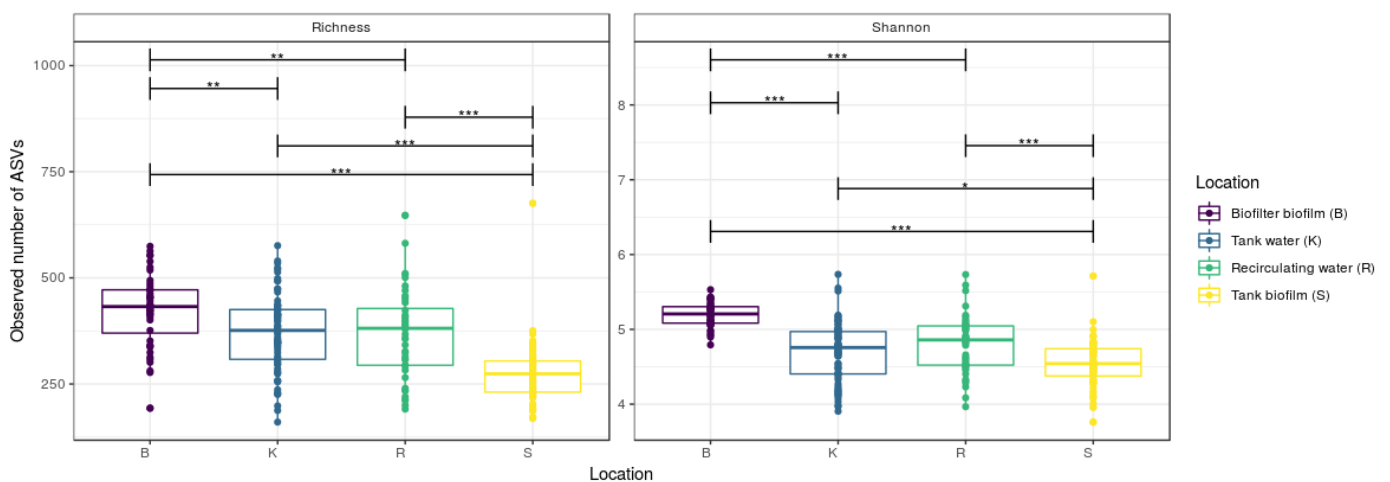
Tabell 2. Baseprofil for de fire ulike prøvepunktene hos Anlegg A på familienivå. B=biofilter, S=biofilm på karvegg, K=karvann, R=resirkulerende vann. Grupper som var til stede i 97% av prøver og var representert med >50 sekvenser er inkludert.

B	S	K	R
<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>
<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>
<i>Caldilineaceae</i>	<i>Thiotrichaceae</i>	<i>Rubritaleaceae</i>	<i>Rubritaleaceae</i>
<i>Saprospiraceae</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Saprospiraceae</i>
<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Saprospiraceae</i>	<i>Saprospiraceae</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>
<i>Microtrichaceae</i>	<i>Devosiaceae</i>	<i>Hyphomonadaceae</i>	<i>Hyphomonadaceae</i>
<i>Hyphomonadaceae</i>	<i>Rubritaleaceae</i>	<i>Spirosomaceae</i>	<i>Microtrichaceae</i>
<i>Pirellulaceae</i>	<i>Pirellulaceae</i>	<i>Microtrichaceae</i>	<i>Devosiaceae</i>
<i>Nitrosomonadaceae</i>	<i>Hyphomonadaceae</i>	<i>Devosiaceae</i>	<i>Micavibrionaceae</i>
<i>Spirosomaceae</i>	<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Micavibrionaceae</i>	<i>Rhizobiaceae</i>
<i>Nitrospiraceae</i>	<i>Microtrichaceae</i>	<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Pirellulaceae</i>
<i>Rhizobiaceae</i>	DEV007	<i>Gracilibacteria-uncultured</i>	<i>Chitinophagales-uncultured</i>
<i>Rubritaleaceae</i>	<i>Spirosomaceae</i>	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Gracilibacteria-uncultured</i>
<i>Gemmatimonadaceae</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Chitinophagales-uncultured</i>	DEV007

DEV007	<i>Burkholderiaceae</i>	DEV007	<i>Rubinisphaeraceae</i>
<i>uncultured prokaryote</i>	<i>Rubinisphaeraceae</i>	<i>Gammaproteobacteria-unassigned</i>	<i>Caldilineaceae</i>
<i>Devosiaceae</i>	<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Pirellulaceae</i>	<i>Microscillaceae</i>
<i>Rubinisphaeraceae</i>		<i>Thiotrichaceae</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>
<i>Microscillaceae</i>		<i>Microscillaceae</i>	<i>NS9 marine group</i>
<i>Hyphomicrobiaceae</i>		<i>Rubinisphaeraceae</i>	<i>Thiotrichaceae</i>
<i>Reyranellaceae</i>		<i>Caldilineaceae</i>	<i>Kordiimonadales-uncultured</i>
<i>Rhizobiales Incertae Sedis</i>		<i>Cyclobacteriaceae</i>	<i>Burkholderiaceae</i>
JG30-KF-CM45		<i>Micavibrionales-uncultured</i>	<i>Phycisphaeraceae</i>
<i>Trueperaceae</i>		<i>NS9 marine group</i>	<i>Nitrosomonadaceae</i>
OM190-uncultured		<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Rhodanobacteraceae</i>
<i>Burkholderiaceae</i>		<i>Gammaproteobacteria Incertae Sedis</i>	<i>Hyphomicrobiaceae</i>
<i>Geminicoccaceae</i>		<i>Crocinitomicaceae</i>	<i>Chitinophagaceae</i>
<i>Micavibrionaceae</i>		<i>Kordiimonadales-uncultured</i>	<i>Subgroup 6-uncultured</i>
<i>Blastocatellaceae</i>		<i>Phycisphaeraceae</i>	<i>Simkaniaceae</i>
<i>Rhodanobacteraceae</i>		<i>Simkaniaceae</i>	<i>Chitinophagales-37-13</i>
<i>Phycisphaeraceae</i>		<i>Gracilibacteria-uncultured</i>	<i>Cryomorphaceae</i>
<i>Gemmataceae</i>		<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Rhizobiales Incertae Sedis</i>
<i>Kordiimonadales-uncultured</i>		<i>Blastocatellaceae</i>	<i>Bdellovibrionaceae</i>
<i>Alphaproteobacteria-unassigned</i>		<i>Hyphomicrobiaceae</i>	
<i>Chitinophagales-uncultured</i>		<i>Chitinophagales-37-13</i>	
<i>Sneathiellaceae</i>		<i>Rhodanobacteraceae</i>	
<i>Parvularculaceae</i>		<i>Subgroup 6-uncultured</i>	
<i>Alphaproteobacteria-uncultured</i>		<i>Bdellovibrionaceae</i>	
<i>Anaerolineae-metagenome</i>		<i>Bacteria-unassigned</i>	
<i>Solibacteraceae (Subgroup 3)</i>		<i>Nitrosomonadaceae</i>	
<i>Bdellovibrionaceae</i>		<i>Trueperaceae</i>	
<i>Verrucomicrobiaceae</i>			
<i>Woeseiaceae</i>			
<i>Chitinophagales-37-13</i>			
<i>Myxococcales-Eel-36e1D6</i>			
<i>Schleiferiaceae</i>			
<i>Thiotrichaceae</i>			
<i>Rhodothermaceae</i>			
<i>Deltaproteobacteria-uncultured</i>			
<i>Myxococcales-bacteriap25</i>			
<i>Methyloligellaceae</i>			
<i>Saccharimonadales-uncultured</i>			
<i>Rickettsiales-SM2D12</i>			
<i>Ilumatobacteraceae</i>			
<i>OLB14-uncultured</i>			
<i>Rhodomicrobiaceae</i>			
<i>NS9 marine group</i>			
<i>Gammaproteobacteria-unassigned</i>			

Gammaproteobacteria-unknown
Gimesiaceae
Alphaproteobacteria-unassigned
Simkaniaceae
Gracilibacteria-uncultured

Alpha-diversitet 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. En høy diversitet kan indikere en stabil og god sammensetning av bakterier. Når vi sammenliknet alpha-diversitet mellom de ulike prøvepunktene, var det tydelig at biofilteret hadde det mest diverse samfunnet (Fig. 6). Biofilm fra karvegg hadde lavest diversitet. Vann (kar og resirkulerende vann) hadde svært lik diversitet (Tabell 2 og Figur 6) og dette kan forklares med den korte oppholdstida vannet har i fiskekaret, slik at bakteriene ikke rekker å vokse før de går videre i sløyfa. I tillegg desinfiserer anlegget (full flow) med UV mellom to biofilter, og resirkulerende vann er tatt ut etter siste biofilter og fjerner dermed ikke bakterier i kar eller i sløyfe, noe som også kan gi lik diversitet i vannet.

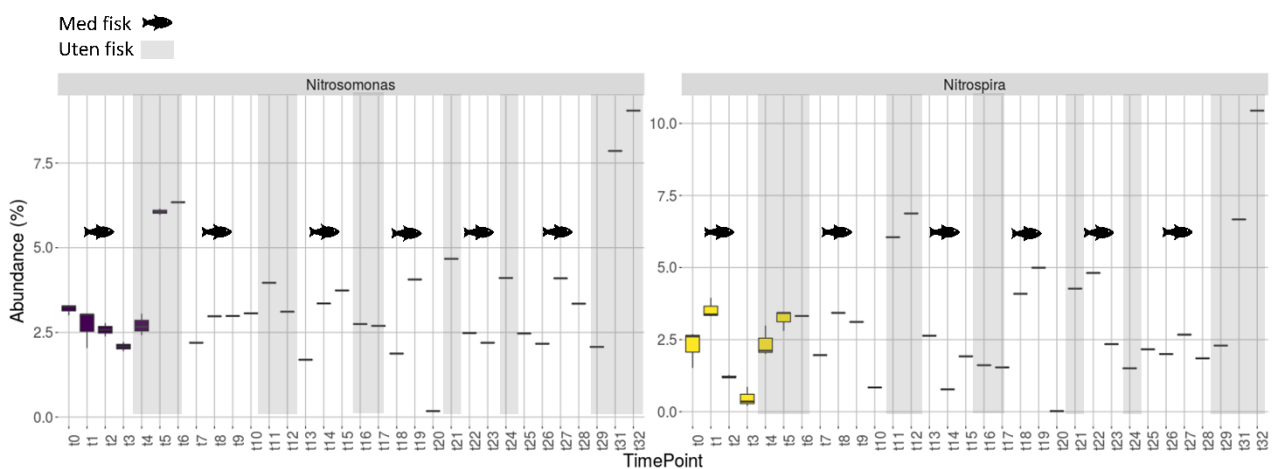


Figur 6. Alpha-diversitet mellom ulike prøvepunkter hos Anlegg A ved bruk av to ulike analyser: *Rikhet* (totalt antall arter) og Shannon diversitets indeks (totalt antall arter samt likhet). Søylar med stjerner over indikerer hvilke lokasjoner som er signifikant forskjellig fra hverandre. * indikerer statistisk forskjell ved $p < 0.5$, ** ved $p < 0.1$, og *** ved $p < 0.01$. B=biofilter, K=karvann, R=resirkulert vann, S=biofilm karvegg.

Biofilter biofilm

Samfunnene i biofilteret var svært stabile over tid med minimale variasjoner. Samfunnene var dominert av *Rhodobacterales* ($11.6\% \pm 4.2\%$), *Flavobacteriales* ($8.8\% \pm 3.4\%$), *Chitinophagales* (7%

$\pm 2.5\%$), *Rhizobiales* ($6.8\% \pm 1.6\%$), *Caldilineales* ($5.4\% \pm 2.4\%$), *Verrucomicrobiales* ($5.4\% \pm 2.8\%$), *Sphingomonadales* ($4.8\% \pm 2.1\%$), *Microtrichales* ($4.6\% \pm 2.1\%$) and *Betaproteobacteriales* ($4\% \pm 1.6\%$). En stor andel av grupper var under 10% og indikerer dermed høy diversitet i biofilteret, som også er vist i Figur 6 og Tabell 2. De nitrifiserende bakteriene er representert med AOB *Nitrosomonas* and NOB *Nitrospira*, som også var en del av baseprofilen (Tab. 2, Fig. 7). Hos Anlegg A ser man tydelig effekten av modning av biofilter ved flytting av fisk ut av kar, ved en økning av nitrifiserende bakterier i perioder uten fisk (Fig. 7). Høyeste andel ble identifisert for *Nitrospira* igjennom prosjektperioden. Nitrogenprodukter i perioden kan sees i Vedlegg 1.



Figur 7. Relativt nivå (%) av Nitrifiserende bakterier hos Anlegg A i biofilter. *Nitrosomonas* til venstre og *Nitrospira* til høyre, henholdsvis første og andre steg i nitrifiseringsprosessen. Grå felter symboliserer fisk ut av system, fisk symboliserer fisk i system ved de ulike prøvetidspunktene

Biofilm karvegg (Glassfiber)

De mikrobielle samfunnene fra karvegg hadde lavest diversitet og hadde en lav andel i baseprofilen (Tabell 2). Hovedårsaken til dette er sannsynligvis at denne biofilmen blir jevnlig vasket bort ved flytting av fisk. Dermed blir det ikke dannet en permanent mikrobiota over tid. De mest dominerende gruppene i biofilm fra karvegg for Anlegg A *Rhodobacterales* ($21.4\% \pm 5.6\%$), *Flavobacteriales* ($16.7\% \pm 6.2\%$), *Verrucomicrobiales* ($5.7\% \pm 3\%$), *Sphingomonadales* ($5.3\% \pm 3.4\%$) and *Chitinophagales* ($5.2\% \pm 3.3\%$). Høy dominans av Rhodobacterales og Flavobacteriales (> 37%) og lavt nivå av gruppen "Other" (10.9%) bekrefter lav diversitet i biofilm fra karvegg.

Karvann

Baseprofilen for karvannet kan sees i Tabell 2. De mest dominerende gruppene var *Flavobacteriales* (20.5% ± 9.8%), *Rhodobacterales* (17.1% ± 6.4%), *Verrucomicrobiales* (13.6 ± 6.5%), *Chitinophagales* (6.1% ± 2.5%), *Sphingomonadales* (5.6% ± 4.4%) and *Cytophagales* (5.1% ± 3.1%). Gruppen *Other* hadde nivå på 12% ± 7.6%.

Resirkulerende vann

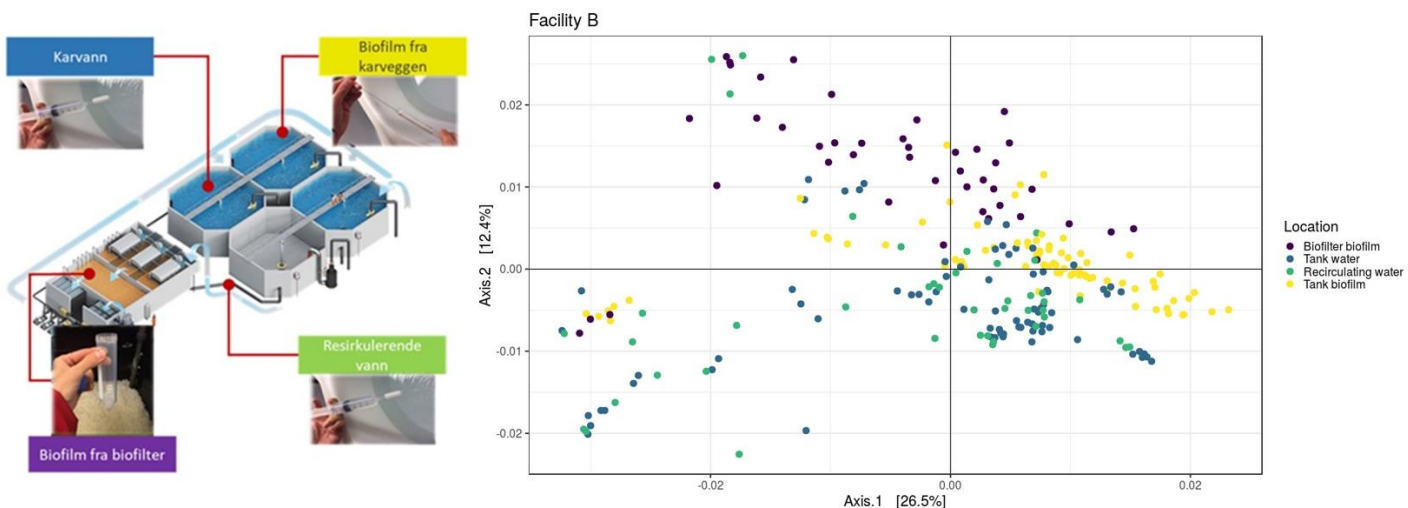
Svært lik sammensetning av de mikrobielle samfunnene ble identifisert for resirkulerende vann og karvann. Både baseprofil (Tabell 2) og de mest dominerende ordene var homogene. Samfunnet var dominert av *Flavobacteriales* (18.8% ± 8.5%), *Rhodobacterales* (17.3% ± 5.9%), *Verrucomicrobiales* (11.5 ± 5,9%), *Chitinophagales* (7.3% ± 3%), *Cytophagales* (5.6% ± 3.5%) og *Sphingomonadales* (5.4% ± 3.7%). Som nevnt over kan dette forklares med kort oppholdstid i tank samt desinfeksjonen i sløyfa er plassert mellom to biofilter og prøve av resirkulerende vann er tatt etter siste biofilter.

Kjemisk og fysisk vannkvalitet

Figurer for anleggets kjemiske og fysiske vannkvalitet i perioden er presentert i Vedlegg 1.

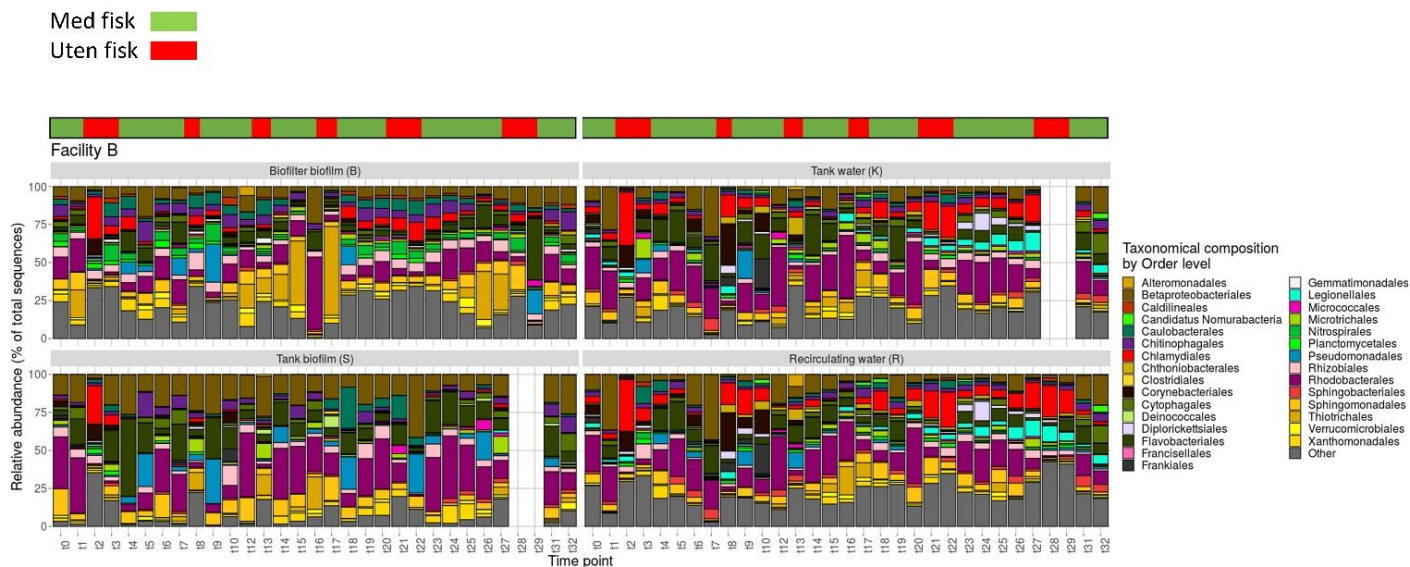
6.4.2 Anlegg B

Anlegg B hadde i prosjektperioden 7 fiskegrupper i karene. Anlegg B hadde ikke like tydelige grupperinger som Anlegg A, men man ser en viss gruppering i biofilm fra karvegg (gul), biofilm fra biofilter (lilla) og vann (blå og grønn) (Fig. 8).



Figur 8. Mikrobiotaprofil (PCoA) for de ulike prøvene tatt hos Anlegg B. Biofilter biofilm, biofilm på karvegg, vann i kar og resirkulerende vann. Hvert punkt i grafen representerer en mikrobiotaprofil som dannes fra mikrobiota sammensetningen for hver prøve. Hver prøvelokasjon har hver sin farge. Når to punkter overlapper indikerer det at de har identisk sammensetning, er de langt fra hverandre indikerer det forskjellig.

De ulike forskjellene i sammensetning av mikrobielle samfunn og dynamikk for Anlegg B kan sees i Figur 8 og 9. Biofilteret, vann og biofilm fra karvegg hadde varierende i sammensetning i løpet av perioden. Den største endringen i mikrobiota skjedde da anlegget flyttet fisk ut, for deretter å stabilisere seg igjen med tid. Når fisk på nytt ble flyttet ut/inn, skjedde det på ny en endring av mikrobiota, på denne måten ble mikrobiotaen ustabil over tid i de to utvalgte karene.



Figur 9. Relativt nivå (%) av ulike bakterier på orden nivå for anlegg B. Biofilter, karvann, biofilm karvegg og resirkulerende vann fra t0 (november 2017) til t32 (februar 2019). Bakteriegrupper er representert på orden nivå og bare grupper som hadde nivå > 10% er vist. Alle bakterier på ordennivå under 10% er under gruppen "Other".

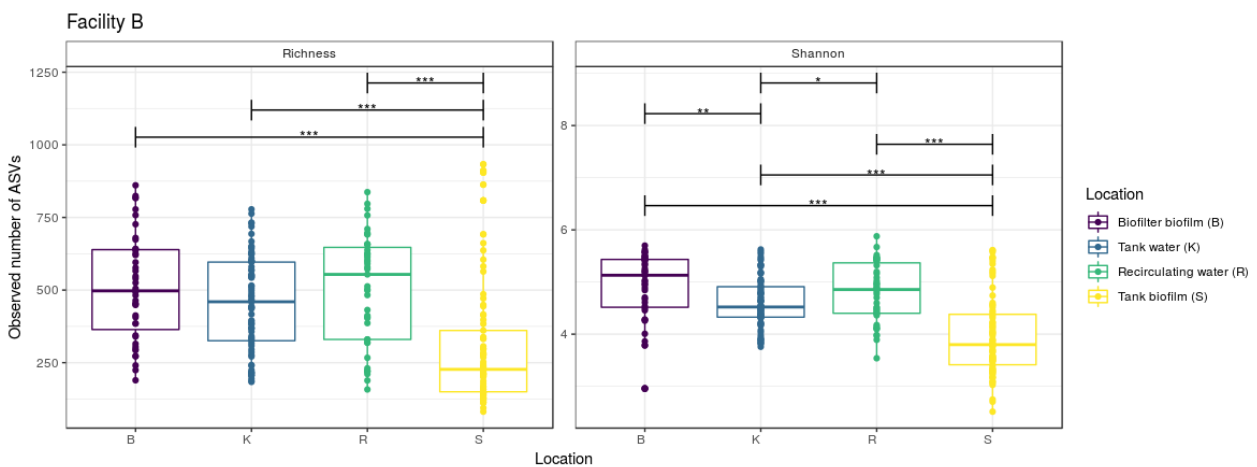
I kontrast til Figur 9, viser Tabell 3 kjernesamfunnene for hvert prøvepunkt. Bare grupper som var til stede i 97% av prøver og var representert med > 50 sekvenser er inkludert. Biofilteret hadde høyest diversitet, som forventet. Overraskende fant vi at antall arter i baseprofilen i resirkulerende vann var høyere enn karvann (Tab. 3, Fig. 10). Anlegget har desinfeksjon med UV etter biofilter og før karvann og kan muligens forklare den lavere diversiteten i karvannet, sammenliknet med resirkulerende vann, da resirkulerende vann ble tatt ut før UV. Karvann og resirkulerende vann var derimot ganske like når det gjelder sammensetning av bakterier (Fig. 8, 9). De mikrobielle samfunnene fra biofilm på karvegg var forventet å være representert av få grupper pga hyppig vasking, noe tabellen viser (Tab. 3).

Tabell 3. Baseprofil for de fire ulike prøvepunktene hos Anlegg B på familienivå. B=biofilter, S=biofilm på karvegg, K=karvann, R=resirkulerende vann. Grupper som var til stede i 97% av prøver og var representert med >50 sekvenser er inkludert.

B	S	K	R
<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>
<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Parachlamydiaceae</i>
<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>
<i>Saprospiraceae</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Parachlamydiaceae</i>	<i>Burkholderiaceae</i>
<i>Nitrospiraceae</i>	<i>Saprospiraceae</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>
<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Rhizobiales Incertae Sedis</i>	<i>Spirosomaceae</i>	<i>Legionellaceae</i>
<i>Hyphomonadaceae</i>	<i>Spirosomaceae</i>	<i>Saprospiraceae</i>	<i>Saprospiraceae</i>
<i>Parachlamydiaceae</i>	<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Weeksellaceae</i>	<i>Sphingobacteriaceae</i>

<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Microtrichaceae</i>	<i>Rickettsiales-SM2D12</i>
<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Parachlamydiaceae</i>	<i>Rhizobiales Incertae Sedis</i>	<i>Rhizobiales Incertae Sedis</i>
<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Sphingobacteriaceae</i>	<i>Spirosomaceae</i>
<i>Gemmataceae</i>	<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Diplorickettsiaceae</i>
<i>Rhizobiales Incertae Sedis</i>	<i>Caulobacteraceae</i>	<i>Mycobacteriaceae</i>	<i>Rhizobiaceae</i>
<i>Blastocatellaceae</i>	<i>Beijerinckiaceae</i>	<i>Saccharimonadales-uncultured</i>	<i>Chitinophagaceae</i>
<i>Reyraneliaceae</i>		<i>Pirellulaceae</i>	<i>Microtrichaceae</i>
<i>Rubritaleaceae</i>		<i>Rickettsiales-SM2D12</i>	<i>Mycobacteriaceae</i>
<i>Rhizobiaceae</i>		<i>Diplorickettsiaceae</i>	<i>Rhodanobacteraceae</i>
<i>Caldilineaceae</i>		<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Hyphomonadaceae</i>
<i>Micropepsaceae</i>		<i>Caulobacteraceae</i>	<i>uncultured bacterium</i>
<i>Microtrichaceae</i>		<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Caulobacteraceae</i>
<i>Pirellulaceae</i>		<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Reyraneliaceae</i>
<i>Thiotrichaceae</i>		<i>Planctomycetales-uncultured</i>	<i>Planctomycetales-uncultured</i>
<i>Mycobacteriaceae</i>		<i>Micavibrionales-uncultured</i>	<i>Micavibrionales-uncultured</i>
<i>Nitrosomonadaceae</i>		<i>Hyphomonadaceae</i>	<i>Paracaedibacteraceae</i>
<i>Pedosphaeraceae</i>		<i>Saccharimonadales-unassigned</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>
<i>Thermoanaerobaculaceae</i>		<i>Rubritaleaceae</i>	<i>Saccharimonadales-unassigned</i>
<i>Planctomycetales-uncultured</i>		<i>Paracaedibacteraceae</i>	<i>Gammaproteobacteria Incertae Sedis</i>
<i>Devosiaceae</i>		<i>Reyraneliaceae</i>	<i>Alphaproteobacteria-unassigned</i>
<i>Rickettsiales-SM2D12</i>		<i>Gammaproteobacteria Incertae Sedis</i>	<i>Gammaproteobacteria-unassigned</i>
<i>Spirosomaceae</i>		<i>Moraxellaceae</i>	<i>Rubritaleaceae</i>
<i>Verrucomicrobiaceae</i>		<i>Alphaproteobacteria-unassigned</i>	<i>Micropepsaceae</i>
<i>Microbacteriaceae</i>		<i>Micropepsaceae</i>	<i>Simkaniaceae</i>
<i>Hyphomicrobiaceae</i>		<i>Rubinisphaeraceae</i>	<i>Gammaproteobacteria-uncultured</i>
<i>Rubinisphaeraceae</i>		<i>Devosiaceae</i>	<i>Rubinisphaeraceae</i>
<i>Caulobacteraceae</i>		<i>Gammaproteobacteria-unassigned</i>	<i>Candidatus Peregrinibacteria</i>
<i>Gemmatimonadaceae</i>		<i>Gammaproteobacteria-uncultured</i>	<i>Rickettsiaceae</i>
<i>Microscillaceae</i>			<i>Devosiaceae</i>
<i>Nocardioideaceae</i>			<i>Anaplasmataceae</i>
<i>Micavibrionales-uncultured</i>			<i>Candidatus Magasanikbacteria</i>
<i>Bdellovibrionaceae</i>			<i>Neisseriaceae</i>
<i>Haliaceae</i>			<i>Subgroup 6</i>
<i>Ilumatobacteraceae</i>			
<i>Chthoniobacteraceae</i>			
<i>Polyangiaceae</i>			
<i>Solirubrobacterales-67-14</i>			
<i>Fodinicurvataceae</i>			
<i>WD2101 soil group</i>			
<i>Solibacteraceae (Subgroup 3)</i>			
<i>Saccharimonadales</i>			

Alpha-diversitet 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. En høy diversitet kan indikere en stabil og god sammensetning av bakterier. Analyser av alpha-diversitet viste at samfunnene fra biofilter biofilm var signifikant ulik og rikere enn samfunn fra karvann og karbiofilm (*Shannon index*) (Figur 10). Begge samfunnene fra vann hadde høyere diversitet enn samfunnene fra biofilm karvegg. Shannon indeks viste en tendens til høyere diversitet i det resirkulerende vannet sammenliknet med karvannet, noe som bekrefter forskjellene i baseprofil sammensetningen (Tab. 3). Dette kan som nevnt over være relatert til plassering av UV og hvor prøve av resirkulerende vann ble tatt ut (før UV). Vi kunne derimot ikke finne noen forskjeller i samfunnene om bare antall arter ble sammenliknet (*Rikhet*). Samfunnene i biofilter var fremdeles de mest diverse ved bruk av *Rikhet* indeks. På samme måte viste begge samfunnene i vann høyere antall arter (*Rikhet*) sammenliknet med samfunn fra karvegg biofilm.

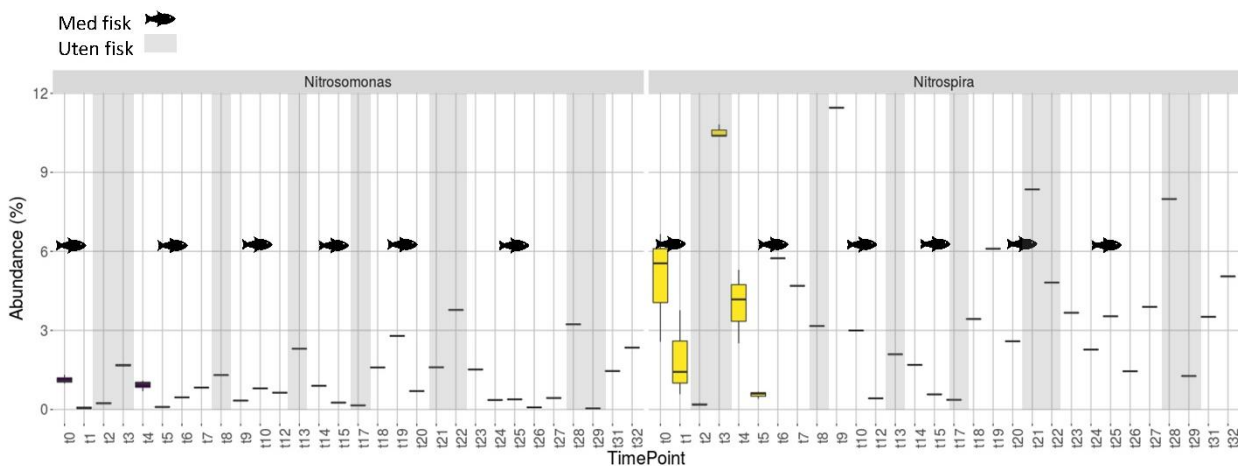


Figur 10. Alpha diversitet mellom ulike prøvepunkter hos Anlegg B ved bruk av to ulike analyser: *Rikhet* (totalt antall arter) og Shannon diversitets indeks (totalt antall arter samt likhet). Søyler med stjerner over indikerer hvilke lokasjoner som er signifikant forskjellig fra hverandre. * indikerer statistisk forskjell ved $p < 0.5$, ** ved $p < 0.1$, og *** ved $p < 0.01$.

Biofilter biofilm

Samfunnene i biofilteret var dominert av *Rhodobacterales* ($10.1\% \pm 9.11\%$), *Betaproteobacteriales* ($7.8\% \pm 4.7\%$), *Thiotrichales* ($7.8\% \pm 14.1\%$), *Flavobacteriales* ($5.87\% \pm 7.5\%$), *Sphingomonadaes* ($5.5\% \pm 3.3\%$), *Chitinophagales* ($5.3\% \pm 3.1\%$) og *Rhizobiales* ($5.2\% \pm 1.9\%$). Gruppen *Other* som

inneholder grupper som ikke var over 10% i relativt nivå, bidro med 21% av samfunnet og indikerer en høy diversitet av mikrobiota i biofilteret. Det nitrifiserende samfunnet besto av AOB *Nitrosomonas* og NOB *Nitrospira* med nivå opp mot 4% og 12% av det totale samfunnet (Figur 11). De var også representert i baseprofilen (Tab. 3). Hos Anlegg B ser man også tydelig effekten av modning av biofilter med ammoniumklorid ved flytting av fisk ut av kar, som også ble observert for Anlegg A, ved en økning av nitrifiserende bakterier i perioder uten fisk (Fig. 11). De høyeste andelene ble identifisert for *Nitrospira*. Nitrogenprodukter i perioden kan sees i Vedlegg 1.



Figur 11. Relativt nivå (%) av nitrifiserende bakterier hos Anlegg B. *Nitrosomonas* til venstre og *Nitrospira* til høyre, henholdsvis første og andre steg i nitrifiseringsprosessen. Grå felter symboliserer fisk ut av system, fisk symboliserer fisk i system.

Biofilm karvegg (PE)

De mikrobielle samfunnene fra karvegg hadde en lavere diversitet enn de resterende prøvepunktene (Fig. 9). Samfunnene fra karveggen var dominert av *Rhodobacterales* (19.1% ± 13.4%), *Betaproteobacteriales* (16.5% ± 7.3%), *Flavobacteriales* (13% ± 9.9%), *Sphingomonadales* (6.5% ± 4.4%) og *Pseudomonadales* (5.9% ± 9%) (Tab. 3). Alle bakterier som var representert for gruppen *Other* bidro med bare 8.2% ± 8.3% til den totale mikrobiotaen, som bekreftet lav diversitet i samfunnene fra biofilm karvegg.

Karvann

Baseprofilen for karvannet kan sees i Tabell 3. De mest dominerende gruppene var *Rhodobacterales* (17.6% ± 11.5%), *Flavobacteriales* (8.7% ± 7.3%), *Betaproteobacteriales* (7.9% ± 7.6%) and *Chlamydiales* (7.3% ± 7.5%). Diversiteten til karvannet var lavere enn det

resirkulerende vannet (Fig. 9). Dette kan ha en sammenheng med at anlegget desinfiserer med UV rett før fiskekar, som nevnt og prøve av resirkulerende vann er tatt etter biofilter og før UV. Det var spesielt oppvekst av *Chlamydiales* i vannet ved flytting av fisk. *Chlamydiales* er kjente patogener for både fisk og vertebrater, og har gitt hud og gjelleproblemer hos over 90 fiskearter, inkludert laks (Nylund et al. 2015). Mest utbredt er proliferativ gjellebetennelse, en respirasjonsslidelse som angriper gjellene hos fisk. Det ble ikke rapportert problemer med gjellebetennelse ved anlegget 1. prosjektperioden. Hos anlegg E ble også *Chlamydiales* identifisert som en av de dominerende gruppene i baseprofilen, dette fant vi ikke hos de andre anleggene.

Resirkulerende vann

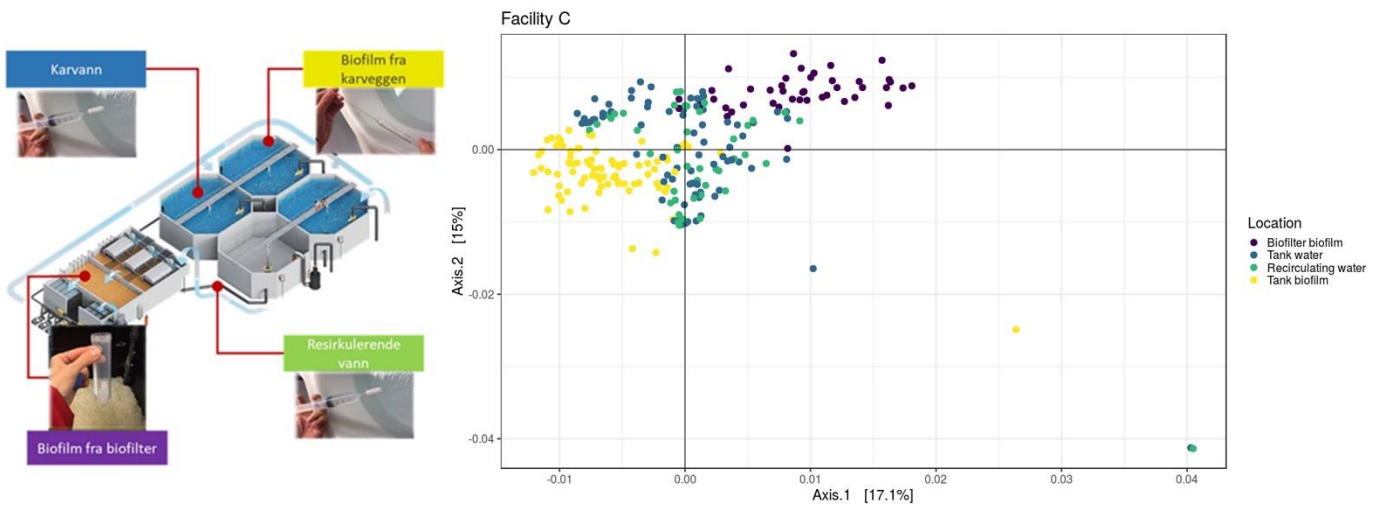
Resirkulerende vann hadde som beskrevet over, høyere diversitet enn karvann (Fig. 10). Det kan forklares med at prøven er tatt før UV. Dominerende arter av samfunnet var lik karvann, men noen noe ulikt nivå for enkelte: *Rhodobacterales* (14.1% ± 10.1%), *Betaproteobacterales* (9.1% ± 10%), *Chlamydiales* (8.5% ± 7.9%) and *Flavobacteriales* (6.8% ± 5.2%).

Kjemisk og fysisk vannkvalitet

Figurer for anleggets kjemiske og fysiske vannkvalitet i perioden er presentert i Vedlegg 1.

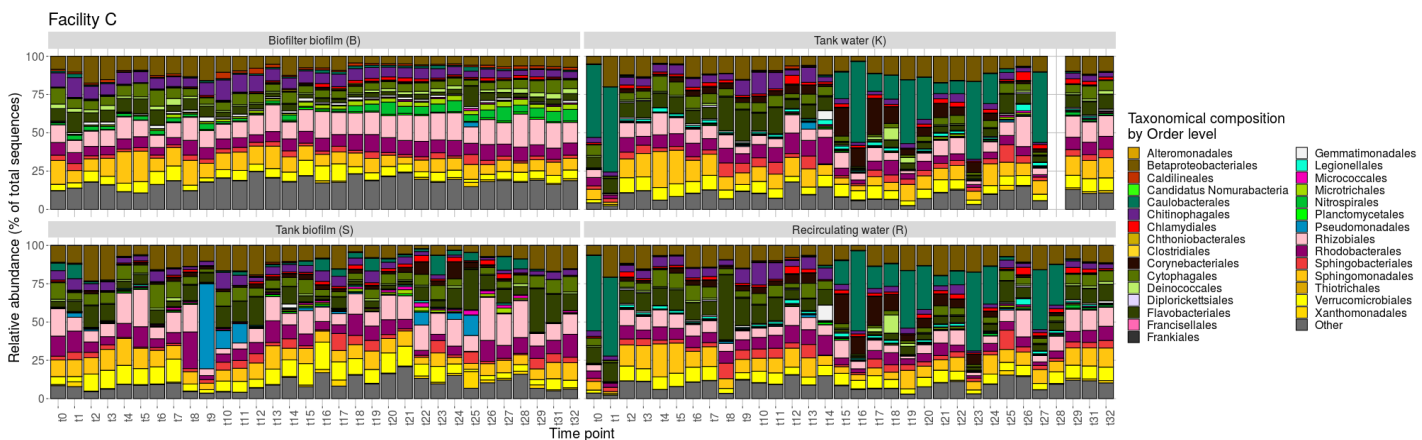
6.4.3 Anlegg C

Anlegg C hadde tydelige grupperinger som Anlegg A: Biofilm fra karvegg (gul), biofilm fra biofilter (lilla) og vann (blå og grønn) (Fig. 12), som indikerte et spesifikt "avtrykk" bland de ulike prøvepunktene i systemet.



Figur 12. Mikrobiotaprofil (PCoA) for de ulike prøvene tatt hos Anlegg C. Biofilter biofilm, biofilm på karvegg, vann i kar og resirkulerende vann. Tydelige grupperinger som for anlegg A i Figur 3. Hvert punkt i grafen representerer en mikrobiotaprofil som dannes fra mikrobiota sammensetningen for hver prøve. Hver prøvelokasjon har hver sin farge. Når to punkter overlapper indikerer det at de har identisk sammensetning, er de langt fra hverandre indikerer det forskjellig.

Anlegg C hadde et stabilt biofilter i likhet med flere av anleggene i prosjektet. Karvann, biofilm på karvegg og resirkulerende vann var derimot mer ustabil i utvalgte perioder (Figur 13). Også hos dette anlegget er resirkulerende og karvann lik i sammensetning, sannsynligvis som følge av kort oppholdstid i kar som nevnt tidligere, samt plassering av ozon (før biofilter). Prøve av resirkulerende vann var tatt før ozon.



Figur 13. Relativt nivå (%) av ulike bakterier på orden nivå for anlegg C. Biofilter, karvann, biofilm karvegg og resirkulerende vann fra t0 (november 2017) til t32 (februar 2019). Siden anlegget har flyttet ut fisk svært jevnlig, er det ikke illustrert med/uten fisk.

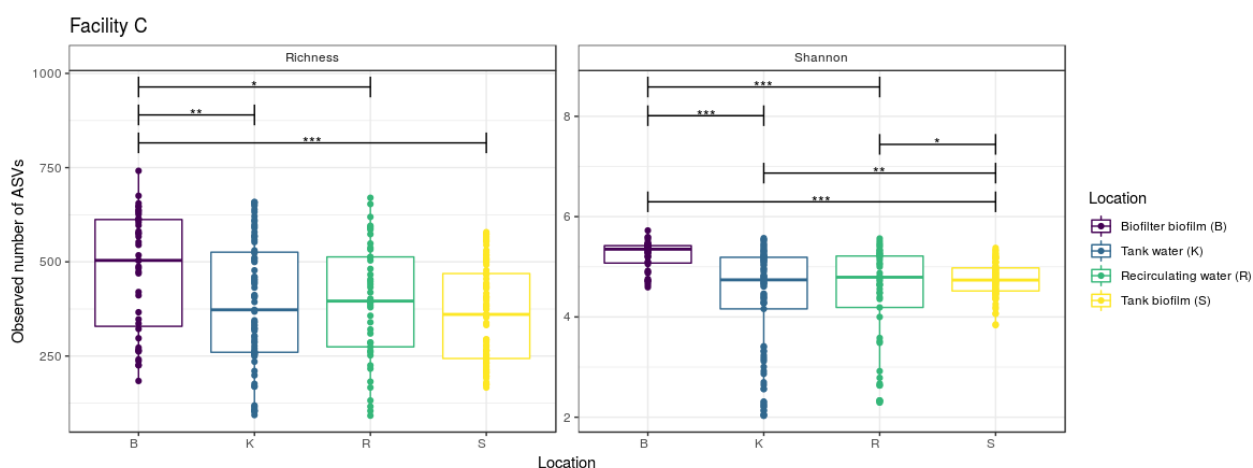
I motsetning til Figur 13, viser Tabell 4 baseprofil på familienivå for hver av de fire prøvepunktene hos Anlegg C. Baseprofilen for samfunnet i biofilter var som forventet det mest diverse. Overraskende hadde biofilm fra karvegg en høyere diversitet enn vannprøvene, til tross for at anlegget flytter fisk svært ofte og vasker karvegg mellom innlegg. Resirkulerende vann hadde noe høyere diversitet enn karvann, men ble ikke funnet til å være signifikant.

Tabell 4. Baseprofil for de fire ulike prøvepunktene hos Anlegg C på familienivå. B=biofilter, S=biofilm på karvegg, K=karvann, R=resirkulerende vann. Grupper som var til stede i 97% av prøver og var representert med >50 sekvenser er inkludert.

B	S	K	R
<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Burkholderiaceae</i>
<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>
<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>
<i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>Spirosomaceae</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>
<i>Spirosomaceae</i>	<i>Beijerinckiaceae</i>	<i>Spirosomaceae</i>	<i>Spirosomaceae</i>
<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Chitinophagaceae</i>
<i>Nitrospiraceae</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	<i>Sphingobacteriaceae</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>
<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	<i>Sphingobacteriaceae</i>
<i>Verrucomicrobiaceae</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Mycobacteriaceae</i>	<i>Rubritaleaceae</i>
<i>Gemmataceae</i>	<i>Sphingobacteriaceae</i>	<i>Rubritaleaceae</i>	<i>Mycobacteriaceae</i>
<i>Rhizobiales Incertae Sedis</i>	<i>Rubritaleaceae</i>	<i>Beijerinckiaceae</i>	<i>Rhizobiaceae</i>
<i>Beijerinckiaceae</i>	<i>Weeksellaceae</i>	<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Parachlamydiaceae</i>
<i>Micropepsaceae</i>	<i>Rhizobiales Incertae Sedis</i>	<i>Rhizobiales Incertae Sedis</i>	<i>Rhizobiales Incertae Sedis</i>
<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Caulobacteraceae</i>	<i>Legionellaceae</i>	<i>Weeksellaceae</i>
<i>Pirellulaceae</i>	<i>Mycobacteriaceae</i>	<i>Weeksellaceae</i>	<i>Gemmataceae</i>
<i>Blastocatellaceae</i>	<i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>Caulobacteraceae</i>	<i>Legionellaceae</i>
<i>Sphingobacteriaceae</i>	<i>Gemmataceae</i>	<i>Deinococcaceae</i>	<i>Caulobacteraceae</i>
<i>Deinococcaceae</i>	<i>Parachlamydiaceae</i>	<i>Gammaproteobacteria Incertae Sedis</i>	<i>Gemmatimonadaceae</i>
<i>Rubritaleaceae</i>	<i>Deinococcaceae</i>	<i>Saprospiraceae</i>	<i>Deinococcaceae</i>
<i>Caldilineaceae</i>	<i>Pirellulaceae</i>	<i>Methylophilaceae</i>	<i>Pirellulaceae</i>
<i>Gemmatimonadaceae</i>	<i>Bdellovibrionaceae</i>	<i>Sphingobacteriales-env.OPS 17</i>	<i>Saprospiraceae</i>
<i>Microtrichaceae</i>	<i>Legionellaceae</i>		<i>Gammaproteobacteria Incertae Sedis</i>
<i>Xanthobacteraceae</i>	<i>Devosiaceae</i>		<i>Reyranellaceae</i>
<i>Saprospiraceae</i>	<i>Reyranellaceae</i>		<i>Methylophilaceae</i>
<i>Rhizobiales-unassigned</i>	<i>Micropepsaceae</i>		<i>Bdellovibrionaceae</i>
<i>Subgroup 6-unassigned</i>	<i>Xanthobacteraceae</i>		<i>Micropepsaceae</i>
<i>Caulobacteraceae</i>	<i>Acetobacteraceae</i>		<i>Sphingobacteriales-env.OPS 17</i>
<i>Parachlamydiaceae</i>	<i>Rubinisphaeraceae</i>		
<i>Weeksellaceae</i>	<i>Blastocatellaceae</i>		
<i>Subgroup 6-uncultured</i>	<i>Gammaproteobacteria Incertae Sedis</i>		

Solibacteraceae
 (Subgroup 3)
Reyraneliaceae
Pedosphaeraceae
*Sphingobacteriales-
 AKYH767*
Methylophilaceae
Microscillaceae
Hyphomonadaceae
Devosiaceae
*Sphingobacteriales-
 env.OPS 17*
Bdellovibrionaceae
Rickettsiales-SM2D12

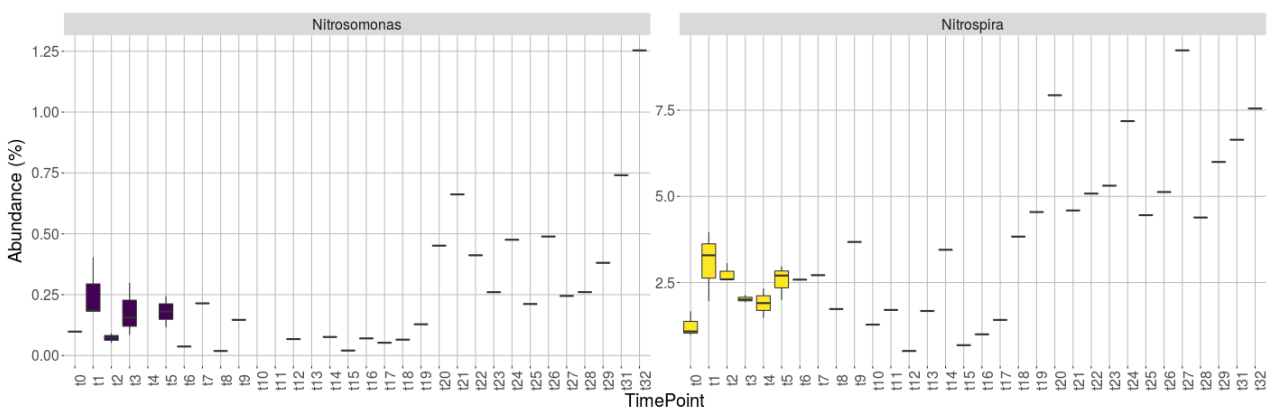
Alpha-diversitet kan være et mål på hvor mange ulike bakteriearter som er til stede og kan si noe om hvilke typer bakterier samfunnet består av og hvor stabilt det er. En høy diversitet kan indikere en stabil og god sammensetning av bakterier. Når vi sammenliknet alpha-diversitet mellom de ulike prøvepunktene, var det tydelig at biofilteret hadde det mest diverse samfunnet. Biofilm fra karvegg, karvann og resirkulerende vann hadde svært lik diversitet, når man ser på *Rikhet* (Fig. 14). At kar og resirkulerende vann var så like i diversitet kan som nevnt tidligere forklares med kort oppholdstid av vann i kar samt at anlegget har tilsats av ozon på hele vannstrømmen etter kar, før vannet går til biofilter. Prøve av resirkulerende vann er tatt før ozon. Liknende observasjoner ble gjort for *Shannon diversitets indeks*, bare små forskjeller ble observert når vannprøvene ble sammenliknet med biofilm fra karvegg. Vannprøvene hadde noe høyere diversitet.



Figur 14. Alpha-diversitet mellom ulike prøvepunkter hos Anlegg C ved bruk av to ulike analyser: *Rikhet* (totalt antall arter) og *Shannon diversitets indeks* (totalt antall arter samt likhet). Søylar med stjerner over indikerer hvilke lokasjoner som er signifikant forskjellig fra hverandre. * indikerer statistisk forskjell ved $p < 0.5$, ** ved $p < 0.1$, og *** ved $p < 0.01$. B=biofilter, K=karvann, R=resirkulerende vann, S=biofilm karvegg.

Biofilter biofilm

Samfunn fra biofilter var dominert av *Rhizobiales* (13.7% ± 3.3%), *Sphingomonadales* (10% ± 3.7%), *Betaproteobacteriales* (8.5% ± 3.5%), *Rhodobacterales* (7.8% ± 1.7%), *Chitinophagales* (7.2 ± 2.3%), *Cytophagales* (6% ± 1.7%) og *Verrucomicrobiales* (5.8% ± 2.2%). Det nitrifiserende samfunnet var representert av AOB *Nitrosomonas* og NOB *Nitrospira*. Anlegg C flyttet fisk svært ofte og forskjellig for de to målte karene, derfor er det ikke illustrert fravær av fisk i Figur 15. *Nitrosomonas* og *Nitrospira* varierte i prosjektperioden og med en tendens til å øke på slutten (fra t20-32).



Figur 15. Relativt nivå (%) av Nitrifiserende bakterier hos Anlegg C. *Nitrosomonas* til venstre og *Nitrospira* til høyre, henholdsvis første og andre steg i nitrifiseringsprosessen. Symboler for flytting av fisk ut og inn av kar er ikke lagt inn, da anlegget flyttet de to ulike fiskekarene på ulike tidspunkt.

Biofilm karvegg (Glassfiber)

I likhet med samfunnene i biofilter, var samfunn fra biofilm karvegg dominert av *Rhizobiales* (13%±6.1%), *Betaproteobacteriales* (11.2% ± 5,5%), *Sphingomonadales* (9.3% ± 3.1%), *Flavobacteriales* (9% ± 6.5%), *Rhodobacterales* (8.7% ± 4.8%), *Verrucomicrobiales* (8.4% ± 4.3%) og *Cytophagales* (6.7% ± 3%).

Karvann

Samfunnene fra karvann var dominert av *Caulobacterales* (13.2% ± 19,1%), som overraskende ikke var dominerende i biofilm. Det skjedde en endring i sammensetningen for vann ved tidspunkt t15 (juni 2018) og frem mot t27 (desember 2018), uten at man har noen forklaring på hvorfor Mikrobiotaen for denne perioden skiller seg fra de andre periodene, med blant annet et høyere nivå av *Caulobacterales*. De andre gruppene som dominerte ble observert i biofilm samfunnene: *Betaproteobacteriales* (10.8% ± 4.1%), *Sphingomonadales* (10.1% ± 4.8%),

Rhizobiales (8.3% ± 4.1%), *Flavobacteriales* (8% ± 5.1%), *Rhodobacterales* (7% ± 3.4%) og *Verrucomicrobiales* (6.3% ± 2.2%)

Resirkulerende vann

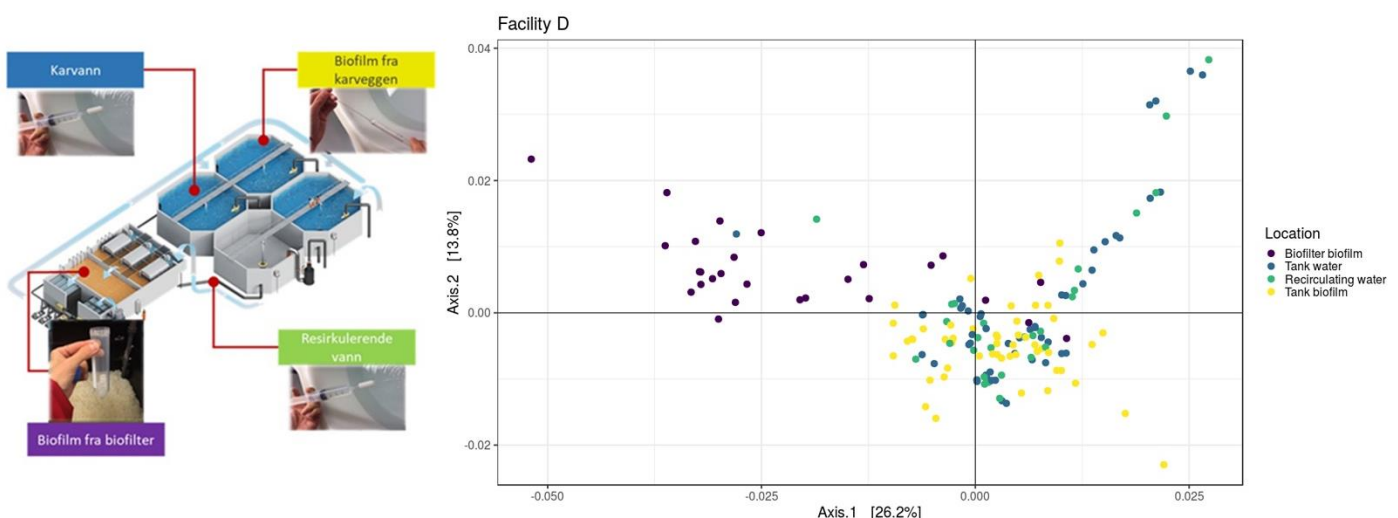
Det resirkulerende vannet var likt som karvann og besto av *Caulobacterales* (13.5% ± 18.4%), *Betaproteobacteriales* (11.7% ± 4.1%), *Sphingomonadales* (9.5% ± 4.4%), *Flavobacteriales* (9.1% ± 7.4%), *Rhizobiales* (7.8% ± 3.8%), *Rhodobacterales* (6.5% ± 2.6%) og *Verrucomicrobiales* (6.4% ± 2.3%).

Kjemisk og fysisk vannkvalitet

Figurer for anleggets kjemiske og fysiske vannkvalitet i perioden er presentert i Vedlegg 1.

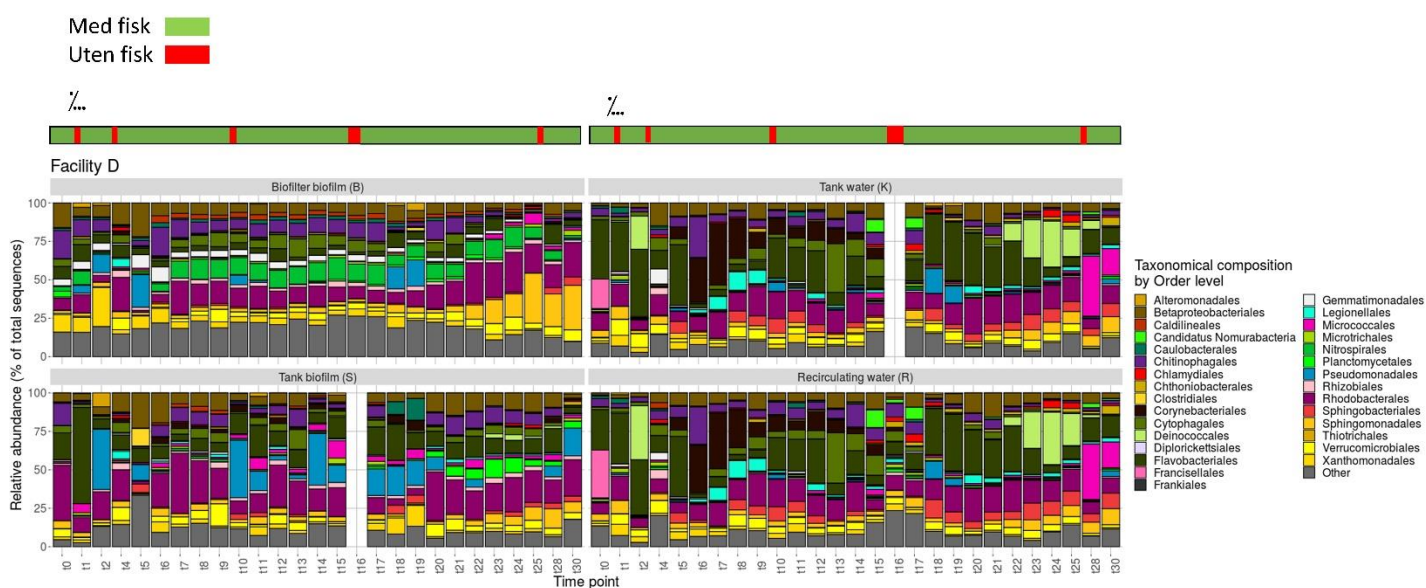
6.4.4 Anlegg D

Anlegg D hadde ikke like tydelige grupperinger som Anlegg A og C, men man ser en viss gruppering i biofilm fra karvegg (gul), biofilm fra biofilter (lilla) og vann (blå og grønn) (Fig. 16). Det var uventet at biofilm fra karvegg grupperte seg noe med vannprøvene.



Figur 16. Mikrobiotaprofil (PCoA) for de ulike prøvene tatt hos Anlegg D. Biofilter biofilm, biofilm på karvegg, vann i kar og resirkulerende vann. Hvert punkt i grafen representerer en mikrobiotaprofil som dannes fra mikrobiota sammensetningen for hver prøve. Hver prøvelokasjon har hver sin farge. Når to punkter overlapper indikerer det at de har identisk sammensetning, er de langt fra hverandre indikerer det forskjellig.

Anlegg D hadde et relativt stabilt biofilter i likhet med flere av anleggene i prosjektet. Karvann, biofilm på karvegg og resirkulerende vann var derimot mer ustabil i utvalgte perioder (Fig. 17). Anlegget hadde 6 fiskegrupper som ble fulgt i perioden for de aktuelle to karene (Figur 17). Anlegget reduserte saliniteten helt i starten av prosjektet (mellom t0 og t1) fra ca. 15 til 3 ‰. Det ser derimot ikke ut til at det har påvirket biofilteret i særlig stor grad med tanke på sammensetning på orden nivå. Det skal derimot legges til at det er få prøvepunkter til å fange opp eventuelle endringer av redusert salinitet. Det er kjent at det å redusere salinitet kan påvirke mikrobiota mindre enn det å øke saliniteten. Også hos dette anlegget er resirkulerende vann og karvann lik i sammensetning (Figur 17), sannsynligvis som følge av kort oppholdstid i kar som nevnt tidligere, samt at anlegget ikke har desinfeksjon i sløyfa.



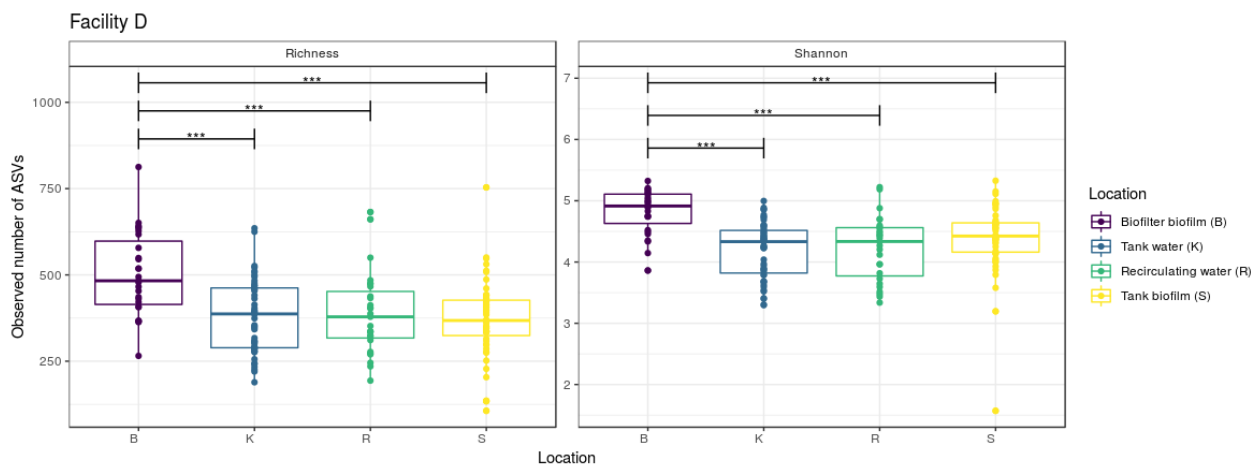
Figur 17. Relativt nivå (%) av ulike bakterier på orden nivå for anlegg D. Biofilter, karvann, biofilm karvegg og resirkulerende vann fra t0 (april 2018) til t30 (juni 2019). ‰=Redusert salinitet mellom t0 og t1 (fra ca. 15 til 3 ‰).

Baseprofilen viste at biofilter hadde høyest diversitet, som forventet og lavest i biofilm fra karvegg. Resirkulerende vann og karvann hadde også lik baseprofil (Tabell 5).

Tabell 5. Baseprofil for de fire ulike prøvepunktene hos Anlegg D på familienivå. B=biofilter, S=biofilm på karvegg, K=karvann, R=resirkulerende vann. Grupper som var til stede i 97% av prøver og var representert med >50 sekvenser er inkludert.

B	S	K	R
<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>
<i>Nitrospiraceae</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>
<i>Saprospiraceae</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderiaceae</i>
<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Sphingobacteriaceae</i>	<i>Sphingobacteriaceae</i>
<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Saprospiraceae</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Spirosomaceae</i>
<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Spirosomaceae</i>	<i>Saprospiraceae</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>
<i>Gemmatimonadaceae</i>	<i>Pirellulaceae</i>	<i>Spirosomaceae</i>	<i>Saprospiraceae</i>
<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Rubritaleaceae</i>	<i>Rubritaleaceae</i>	<i>Rubritaleaceae</i>
<i>Spirosomaceae</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Rhodanobacteraceae</i>
<i>Pirellulaceae</i>	<i>Sphingobacteriaceae</i>	<i>Legionellaceae</i>	<i>Pirellulaceae</i>
<i>Caldilineaceae</i>	<i>Caulobacteraceae</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>
<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Pirellulaceae</i>	<i>Parachlamydiaceae</i>
<i>Thermomicrobiales-JG30-KF-CM45</i>		<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Chitinophagaceae</i>
<i>Rubritaleaceae</i>		<i>Moraxellaceae</i>	<i>Gemmatimonadaceae</i>
<i>Verrucomicrobiaceae</i>		<i>Parachlamydiaceae</i>	<i>Chitinophagales-uncultured</i>
<i>Hyphomonadaceae</i>		<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Rickettsiales-SM2D12</i>
<i>Pedosphaeraceae</i>		<i>Gemmatimonadaceae</i>	<i>Microtrichaceae</i>
<i>Nitrosomonadaceae</i>		<i>Microtrichaceae</i>	<i>Moraxellaceae</i>
<i>Gemmataceae</i>		<i>Caldilineaceae</i>	<i>Hyphomonadaceae</i>
<i>Thermomicrobiales-AKYG1722</i>		<i>Rickettsiales-SM2D12</i>	<i>Caldilineaceae</i>
<i>Reyraneliaceae</i>		<i>Chitinophagales-uncultured</i>	<i>Nitrospiraceae</i>
<i>Hyphomicrobiaceae</i>		<i>Hyphomonadaceae</i>	<i>Micavibrionales-uncultured</i>
<i>Micropepsaceae</i>		<i>Micavibrionales-uncultured</i>	<i>Thermomicrobiales-AKYG1722</i>
<i>Acetobacteraceae</i>		<i>Paracaedibacteraceae</i>	<i>Rhizobiaceae</i>
<i>Rhizobiaceae</i>		<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Paracaedibacteraceae</i>
<i>Parachlamydiaceae</i>		<i>Bdellovibrionaceae</i>	
<i>Microtrichaceae</i>		<i>Acetobacteraceae</i>	
<i>Polyangiaceae</i>			
<i>Xanthobacteraceae</i>			
<i>Devosiaceae</i>			
<i>Rubinisphaeraceae</i>			
<i>Isosphaeraceae</i>			
<i>Azospirillales Incertae Sedis</i>			
<i>Planctomycetales-uncultured</i>			
<i>Caulobacteraceae</i>			
<i>Microtrichales-uncultured</i>			
<i>Solirubrobacterales-67-14</i>			
<i>Rickettsiales-SM2D12</i>			
<i>Steroidobacteraceae</i>			

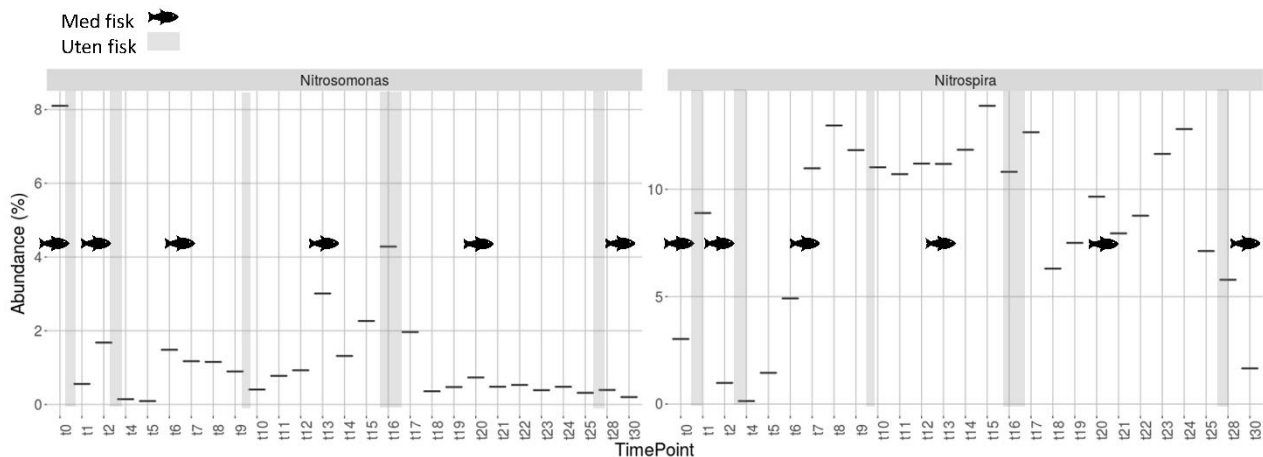
Alpha-diversitet kan være et mål på hvor mange ulike bakteriearter som er til stede og kan si noe om hvilke typer bakterier samfunnet består av og hvor stabilt det er. En høy diversitet kan indikere en stabil og god sammensetning av bakterier. Alpha-diversitet viste at biofilteret hadde høyest diversitet både når man så på antall arter og likhet, sammenliknet med de andre prøvelokasjonene. Resirkulerende vann og karvann var like i diversitet og dette kan forklares med kort oppholdstid og at anlegget ikke har desinfeksjon i sløyfa. Det var ingen signifikante forskjeller mellom diversitet av vann og biofilm fra karvegg. (Figur 18).



Figur 18. Alpha diversitet mellom ulike prøvepunkter hos Anlegg D ved bruk av to ulike analyser: *Rikhet* (totalt antall arter) og Shannon diversitets indeks (totalt antall arter samt likhet). Søylor med stjerner over indikerer hvilke lokasjoner som er signifikant forskjellig fra hverandre. * indikerer statistisk forskjell ved $p < 0.5$, ** ved $p < 0.1$, og *** ved $p < 0.01$. B=biofilter, K=karvann, R=resirkulerende vann, S=biofilm karvegg

Biofilter biofilm

Samfunnene i biofilm var representert av *Rhodobacterales* ($13.5\% \pm 6.6\%$), *Nitrospirales* ($8.4\% \pm 4.1\%$), *Betaproteobacterales* ($7.6\% \pm 4.1\%$), *Sphingomonadales* ($6.6\% \pm 8.5\%$), *Flavobacterales* ($5\% \pm 3.1\%$) and *Xanthomonadales* ($5\% \pm 4.9\%$). Sammenliknet med andre biofilter i prosjektet, hadde Anlegg D et konsistent høyt nivå av NOB *Nitrospira*. I tillegg besto biofilteret av AOB *Nitrosomonas*. Anlegg D modnet ikke biofilter som noen av de andre anleggene ved flytting av fisk ut av kar (Anlegg A, B og E) (Fig. 19) og man ser nivåene til en viss grad følger størrelse av fisk/biomasse. Det ser ikke ut til at de nitrifiserende bakteriene har tapt seg noe særlig uten modning av biofilter ved brakklegging. Nitrogenprodukter i perioden kan sees i Vedlegg 1.



Figur 19. Relativt nivå (%) av Nitrifiserende bakterier hos Anlegg D. *Nitrosomonas* til venstre og *Nitrospira* til høyre, henholdsvis første og andre steg i nitrifiseringsprosessen. Grå felter symboliserer fisk ut av system, fisk symboliserer fisk i system.

Biofilm karvegg (Betong+membran)

Samfunnene i biofilm fra karvegg var dominert av *Rhodobacterales* (18.8% ± 9.3%), *Flavobacteriales* (12.8% ± 10.2%), veldig svingende *Pseudomonadales* (9% ± 11.5%), *Betaproteobacteriales* (8.8% ± 5.2%), and *Chitinophagales* (5.7% ± 4.3%).

Karvann

Til forskjell fra vannsamfunnene fra de andre anleggene var samfunnene fra Anlegg D dominert av få grupper. Dette var uventet da anlegget verken benytter tilsats av UV eller ozon i sløyfa. Ser man derimot på alpha-diversitet i Figur 18, er denne like høy som de andre anleggene. *Flavobacteriales* var den mest dominerende gruppen, men var veldig dynamisk i perioden (20% ± 13%). Andre dominerende grupper var *Rhodobacterales* (13.6% ± 4.4%), *Betaproteobacteriales* (6.6% ± 3.6%), varierende *Corynebacteriales* (6.3% ± 10.4%) og *Chitinophagales* (5% ± 5.1%).

Resirkulerende vann

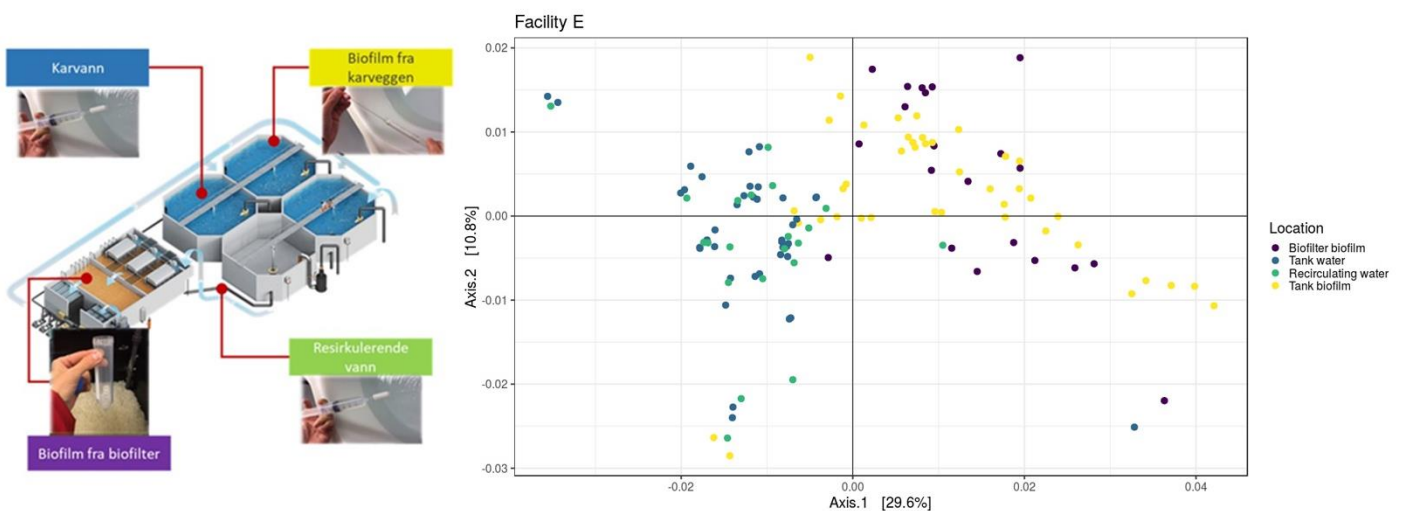
Samfunnene i det resirkulerende vannet var svært lik samfunnene i karvannet, som kan forklares med fravær av desinfeksjon. Mest dominerende var *Flavobacteriales*, men var varierende over tid (18.1% ± 11.6%). Samfunnet besto også av *Rhodobacterales* (13.2% ± 4.6%), *Betaproteobacteriales* (6.5% ± 3.5%), varierende *Corynebacteriales* (6% ± 9.8%) og *Chitinophagales* (5% ± 5.1%).

Kjemisk og fysisk vannkvalitet

Figurer for anleggets kjemiske og fysiske vannkvalitet i perioden er presentert i Vedlegg 1.

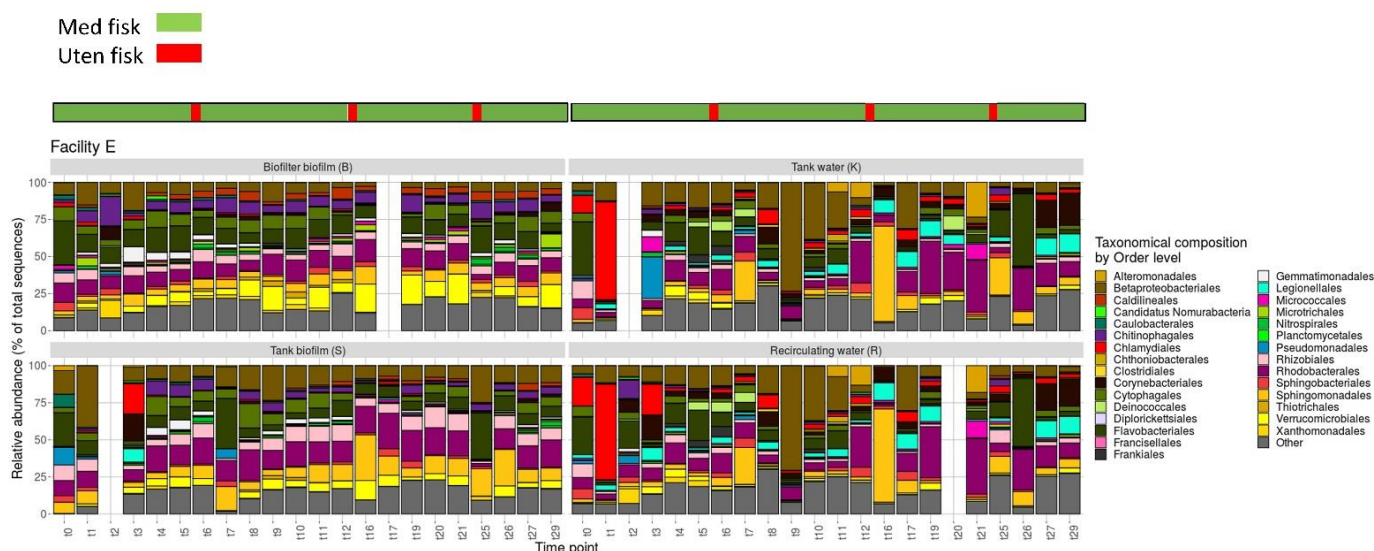
6.4.5 Anlegg E

Anlegg B hadde ikke like tydelige grupperinger som Anlegg A og C, men man ser en viss gruppering i biofilm fra karvegg (gul), biofilm fra biofilter (lilla) og vann (blå og grønn) (Fig. 20).



Figur 20. Mikrobiotaprofil (PCoA) for de ulike prøvene tatt hos Anlegg E. Biofilter biofilm, biofilm på karvegg, vann i kar og resirkulerende vann. Hvert punkt i grafen representerer en mikrobiotaprofil som dannes fra mikrobiota sammensetningen for hver prøve. Hver prøvelokasjon har hver sin farge. Når to punkter overlapper indikerer det at de har identisk sammensetning, er de langt fra hverandre indikerer det forskjellig.

Anlegg E hadde 4 ulike generasjoner av fisk i karene gjennom prosjektperioden. Biofilter var relativt stabilt gjennom perioden (Figur 21). Anlegget vasker biofilter jevnlig uten bruk av kjemikalier og det ser ikke ut til å ha påvirket sammensetningen i stor grad når man ser på bakterier på orden nivå. Karvann, resirkulerende vann og karvegg biofilm var mer ustabil. Dette mønsteret var felles for alle anlegg.



Figur 21. Relativt nivå (%) av ulike bakterier på orden nivå for anlegg E. Biofilter, karvann, biofilm karvegg og resirkulerende vann fra t0 (april 2018) til t29 (juni 2019).

I motsetning til Figur 21, viser Tabell 6 baseprofilen for de ulike prøvepunktene for Anlegg E. Biofilter var det mest diverse samfunnet som forventet. Resirkulerende vann var det andre mest diverse samfunnet, etterfulgt av biofilm fra karvegg og karvann. At karvann hadde lavere diversitet enn resirkulerende vann kan muligens forklares med desinfeksjon av delstrøm med ozon før kar. Prøve av det resirkulerende vannet var tatt av vann som ikke var ozonert, før vannet blandes med ozonert vann.

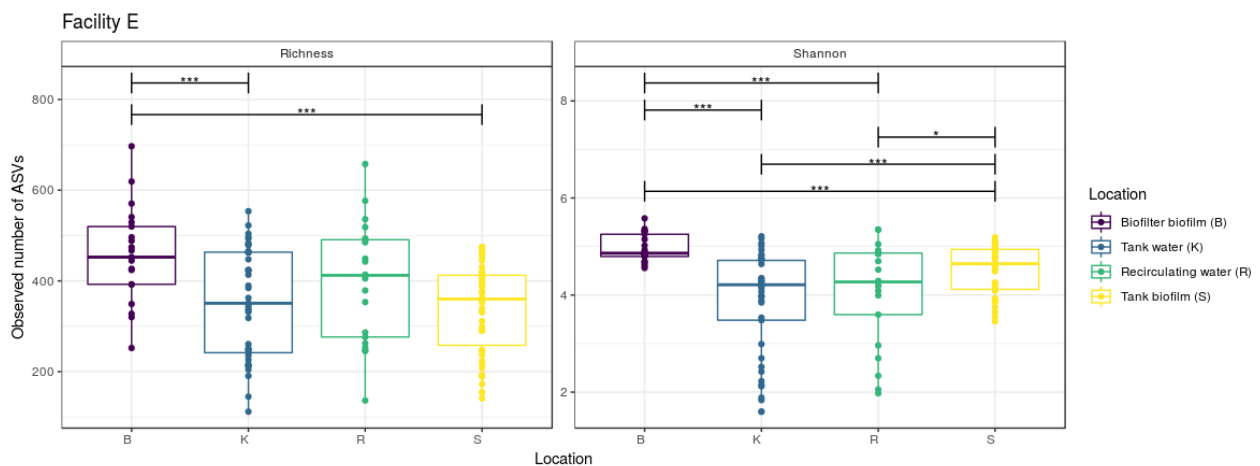
Tabell 6. Baseprofil for de fire ulike prøvepunktene hos Anlegg E på familienivå. B=biofilter, S=biofilm på karvegg, K=karvann, R=resirkulerende vann. Grupper som var til stede i 97% av prøver og var representert med >50 sekvenser er inkludert.

B	S	K	R
<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>
<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderiaceae</i>
<i>Spirosomaceae</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>
<i>Rubritaleaceae</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Legionellaceae</i>	<i>Legionellaceae</i>
<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Spirosomaceae</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>
<i>Saprospiraceae</i>	<i>Rubritaleaceae</i>	<i>Mycobacteriaceae</i>	<i>Mycobacteriaceae</i>
<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Parachlamydiaceae</i>	<i>Parachlamydiaceae</i>
<i>Caldilineaceae</i>	<i>Pirellulaceae</i>	<i>Spirosomaceae</i>	<i>Spirosomaceae</i>
<i>Pirellulaceae</i>	<i>Saprospiraceae</i>	<i>Pirellulaceae</i>	<i>Pirellulaceae</i>
<i>Gemmatimonadaceae</i>	<i>Devosiaceae</i>	<i>Sphingobacteriaceae</i>	<i>Sphingobacteriaceae</i>
<i>Sphingobacteriaceae</i>	<i>Gemmatimonadaceae</i>	<i>Rubritaleaceae</i>	<i>Rubritaleaceae</i>
<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Sphingobacteriaceae</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Rhizobiaceae</i>
<i>Nitrosomonadaceae</i>	<i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>Xanthobacteraceae</i>	<i>Saprospiraceae</i>

<i>Thermomicrobiales- AKYG1722</i>	<i>Beijerinckiaceae</i>	<i>Microtrichaceae</i>	<i>Xanthobacteraceae</i>
<i>Microtrichaceae</i>	<i>Bdellovibrionaceae</i>	<i>Devosiaceae</i>	<i>Gammaproteobacteria- unassigned</i>
<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Microtrichaceae</i>
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Caulobacteraceae</i>	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Devosiaceae</i>
<i>Xanthobacteraceae</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Beijerinckiaceae</i>	<i>Hyphomicrobiaceae</i>
<i>Reyraneliaceae</i>	<i>Parachlamydiaceae</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	<i>Streptococcaceae</i>
<i>Gemmataceae</i>	<i>Legionellaceae</i>	<i>Rickettsiaceae</i>	<i>Reyraneliaceae</i>
<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Thermomicrobiales-JG30- KF-CM45</i>
<i>Verrucomicrobiaceae</i>	<i>Hyphomonadaceae</i>	<i>Paracaedibacteraceae</i>	<i>Chitinophagaceae</i>
<i>Mycobacteriaceae</i>	<i>Acetobacteraceae</i>		<i>Beijerinckiaceae</i>
<i>Hyphomonadaceae</i>			<i>Hyphomonadaceae</i>
<i>Devosiaceae</i>			<i>Isosphaeraceae</i>
<i>Nitrospiraceae</i>			<i>Babeliales-UBA12409</i>
<i>Thermomicrobiales-JG30- KF-CM45</i>			<i>Caulobacteraceae</i>
<i>Parachlamydiaceae</i>			<i>Rhizobiales Incertae Sedis</i>
<i>Micavibrionales- uncultured</i>			<i>Paracaedibacteraceae</i>
<i>Rubinisphaeraceae</i>			<i>Holosporaceae</i>
<i>Azospirillales Incertae Sedis</i>			<i>Moraxellaceae</i>
<i>Bdellovibrionaceae</i>			<i>Solirubrobacterales67-14</i>
<i>Rhizobiales Incertae Sedis</i>			
<i>Methylophilaceae</i>			
<i>Beijerinckiaceae</i>			
<i>Pedosphaeraceae</i>			
<i>Hyphomicrobiaceae</i>			
<i>Crocinitomicaceae</i>			
<i>Caulobacteraceae</i>			
<i>Planctomycetales- uncultured</i>			
<i>Solirubrobacterales-67-14</i>			
<i>Isosphaeraceae</i>			
<i>Steroidobacteraceae</i>			
<i>Nannocystaceae</i>			
<i>Microtrichales-uncultured</i>			
<i>NS9 marine group</i>			
<i>Tepidisphaeraceae</i>			

Alpha-diversitet 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. En høy diversitet kan indikere en stabil og god sammensetning av bakterier. Når alpha-diversitet ble sammenliknet mellom ulike prøvelokasjoner, hadde biofilteret det mest diverse samfunnet, både ved bruk av *Rikhet* og

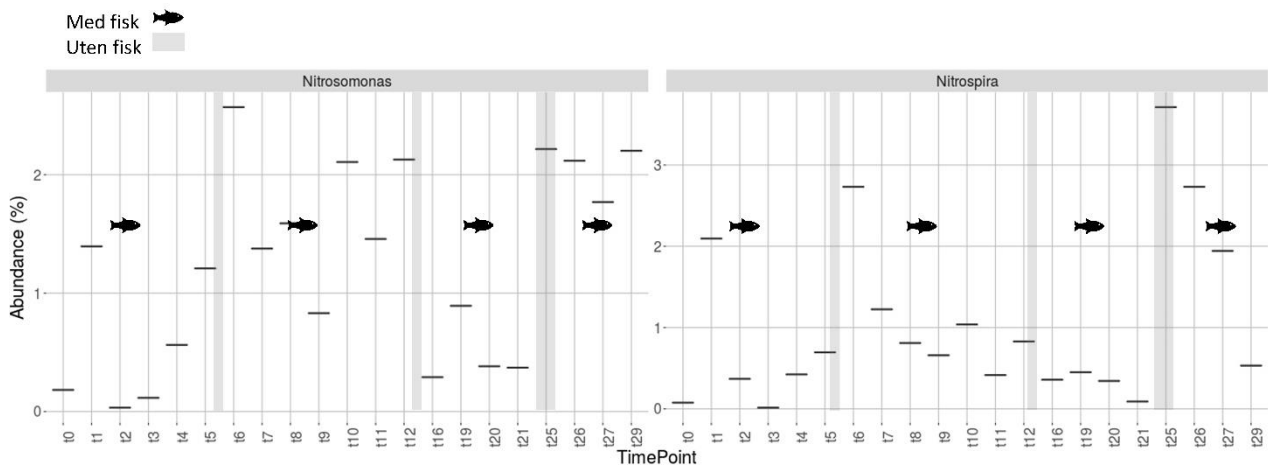
Shannon diversitet (Figur 22). Resirkulerende vann og karvann var ikke signifikant forskjellige, selv om *Rikhet* viste noe høyere diversitet for resirkulerende vann, som kan forklares som nevnt med plassering av ozon. Det var ingen forskjeller mellom vannsamfunn og karbiofilm når bare arter ble tatt med i betraktning (*Rikhet*), men når likhet ble tatt med i betraktning (*Shannon*), var samfunnene fra biofilm karvegg signifikant mer diverse enn vannsamfunnene. Dette var uventet og ble ikke funnet for de andre anleggene. Dette indikerer at vann samfunnene var dominert av få arter sammenliknet med biofilm fra tankvegg. Det er ukjent hvorfor dette oppstår.



Figur 22. Alpha diversitet mellom ulike prøvepunkter hos Anlegg E ved bruk av to ulike analyser: *Rikhet* (totalt antall arter) og *Shannon diversitets indeks* (totalt antall arter samt likhet). Søylor med stjerner over indikerer hvilke lokasjoner som er signifikant forskjellig fra hverandre. * indikerer statistisk forskjell ved $p < 0.5$, ** ved $p < 0.1$, og *** ved $p < 0.01$. B=biofilter, K=karvann, R=resirkulerende vann, S=biofilm karvegg.

Biofilter biofilm

Samfunnene i biofilteret var stabil over tid med minimale endringer. De mest dominerende gruppene var *Flavobacteriales* ($12.3\% \pm 5\%$), *Rhodobacterales* ($10.3\% \pm 2.7\%$), *Verrucomicrobiales* ($8.7\% \pm 6.4\%$), *Chitinophagales* ($7.2\% \pm 3.8\%$), *Betaproteobacteriales* ($7.1\% \pm 4.1\%$), *Cytophagales* ($6.5\% \pm 3.1\%$), *Sphingomonadales* ($5.7\% \pm 2.3\%$) og *Rhizobiales* ($5.1\% \pm 1.7\%$). Det nitrifiserende samfunnet var representert av AOB *Nitrosomonas* og NOB *Nitrospira*, hvor *Nitrospira* var den mest dominerende. Hos Anlegg E ser man også tydelig effekten av modning av biofilter ved flytting av fisk ut av kar (som for Anlegg A og B), ved en økning av nitrifiserende bakterier i perioder uten fisk (Fig. 23). Nitrogenprodukter i perioden kan sees i Vedlegg 1.



Figur 23. Relativt nivå (%) av Nitrifiserende bakterier hos Anlegg E. *Nitrosomonas* til venstre og *Nitrospira* til høyre, henholdsvis første og andre steg i nitrifiseringsprosessen. Grå felter symboliserer fisk ut av system, fisk symboliserer fisk i system ved de ulike prøvepunktene.

Biofilm karvegg (Betong+membran)

Diversitet for biofilm fra karvegg var overraskende høyere enn diversiteten i vann (alpha-diversitet) (Figur 22). Baseprofilen var dermed lik mellom biofilm karvegg og karvann, og hadde lavere diversitet enn resirkulerende vann (Tabell 6). Dominerende grupper var *Rhodobacterales* (14.6% ± 8.8%), *Betaproteobacteriales* (14% ± 7.8%), *Sphingomonadales* (10.8% ± 6.8%), *Flavobacteriales* (10% ± 8.3%), *Rhizobiales* (7.9% ± 3.3%) and *Cytophagales* (5.8% ± 4%).

Karvann

De mest dominerende gruppene i karvannet var *Betaproteobacteriales* (14,9% ± 16,5%), *Rhodobacterales* (13.4% ± 10.5%), *Flavobacteriales* (9.7% ± 12.1%), *Sphingomonadales* (8.2% ± 14.6%) og *Chlamydiales* (6.4% ± 13.9%). Et høyt standardavvik kan observeres for de mest dominerende gruppene, noe som indikerer store variasjoner i nivå i prosjektperioden. I perioden t0 og t1 var det høy andel av *Chlamydiales* som man også registrerte for anlegg B. *Chlamydiales* har en rekke patogene arter, som nevnt. *Betaproteobacteriales* dominerte mellom t9 og t11, mens *Sphingomonadales* ved t16. *Rhodobacterales* var mest dominerende mellom t17 og t26.

Resirkulerende vann

Svært like resultater kan observeres for resirkulerende vann som for karvann: *Betaproteobacteriales* (14.3% ± 15.8%), *Rhodobacterales* (12.7% ± 10.2%), *Flavobacteriales* (9.5%

$\pm 10.8\%$), *Sphingomonadales* ($7.7\% \pm 13.7\%$), *Chlamydiales* ($7.5\% \pm 14.2\%$) og *Corynebacteriales* ($5.6\% \pm 5.7\%$). Perioder med økte nivåer av gruppene var de same som for samfunnene i karvann.

Kjemisk og fysisk vannkvalitet

Figurer for anleggets kjemiske og fysiske vannkvalitet i perioden er presentert i Vedlegg 1.

6.4.6 Sammendrag mikrobiota sammensetning og dynamikk hos alle anlegg

Sammensetning av mikrobiota var ikke bare ulik mellom anlegg, men varierte også hos hvert anlegg, over tid. Sammensetningen av mikrobiota var hos noen anlegg relativt stabil (Anlegg A) når man ser på bakterier på orden nivå over tid. Hos andre var den tidvis stabil (Anlegg C), mens hos andre var den mer ustabil (Anlegg B, D og E). Hvorfor anlegg A har en mer stabil mikrobiota enn de andre er vanskelig å konkludere, da anleggene er så forskjellige i drift, at det ikke vil være mulig å finne enkelte driftsparametere som gjør dette mer stabilt. Anlegget skiller seg noe ut fra de andre ved at de har to biofilter, med desinfeksjon mellom disse. De fire ulike prøvelokasjonene fra Anlegg A og C grupperte seg i tre ulike grupper, biofilm fra biofilter, biofilm karvegg og vann. De resterende tre anleggene ikke hadde like tydelige grupperinger. Hvilken betydning dette har er ukjent.

Bakteriesammensetningen i fiskekar og resirkuleringsløyfa var forventet å være ulike. Når vi sammenliknet bakteriesammensetningen i vannet fra fiskekar og vannet fra resirkuleringsløyfa, fant vi at disse var svært like i sammensetning hos alle anleggene. Dette kan forklares med den lave oppholdstida vannet har i fiskekarene (20-60 minutter). Bakteriene rekker ikke å vokse i selve karen før det går videre i resirkuleringsløyfa og dermed vil de samme bakterietypene være både i karvannet og det som går rundt i løyfa (Bakke et al. 2017). I tillegg bidrar den lange totale oppholdstida for hele systemet til at det dannes en "hus flora" som beskrevet i kapittel 6.3. Når vi derimot sammenliknet alpha-diversitet mellom anleggene så vi en tendens til at anlegg med desinfeksjon rett før kar hadde høyest diversitet for resirkulerende vann, sammenliknet med karvann. Prøven av resirkulert vann er tatt før desinfeksjon. Anlegg med desinfeksjon etter kar hadde en tendens til lik diversitet mellom resirkulerende vann og karvann. Prøven av resirkulert vann er tatt etter biofilter og før desinfeksjon.

I systemer med lav oppholdstid av vann, som er benyttet i RAS, vil det meste av bakterieaktiviteten være assosiert med overflater og i biofilm (Wietz et al. 2009). Bakteriesammensetningen i vannet var typisk forskjellig fra den i biofilm, som også er funnet i tidligere studier (Bartelme et al. 2017). Disse biofilmene har ulike funksjoner og derav vil det være ulik sammensetning av bakterier. Biofilteret blir sjelden vasket ned, og er et stabilt miljø. Flere av anleggene har hatt operative biofilter på 1-5 år. Biofilm på karvegg blir derimot fjernet når fisk flyttes og er mye mer ustabil i sammensetning og diversitet. Noen av anleggene flyttet fisk svært ofte. Biofiltrene for de fem ulike anleggene hadde ulik sammensetning av bakterier, som tidligere er blitt foreslått som et resultat av ulike driftsprosedyrer og design (Blancheton et al. 2013, Bartelme et al. 2017), samt seleksjonspress (Kap. 6.3). Alle de fem anleggene hadde noe lik diversitet i biofilter. Når det gjelder stabil bakteriesammensetning i biofilter kan man si at alle anleggene bortsett fra Anlegg B hadde stabile bakteriesamfunn i biofilter, men at det var noen variasjoner. Anleggene har ulik praksis for tidspunkt for å ta ned biofilteret og desinfisere. Ett av anleggene, Anlegg E, tar ned biofilteret en gang pr år og desinfiserer, mens resterende tar bare ned ved sykdomsutbrudd (Tabell 1). Tre av anleggene (A, B og E) modner biofilter ved fravær av fisk, som fører til økning av nitrifiserende bakterier i biofilter, men da nitrifiserende bakterier utgjør bare en lav andel av samfunnene i biofilter, har ikke dette stort utslag på sammensetningen. Nitrifiserende bakterier i biofilter består av flere arter, en gruppe er ammonium oksiderende bakterier (AOB), typisk *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosovibrio* og en gruppe er nitritt oksiderende bakterier (NOB), typisk *Nitrospira*, *Nitrobacter* og *Nitrotoga* (Schreier et al. 2010, Bartelme et al. 2017). Hos anleggene ble bare *Nitrosomonas* og *Nitrospira* detektert i varierende grad i løpet av prosjektperioden. Det finnes også bakterier som kan oksidere hele prosessen fra ammonium til nitrat (commamox, klassifisert som *Nitrospira*). Mikrobefundet i biofilter besto av lave nivåer av nitrifiserende bakterier (0-16 %), og dette varierte over tid og mellom anlegg. Det er typisk færre nitrifiserende enn heterotrofe bakterier i biofilter (Blancheton et al. 2013). Dette kan komme av at disse bakteriene vokser sakte, i motsetning til heterotrofe bakterier som bryter ned organisk materiale og vokser hurtigere. De heterotrofe samfunnene påvirker også biofilter samfunnene og også biofilterets funksjon. Disse bakteriene konkurrerer om oksygen og plass med de nitrifiserende bakteriene. Andelen *Nitrospira* var generelt høyere enn for *Nitrosomonas* og andelen varierte i produksjonssyklusen. Hos flere anlegg så man at de nitrifiserende bakteriene økte like før og når fisk flyttes ut av systemet, som sannsynlig er et resultat av tilsetning av ammoniumklorid og liknende like før og når karene er tomme, for å fôre biofilteret ved fravær av fisk og fôr. Denne

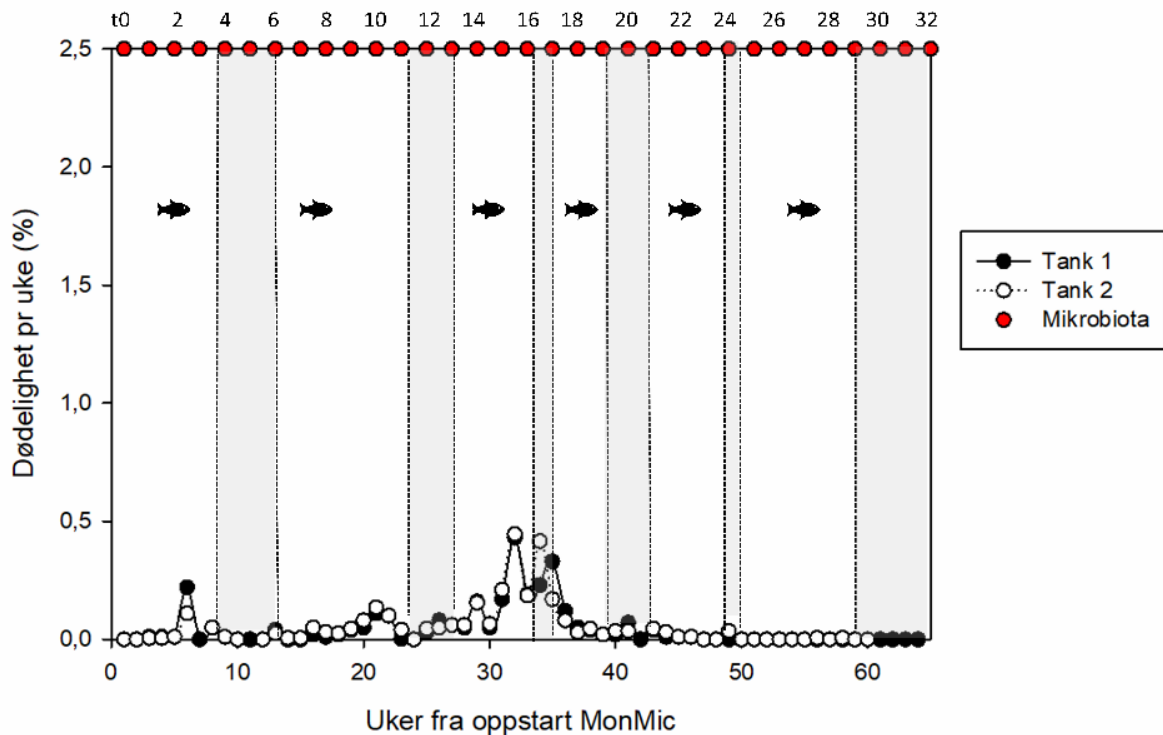
fôringen har hatt stort utslag på andel nitrifiserende bakterier hos anleggene som praktiserer dette (A, B og E). To av anleggene benyttet ikke modning (Anlegg C og D), og man ser da fravær av disse toppene av nitrifiserende bakterier. Det ser derimot ikke ut til at fravær av modning har påvirket biofilteret negativt. Hos noen anlegg så man også en økning i nitrifiserende bakterier ved økende størrelse av fisk, sannsynlig som et resultat av økende produksjon av ammonium. Ikke uventet fant man høyeste nivå av nitrifiserende bakterier i biofilteret, men nitrifiserende bakterier var også til stede i biofilm på karvegg og i vann (Figur ikke vist).

6.5 Dødelighet

Dødeligheten varierte mellom anlegg, men også mellom ulike batcher av fisk innad i anleggene. Alle anleggene rapporterte at dødeligheten var innenfor normale verdier for deres anlegg. Anleggene hadde en forøket dødelighet ved flytting av fisk og vaksinerings, som et resultat av mekaniske skader og/eller stress. I forbindelse med vaksinerings skjer det også en utsortering av fisk med lyter. Lavest dødelighet hadde de fire anleggene med størst fisk. Anlegg B med startfôring hadde en noe høyere dødelighet. Det er kjent at startfôring har høyere dødelighet enn produksjon av større fisk (Tørud et al. 2019). Det ser ikke ut til å være en sammenheng mellom ustabil mikrobiota og forøket dødelighet, da man bare hos et av anleggene (A) fant korrelasjon mellom mikrobiota og dødelighet (se kapittel 6.6). Det ser dermed ut til at det er ulike normaltilstander hos ulike anlegg, som fungerer bra for hvert anlegg. Anlegg A hadde en dødelighet pr uke på 0.05%, Anlegg B pr dag 0.12%, Anlegg C pr dag 0.01%, Anlegg D pr uke 0.06%/0.13%, Anlegg E pr dag 0.02%.

Anlegg A

Anlegg A hadde en gjennomsnittlig dødelighet pr uke på 0.05 ± 0.1 % for begge de fulgte karene (Figur 24). Anlegget oppgir at økning i dødelighet skyldes at fisken vaksineres og det oppstår noe håndteringsrelatert dødelighet.

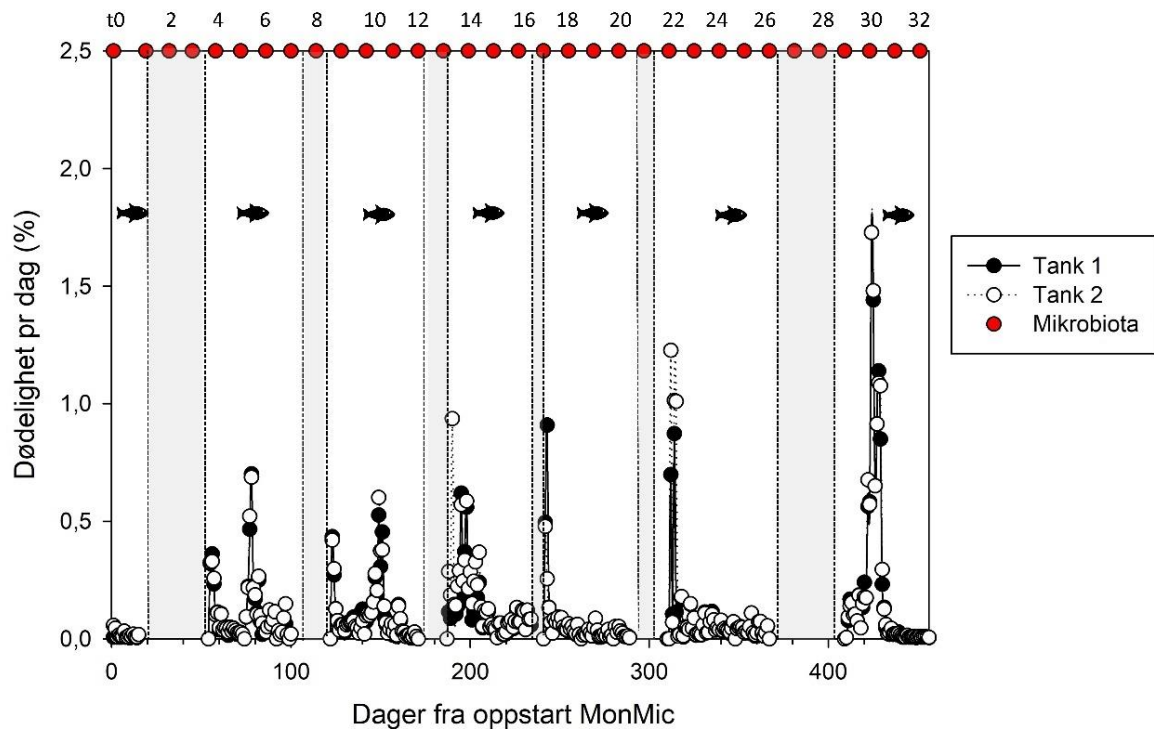


Figur 24. Dødelighet gjennom prosjektperioden for anlegg A pr uke (%). Fisk=med fisk i systemet. Røde punkter øverst i figuren illustrerer de 33 ulike prøvepunktene for mikrobiota (t0-t32). Tallene viser dødelighet pr uke for seks ulike fiskegrupper.

Anlegg B

Anlegg B hadde en gjennomsnittlig dødelighet pr dag på 0.12 ± 0.2 %. Anlegget rapporterte om noe økt dødelighet noen uker etter flytting av fisk gjennom hele prosjektperioden (ca. 10 ganger forhøyet dødelighet) (Figur 25). Om dette har sammenheng med vannmikrobiotaen er usikkert. Mye av dødeligheten ble av anlegget forklart med sopp og i forbindelse med flytting og vaksinerings, samt utfordringer med hydraulikk i kar. Anlegget hadde noe høyere dødelighet enn de resterende anleggene, som kan forklares med startfôring (Tørud et al. 2019). Anlegget bygget om RAS-avdelingen ved t28, for å få bedre hydraulikk i karene. Like etter denne ombyggingen kom det en økning i dødelighet (t30, fiskegruppe 7) som skyldtes tekniske problemer, som førte til at

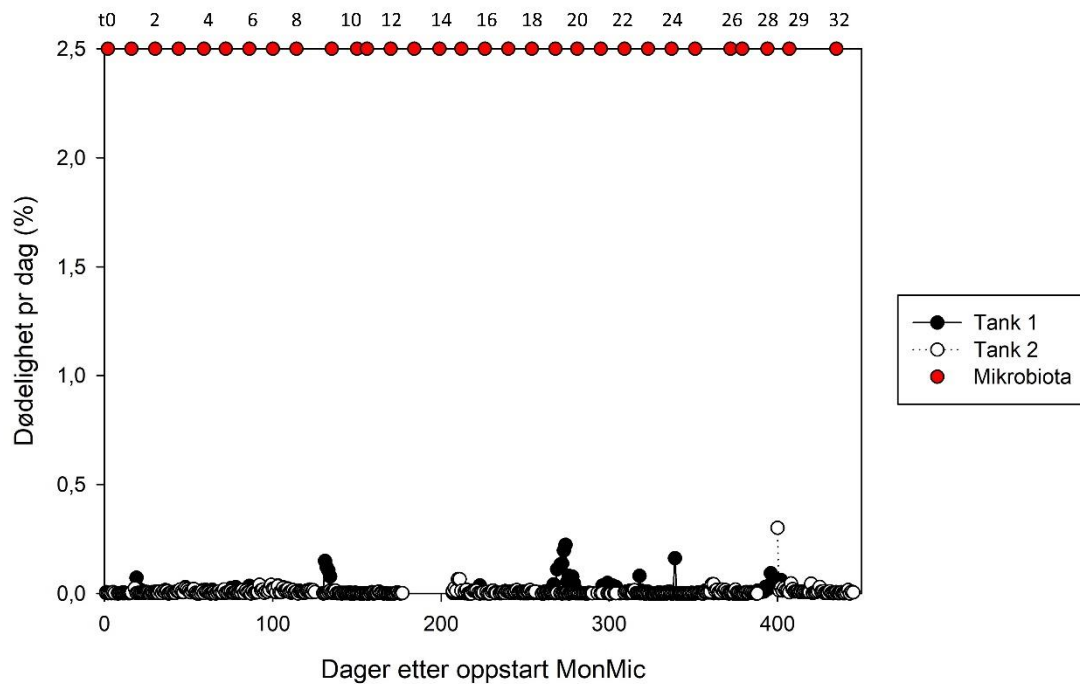
partikler ikke ble fjernet fort nok ut fra karet. Dette ble så forbedret og dødeligheten sank og stabiliserte seg (også etter MonMic-prosjektet var avsluttet).



Figur 25. Dødelighet pr dag gjennom prosjektperioden for anlegg B pr dag (%). Røde punkter øverst i figuren illustrerer de 33 ulike prøvepunktene for mikrobiota (t0-t32). Fisk=fisk i systemet, grå felter=fisk flyttet ut.

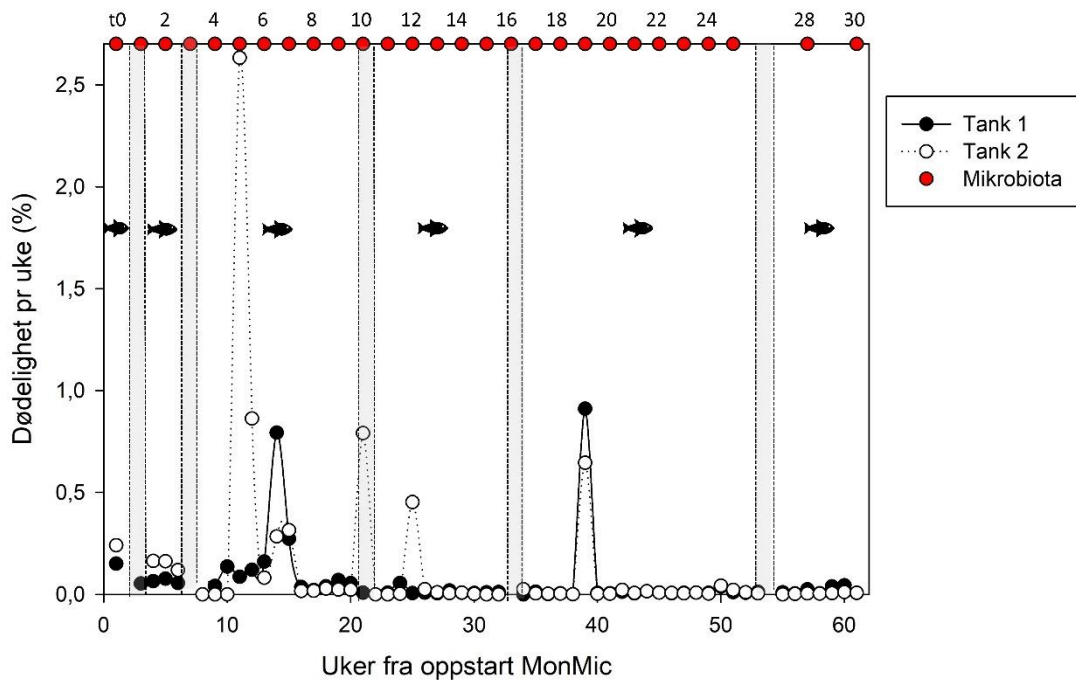
Anlegg C

Gjennomsnittlig dødelighet for Anlegg C var 0.01 ± 0.2 % pr dag for begge karene og var stabilt igjennom de 15 mnd anlegget ble fulgt (Figur 26). Anlegget flyttet fisk svært ofte ut og inn av denne RAS-avdelingen, men det ser ikke ut til å ha påvirket dødeligheten noe særlig. Økt dødelighet for dette anlegget skyldes hovedsakelige vaksinerings.



Figur 26. Dødelighet pr uke (%) for hvert av karene som ble fulgt i prosjektet gjennom prosjektperioden hos anlegg C. Røde punkter øverst i figuren illustrerer de 32 ulike prøvepunktene for mikrobiota (t0-t32). Anlegget flyttet fisk svært ofte og det er derfor ikke illustrert med/uten fisk.

Dødeligheten ved anlegg D er presentert i Figur 27. Gjennomsnittlig dødelighet var 0.06 ± 0.2 % pr uke for kar 1 og 0.13 ± 0.4 % for kar 2. Det var dermed ulik dødelighet for de to karene, uten at anlegget har noen forklaring på hvorfor. Økt dødelighet skyldes ifølge anlegget håndtering (flytting og/eller vaksinerings). 6 fiskegrupper ble fulgt i perioden for de aktuelle to karene.

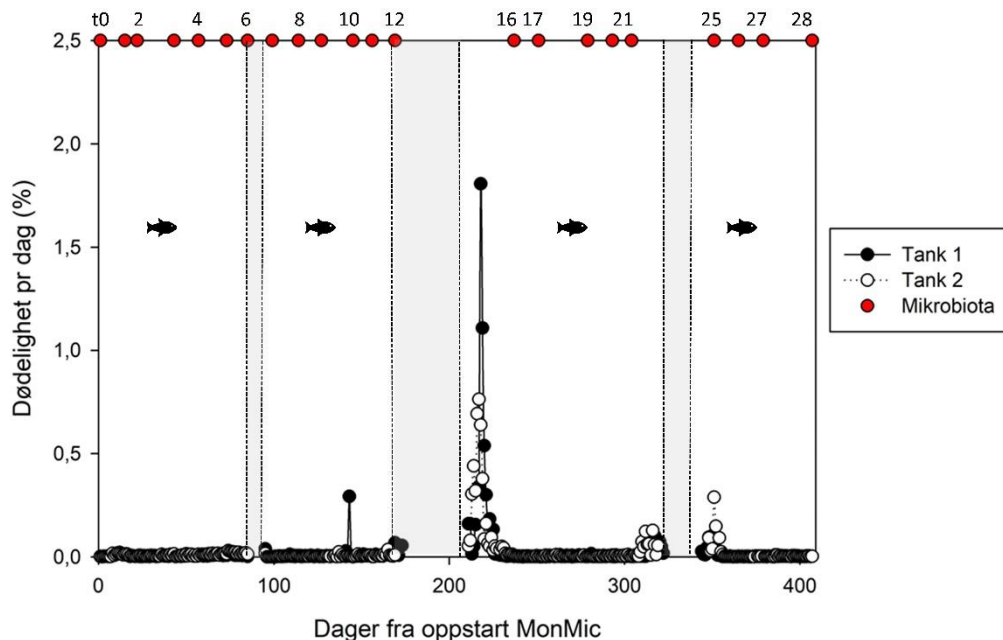


Figur 27. Dødelighet pr uke (%) for hvert av karene som ble fulgt i prosjektet gjennom prosjektperioden hos anlegg D. Røde punkter øverst i figuren illustrerer de 31 ulike prøvepunktene for mikrobiota (t0-t30). Fisk= fisk i systemet, grå felter=fisk flyttet ut.

Anlegg E

Gjennomsnittlig dødeligheten for Anlegg E var 0.02 ± 0.1 % pr dag for begge karene (Fig. 28). For fiskegruppe 3 i november 2018 (før mikrobiotapunkt t16/uke 210) ser man en økning i dødelighet, opp mot 1.8 % som skyldes ifølge anlegget sår og finneslitasje pga. *Aeromonas hydrophila*. Da denne dødeligheten oppsto på anlegget ble det ikke tatt ut prøver til MonMic og det er ikke mulig

å se dette prøvepunktet i Figur 28 (mellom t12 og t16). I tillegg, hadde anlegget problemer med ozongeneratoren og en del problemer med sopp (*Saprolegnia*).



Figur 28. Dødelighet pr dag (%) for Anlegg E, for hvert av karene som ble fulgt i prosjektet gjennom prosjektperioden hos anlegget. Røde punkter øverst i figuren illustrerer de 28 ulike prøvepunktene for mikrobiota (t0-t28). Fisk= fisk i systemet, grå felter=fisk flyttet ut.

6.6 Data analyse – korrelasjon kjemiske parametere og mikrobiota

Vi benyttet to ulike metoder for å korrelere sammensetning av mikrobielle samfunn med fysisk og kjemisk vannkvalitet fra anleggene, for å se om og hvilke miljøparametere som påvirker det mikrobielle miljøet i disse komplekse RAS-systemene. **Kanonisk korrespondanse analyse (CCA)** og **maskinlæring (ML)** ble benyttet. CCA er en multivariat metode for å kartlegge forhold mellom biologiske samlinger av arter og deres miljø. Denne metoden gir gradienter fra økologiske datasett som danner grunnlaget for å beskrive og visualisere ulike habitat preferanser (nisjer) av arter i et diagram. ML modeller bruker kunnskap ekstrahert fra trente datasett som typisk består av et sett av egenskaper og merkelapper (klassifisering) eller kontinuerlige verdier (regresjon). Målet med ML er å tilpasse de trente dataene til noen funksjoner slik at de kan benyttes til å forutsi en

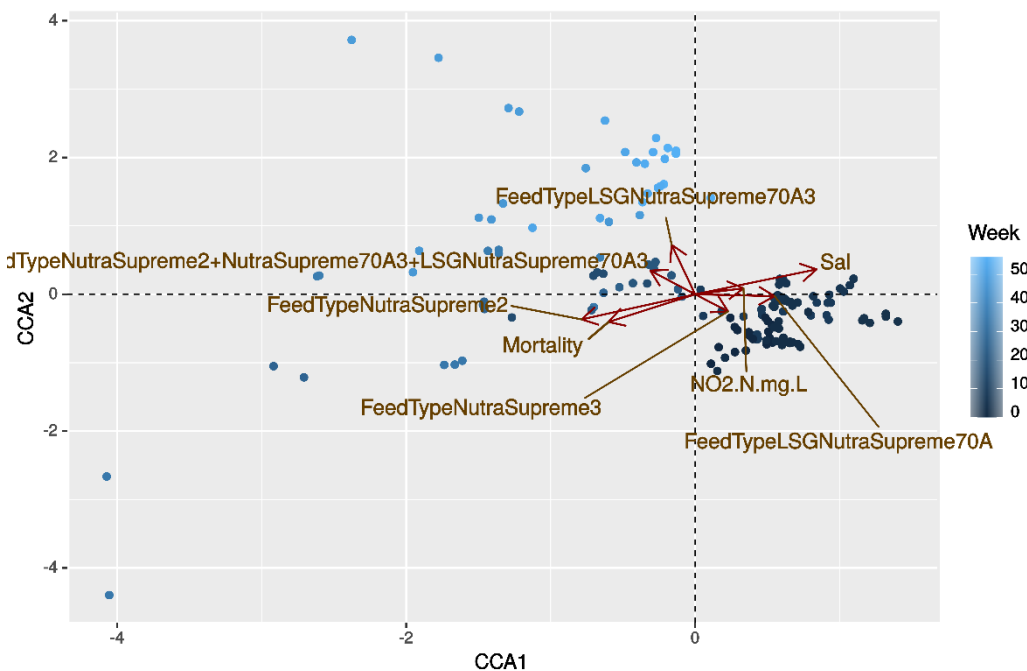
merkelapp eller en kontinuerlig verdi til et nytt datasett (f.eks. prøver). Vi så på påvirkning av følgende parametere, som vi hadde tilgang til fra alle anlegg:

- Temperatur
- Salinitet
- O₂
- CO₂
- pH
- Nitrogenforbindelser (NH₃, NH₄, NO₃, NO₂)
- Alkalinitet
- Biomasse (antall fisk i kar, vekt av fisk, biomasse)
- Fôr (mengde fôr, fôr-type)
- Dødelighet av fisk

Fisk i system/ikke i system ble ikke vurdert, da anleggene ikke tok ut alle prøver når det ikke var fisk i systemet (bortsett fra Anlegg B). Parametere som beskriver det mikrobielle samfunnet best (endring) ble valgt basert på valgte vektor lengder (for CCA), eller tilpasset $R^2 > 0.7$ (for kontinuerlige verdier med ML).

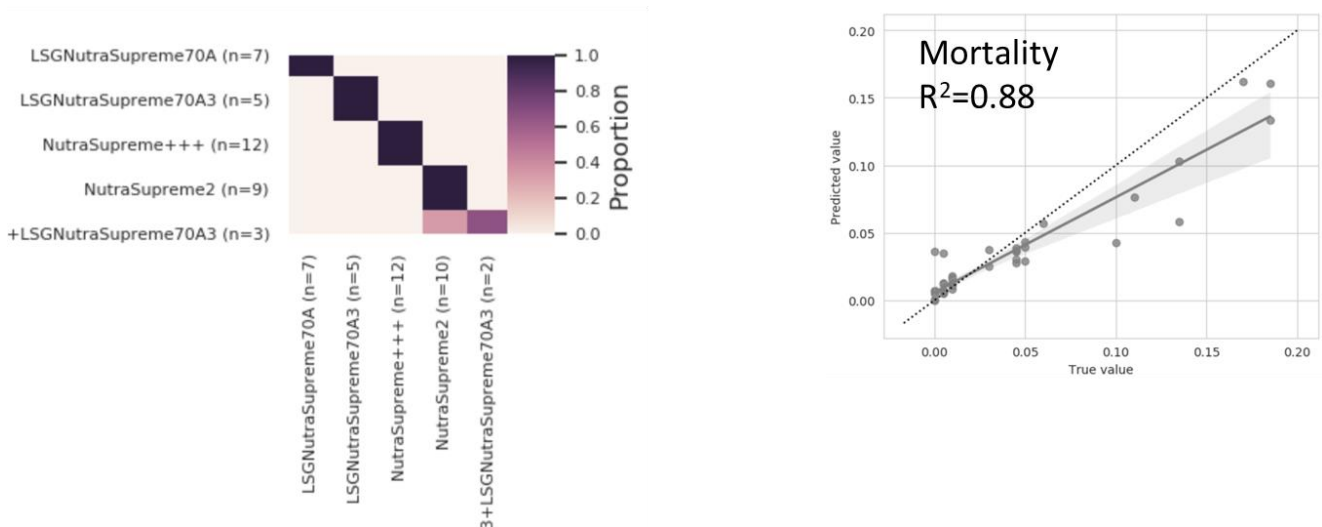
Anlegg A

CCA viste at ulike fôr-typer, salinitet, NO₂ og dødelighet var gode indikatorer for endringer i mikrobiell sammensetning over tid (Fig. 29).



Figur 29. CCA som viser hvilke parametere som påvirker mikrobielle sammensetningen hos Anlegg A. Lengde og posisjon av pilene viser informasjon om forholdet mellom miljøvariablene og den utledede aksene. Ulike score for prøvene vises som prikker med ulik farge, avhengig av når prøven ble tatt (uke). Score dannes fra sammensetningen av microbiota for hver prøve. Lengde og posisjon av pilene gir informasjon om forholdet mellom den originale prøvevariabelen og de deriverte aksene. Piler som er parallelle til aksene indikerer en korrelasjon (negative eller positive) og lengden av pila forteller noe om styrken for korrelasjonen.

ML viste derimot at dødelighet og fôr-type var de beste parametrene for å forutsi mikrobiell sammensetning (Fig. 30). Dette indikerer at sammensetningen av de mikrobielle samfunnene er sensitive til endringer i dødelighet og fôr-type.

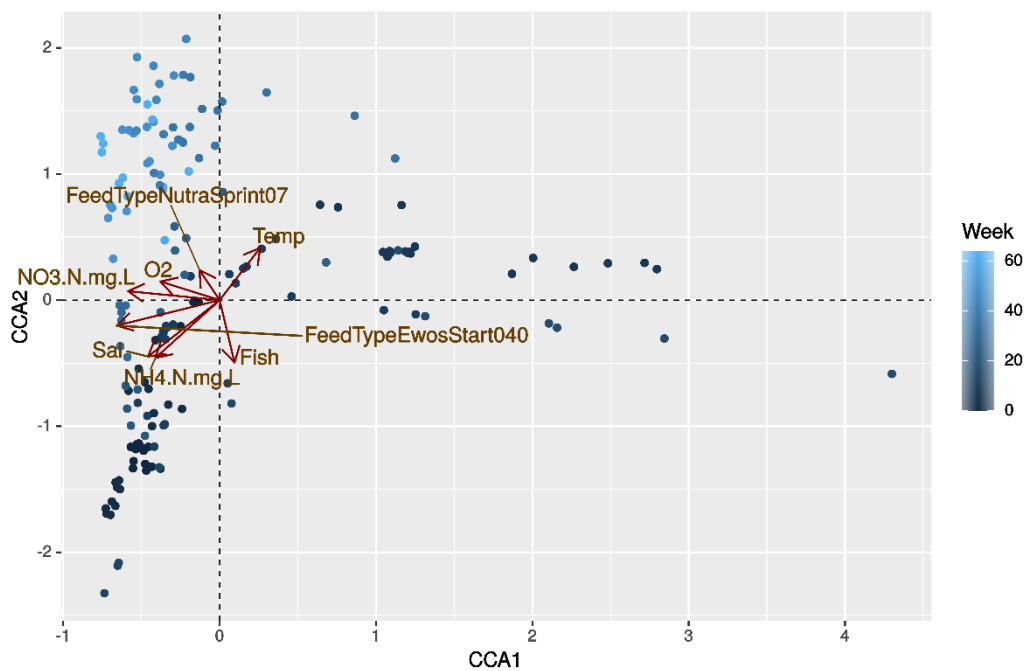


Figur 30. ML som representerer parametere som påvirker den mikrobielle sammensetningen for Anlegg A. "Heatmap" til venstre viser hvor godt modellen kan forutsi endring i mikrobielle samfunn for de ulike parametere, hvor mørkere farge viser høyere treff, fra 0 til 1, hvor 1 er perfekt match og 0 er en dårlig

match. Til høyre regresjon for numeriske variabler, med riktige verdier på x-akse og beregnede verdier på y-akse. Hvor godt regresjonen passer (R^2 verdi) er indikert fra 0 til 1, hvor perfekt match er 1, mens 0 er dårlig match.

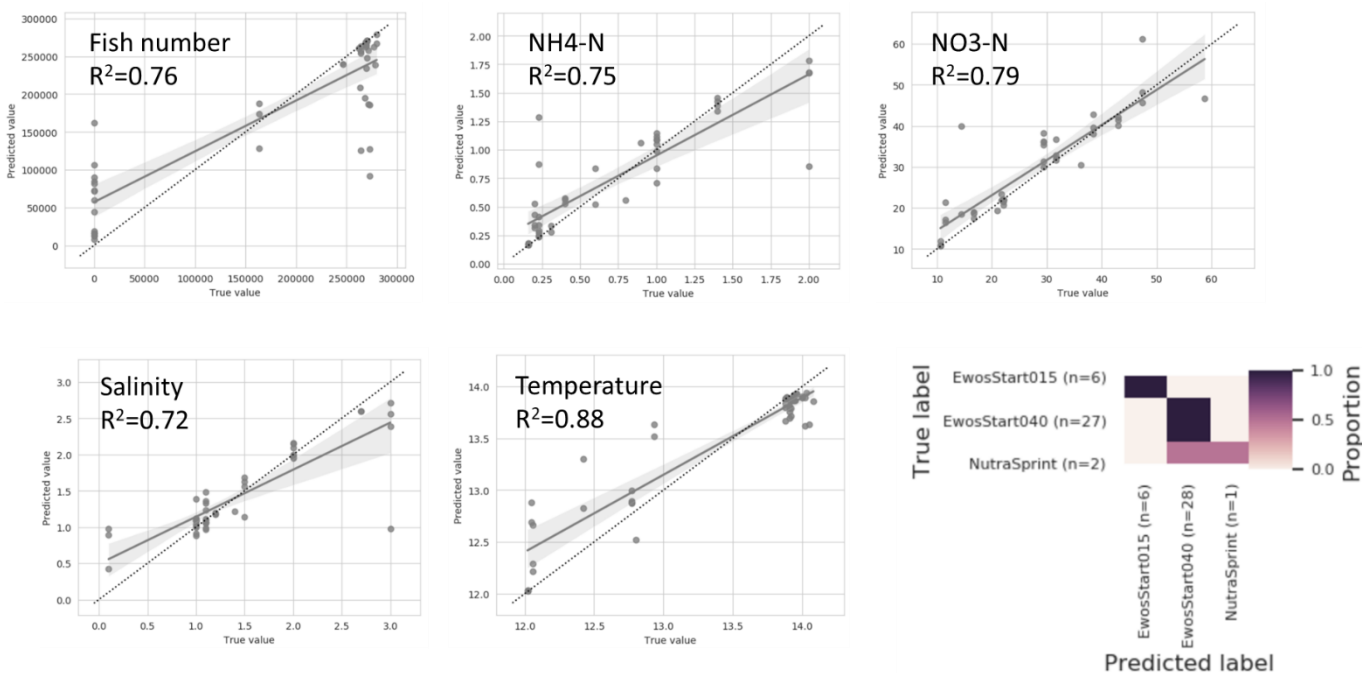
Anlegg B

CCA viste at fôr-type, salinitet, NO_3 , NH_4 , O_2 , temperatur og antall fisk i kar var gode indikatorer for prøveulikheter i mikrobiell sammensetning over tid hos Anlegg B (Fig. 31).



Figur 31. CCA som viser hvilke parametere som påvirker mikrobielle sammensetningen hos Anlegg B. Lengde og posisjon av pilene viser informasjon om forholdet mellom miljøvariablene og den utledede aksene. Ulike score for prøvene vises som prikker med ulik farge, avhengig av når prøven ble tatt (uke). Score dannes fra sammensetningen av microbiota for hver prøve. Lengde og posisjon av pilene gir informasjon om forholdet mellom den originale prøvevariabelen og de deriverte aksene. Piler som er parallelle til aksene indikerer en korrelasjon (negative eller positive) og lengden av pila forteller noe om styrken for korrelasjonen.

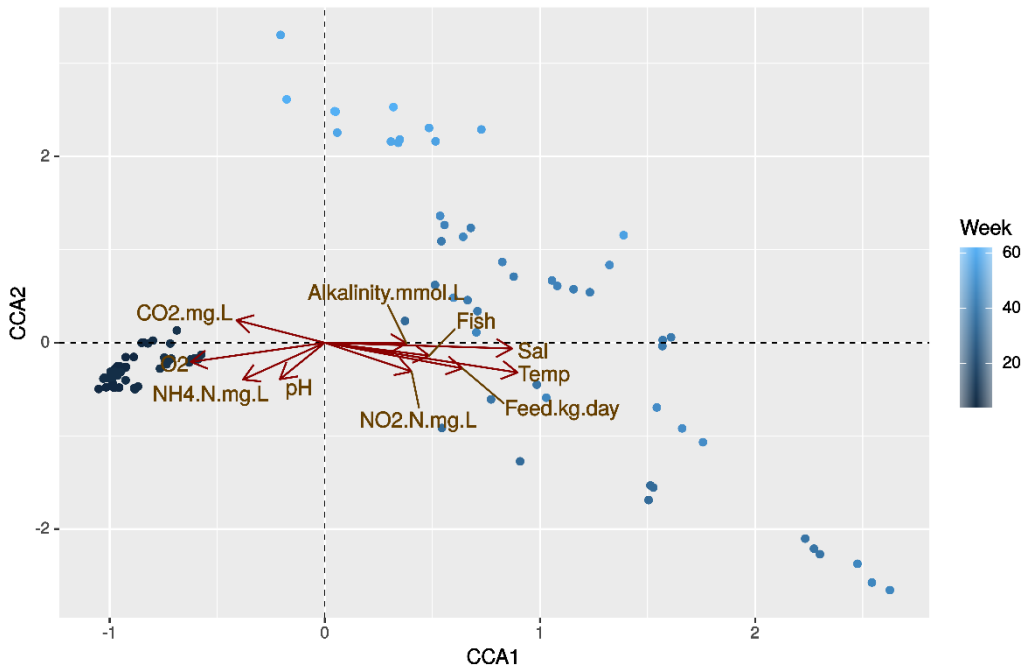
Liknende resultater ble oppnådd for ML, bortsett fra at O_2 ikke ble funnet til å være en god indikator ved bruk av ML (Fig 32).



Figur 32. ML som representerer parametere som påvirker den mikrobielle sammensetningen for Anlegg B. "Heatmap" nederst til høyre viser hvor godt modellen kan forutsi endring i mikrobielle samfunn for de ulike parametere, hvor mørkere farge viser høyere treff, fra 0 til 1, hvor 1 er perfekt match og 0 er en dårlig match. De andre plottene viser regresjon for numeriske variabler, med riktige verdier på x-akse og beregnede verdier på y-akse. Hvor godt regresjonen passer (R^2 verdi) er indikert fra 0 til 1, hvor perfekt match er 1, mens 0 er dårlig match.

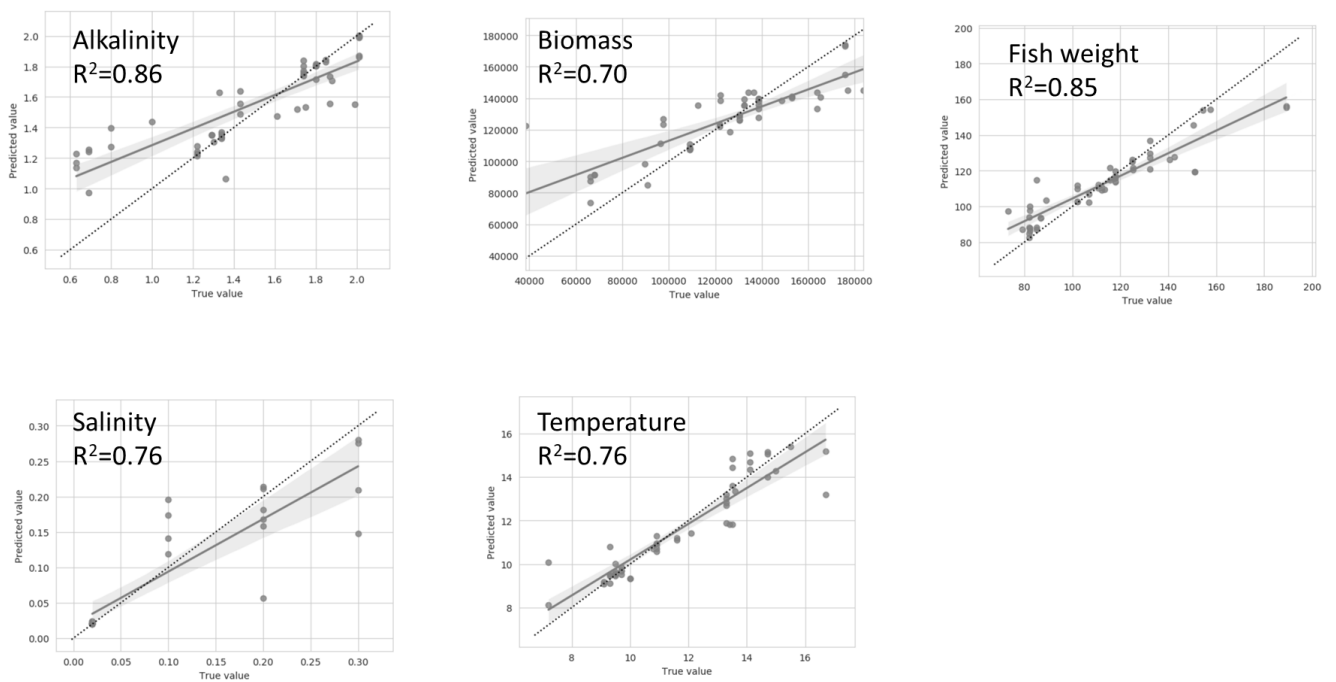
Anlegg C

CCA viste at mengde fôr, salinitet, NO₃, NH₄, O₂, temperatur og antall fisk i karene var gode indikatorer for endringer i mikrobiell sammensetning over tid (Fig. 33).



Figur 33. CCA som viser hvilke parameter som påvirker mikrobielle sammensetningen hos Anlegg C. Lengde og posisjon av pilene viser informasjon om forholdet mellom miljøvariablene og den utledede aksene. Ulike score for prøvene vises som prikker med ulik farge, avhengig av når prøven ble tatt (uke). Score dannes fra sammensetningen av microbiota for hver prøve. Lengde og posisjon av pilene gir informasjon om forholdet mellom den originale prøvevariablen og de deriverte aksene. Piler som er parallelle til aksene indikerer en korrelasjon (negative eller positive) og lengden av pila forteller noe om styrken for korrelasjonen.

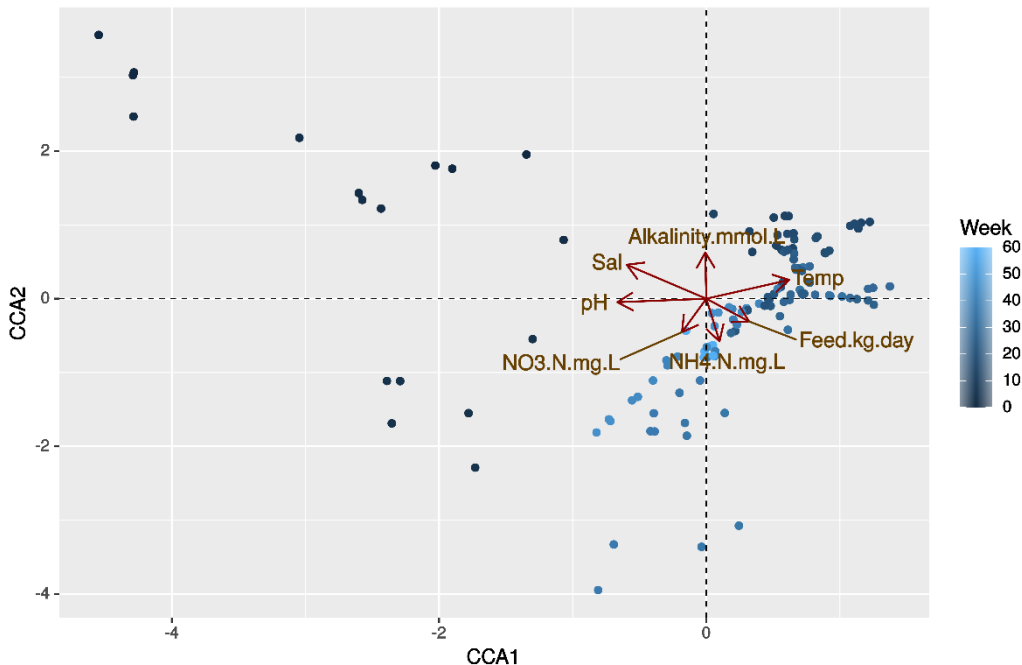
ML, viste derimot at alkalinitet, biomasse, fiskevekt, salinitet og temperatur var korrelert til endring i mikrobiota sammensetning (Fig. 34).



Figur 34. ML som representerer betydelige parametere som påvirker den mikrobielle sammensetningen for Anlegg C. Plottene viser regresjon for numeriske variabler, med riktige verdier på x-akse og beregnede verdier på y-akse. Hvor godt regresjonen passer (R² verdi) er indikert fra 0 til 1, hvor perfekt match er 1, mens 0 er dårlig match.

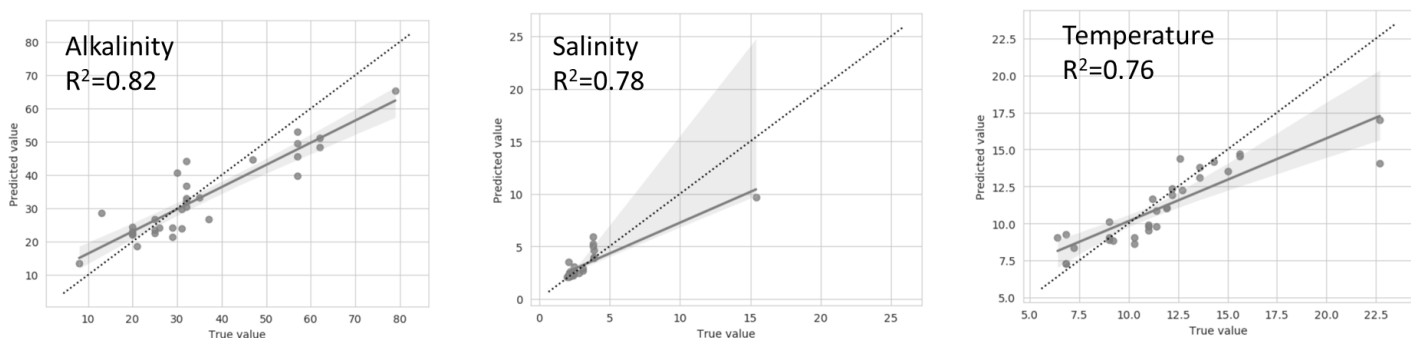
Anlegg D

CCA for Anlegg D viste at alkalinitet, temperatur, fôr-mengde, NH₄, NO₃, pH og salinitet påvirket den mikrobielle sammensetningen (Fig. 35).



Figur 35. CCA som viser hvilke parameter som påvirker mikrobielle sammensetningen hos Anlegg D. Lengde og posisjon av pilene viser informasjon om forholdet mellom miljøvariablene og den utledede aksene. Ulike score for prøvene vises som prikker med ulik farge, avhengig av når prøven ble tatt (uke). Score dannes fra sammensetningen av microbiota for hver prøve. Lengde og posisjon av pilene gir informasjon om forholdet mellom den originale prøvevariabelen og de deriverte aksene. Piler som er parallelle til aksene indikerer en korrelasjon (negative eller positive) og lengden av pila forteller noe om styrken for korrelasjonen.

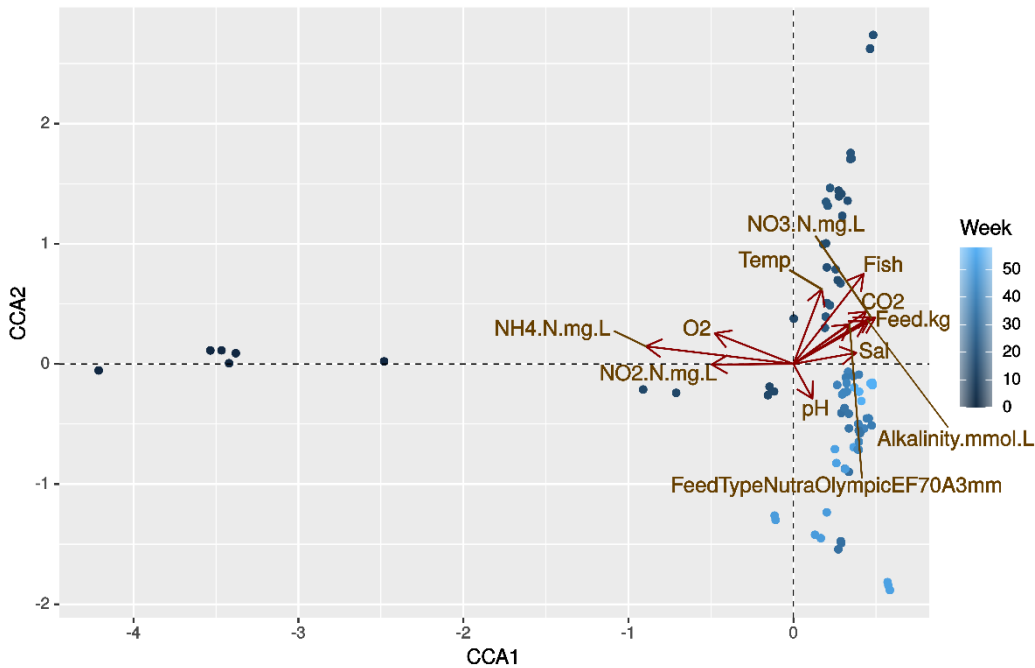
ML viste at alkalinitet, salinitet og temperatur var signifikante indikatorer for endringer i mikrobiell sammensetning for Anlegg D (Fig. 36).



Figur 36. ML som representerer parameter som påvirker den mikrobielle sammensetningen for Anlegg D. Plottene viser regresjon for numeriske variabler, med riktige verdier på x-akse og beregnede verdier på y-akse. Hvor godt regresjonen passer (R² verdi) er indikert fra 0 til 1, hvor perfekt match er 1, mens 0 er dårlig match.

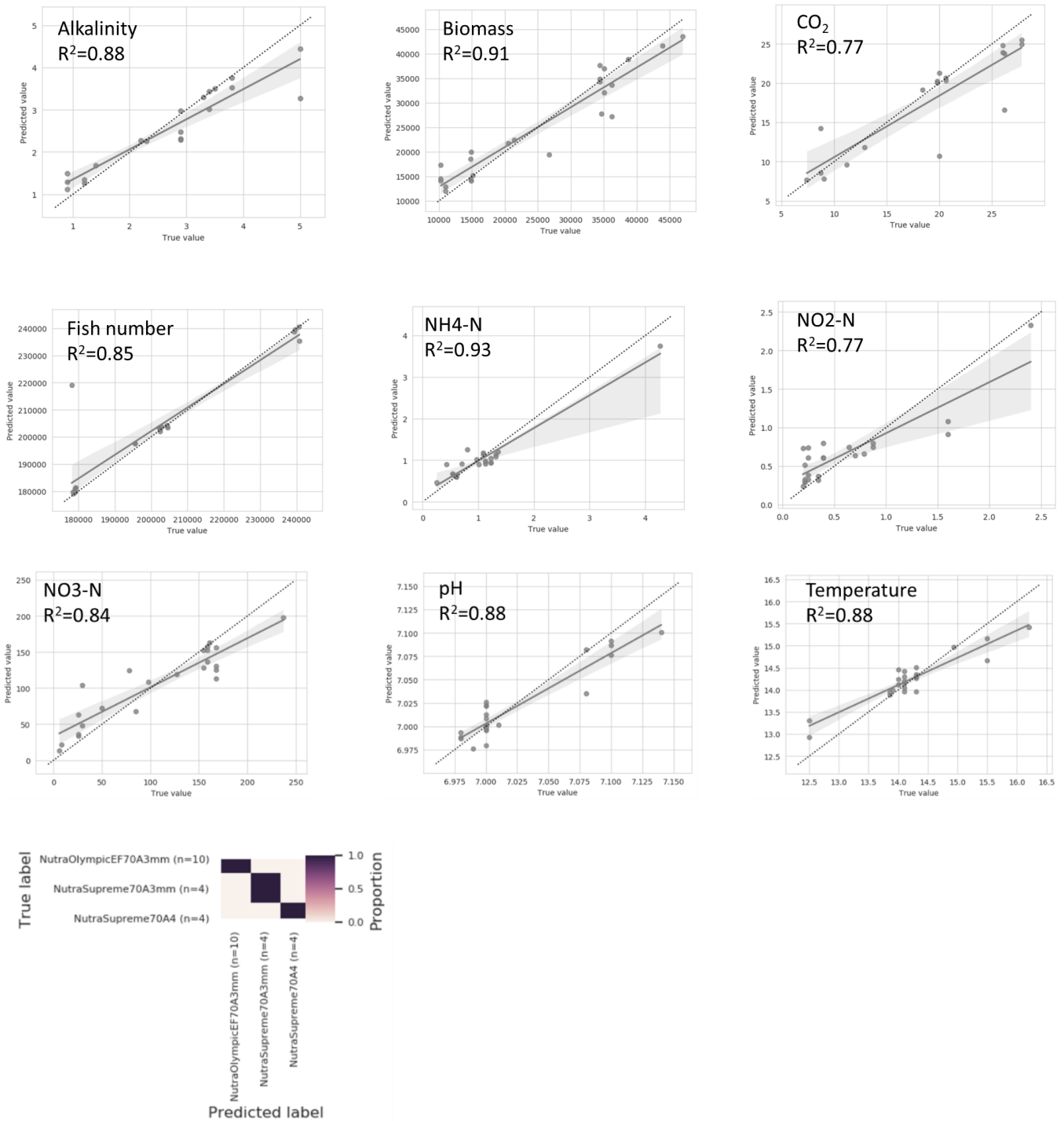
Anlegg E

CCA indikerte for Anlegg E at en rekke parametere påvirker sammensetningen av det mikrobielle samfunnet: NO₃, NO₂, NH₄, O₂, CO₂, pH, alkalinitet, salinitet, temperatur, fôr-mengde, fôr-type og antall fisk i kar (Fig. 37).



Figur 37. CCA som viser hvilke parameter som påvirker mikrobielle sammensetningen hos Anlegg E. Lengde og posisjon av pilene viser informasjon om forholdet mellom miljøvariablene og den utledede aksene. Ulike score for prøvene vises som prikker med ulik farge, avhengig av når prøven ble tatt (uke). Score dannes fra sammensetningen av microbiota for hver prøve. Lengde og posisjon av pilene gir informasjon om forholdet mellom den originale prøvevariabelen og de deriverte aksene. Piler som er parallelle til aksene indikerer en korrelasjon (negative eller positive) og lengden av pila forteller noe om styrken for korrelasjonen.

For Anlegg E viste ML at NO₂, NO₃, NH₄, CO₂, alkalinitet, pH, temperatur, antall fisk i karene, biomasse og fôr-type var gode indikatorer for endring av mikrobielle samfunn (Fig. 38).



Figur 38. ML som representerer parametere som påvirker den mikrobielle sammensetningen for Anlegg E. "Heatmap" nederst viser hvor godt modellen kan forutsi endring i mikrobielle samfunn for de ulike parametere, hvor mørkere farge viser høyere treff, fra 0 til 1, hvor 1 er perfekt match og 0 er en dårlig match. De andre plottene viser regresjon for numeriske variabler, med riktige verdier på x-akse og beregnede verdier på y-akse. Hvor godt regresjonen passer (R^2 verdi) er indikert fra 0 til 1, hvor perfekt match er 1, mens 0 er dårlig match.






6.6.1 Oppsummering av ulike parameter og deres mulige påvirkning på de mikrobielle samfunnene

De kjemiske og fysiske parameterne som var felles for alle anlegg, som påvirket det mikrobielle samfunnene i RAS mest (Tab. 7) var:

1. Fôr-type
2. Temperatur
3. Salinitet
4. Alkalinitet
5. Antall fisk i kar

Det var derimot variasjon i hvilke parametere som påvirket de mikrobielle samfunnene mest mellom anleggene og de to ulike modellene (CCA og ML) viste også variasjon. Nærmere beskrivelse for hvert anlegg under.

Tabell 7. Oppsummering av alle parametere med muligheter for å beskrive endringer i de mikrobielle samfunnene. Begge tilnærmingene (CCA og ML) er representert fra hvert anlegg. Resultatet er presentert som et forhold (ratio) and prosent (%) basert på hvor suksessfull parameteren beskriver endringer i sammensetningen av mikrobielle samfunn. Parametere som påvirket det mikrobielle samfunnet, er indikert med symbol "+" i tabellen. Lysegrønn farge indikerer tilstedeværelse av denne parameteren i analysen (tilgang på data fra anlegg). Lys rød viser fravær av data fra anlegg. Score viser hvor mange av anleggene hvor denne parameteren hadde påvirkning på det mikrobielle samfunnet. Parametere som påvirket mest, er indikert med mørkegrønn farge i kolonnen "Overall" helt til høyre og er valgt basert på begge analyser hvor tilnærmingen gav en score over > 60%.

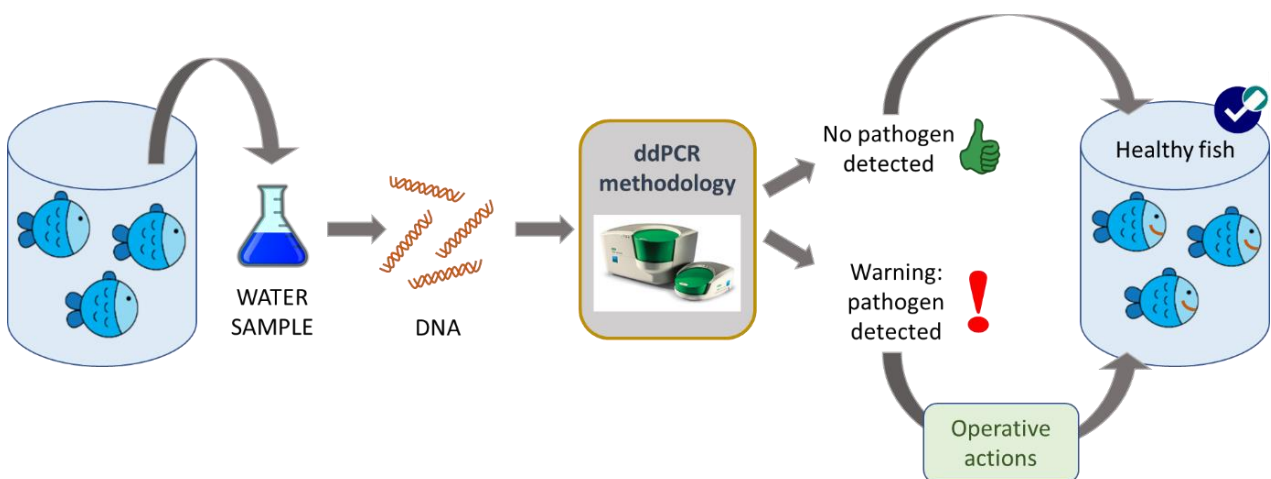
Env param	CCA					Score		ML					Score		Overall
	A	B	C	D	E	ratio	%	A	B	C	D	E	ratio	%	
Temp.		+	+	+	+	4/5	80,00		+	+	+	+	4/5	80,00	
Sal.	+	+	+	+	+	5/5	100,00		+	+	+		3/5	60,00	
O ₂			+	+	+	3/4	75,00						0/4	0,00	
CO ₂				+		2/2	100,00						0/2	0,00	
pH				+	+	3/5	60,00					+	1/5	20,00	
NH ₄ -N		+	+	+	+	4/5	80,00		+			+	2/5	40,00	
NO ₂ -N	+		+		+	3/5	60,00					+	1/5	20,00	
NO ₃ -N		+		+	+	3/5	60,00		+			+	2/5	40,00	
NH ₃ -N						0/2	0,00						0/2	0,00	
Alkalinity				+	+	3/3	100,00				+	+	3/3	100,00	
Fish number		+	+		+	3/3	100,00		+			+	2/3	66,67	
Feed kg/day				+	+	3/3	100,00						0/3	0,00	
Feed type	+	+			+	3/3	100,00		+	+		+	3/3	100,00	
Mortality	+					1/5	20,00		+				1/5	20,00	
Fish weight						0/2	0,00				+		1/2	50,00	
Fish biomass						0/2	0,00				+	+	2/2	100,00	

6.6.2 Maskinlæring som et tidlig varslingsystem

Basert på resultatene i 6.6.1 kan vi anslå at spesielt maskinlæring (ML) basert på sammensetning av mikrobielle samfunn i RAS har et potensiale til å benyttes som en tidlig varsling eller støtteverktøy under vanlig drift i RAS. Forutsetningen for dette er en screening av microbiota i et system og opprette en produksjonsbaseline. Ytterligere forsøk trengs å bli utført for å simulere ulike scenario, for eksempel utbrudd av patogene bakterier og/eller H₂S kontaminering. ML har tidligere blitt benyttet for å se effekten av miljøpåvirkninger på sedimenter ved oppdrettslokaliteter (Cordier et al. 2017) og forurensede områder og ulike milj kontaminanter (Smith et al. 2015). Begge studiene har konkludert med at ML er et lovende verktøy med høy oppløsning for å forutsi hendelser. ML har hittil ikke blitt benyttet for å forutsi hendelser i RAS. I MonMic har vi benyttet ML for å forutsi en rekke parametere. Videre forskning er nødvendig for å utvikle og benytte ML som et operativt verktøy i smoltproduksjon i RAS.

6.7 Patogene bakterier

Hovedmålet i arbeidspakke 3 var å etablere en sensitiv metode for å påvise utvalgte patogene mikrober i vann og biofilm fra landbaserte akvakulturanlegg (Figur 39).



Figur 39. Prinsippskisse for overvåking av patogene bakterier i oppdrettsanlegg med ddPCR metodikk.

En liste over relevante patogene organismer ble prioritert fra involverte anlegg (L4, Tabell 8). For utvikling av protokoller for analyse av virus, trengs et positivt kontroll-virus samt publisert

virusgenom for design av spesifikke primere. Dette vanskeliggjorde utvikling av protokoller siden tilgjengelighet for disse i kommersielle stamme/virus-samlinger er begrenset. I stedet ble to fiskepatogene bakteriearter valgt, *Yersinia ruckeri* og *Flavobacterium psychrophilum*, på bakgrunn av interesse fra anleggene, samt tilgjengelighet av referansestammer, dyrkbarhet i laboratoriet, og publiserte genomsekvenser for primerdesign. Den utviklede metoden er basert på ddPCR, som er unik mht. spesifisitet og sensitivitet, og som gir en absolutt kvantifisering av en kjent genetisk sekvens (Hindson et al. 2011).

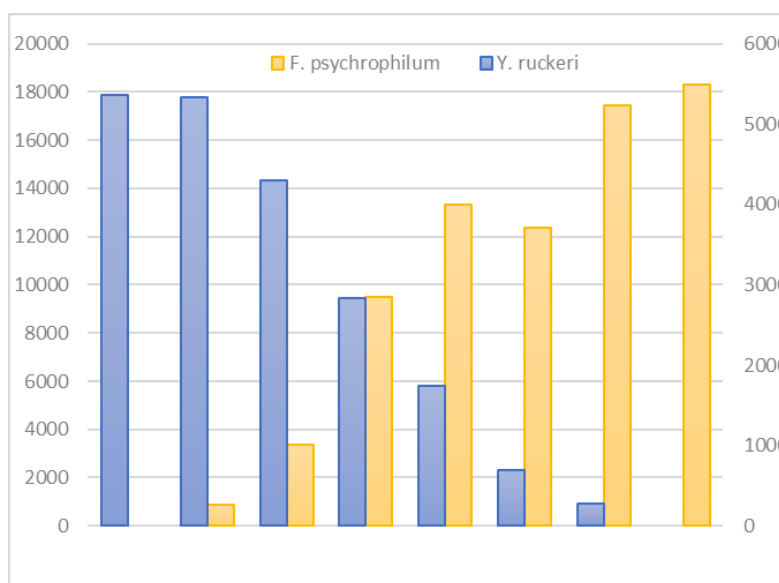
Tabell 8. Prioriterte patogener ifølge involverte anlegg, L4.

Bakterier / virus	Sykdom
<i>Candidatus Branchiomonas cysticola</i>	Proliferativ gjellebetennelse (PGI)
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	Bacterial Cold-Water Disease og Rainbow Trout Fry Syndrome
<i>Yersinia ruckeri</i>	Yersiniose
POX	Laksepox
PRV	Hjerte- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB)
IPN	Infeksiøs pankreasnekrose

For spesifikk deteksjon av valgte bakteriearter ble primersett designet for referansetypestammer av *Y. ruckeri* (ATCC29473, Serotype O1) og *F. psychrophilum* (NCIMB 2282), samt for *Yersinia enterocolitica* (CCUG 4586) og *Flavobacterium branchiophilum* (NCIMB 12904), hvilket ble brukt som negative kontroller. Metoden ble etablert ved bruk av eksperimentelt materiale som ble laget ved å dyrke opp bakteriestammene i reinkultur, isolere DNA fra disse og deretter spike isolert genomisk DNA inn i sterilt vann i ulike konsentrasjoner. Isolert DNA ble også spiket inn i prøver med oppdrettsmikrobiota, for å verifisere spesifisiteten med reell bakgrunnsmikrobiota. Etablert metode ble så testet ut i eksperimentelle prøver med DNA fra *Y. ruckeri* og *F. psychrophilum*, og i blandinger med positive og negative kontroller (DNA isolert fra referansestammene). For å utfordre sensitiviteten til metoden ble fortynningsserier av bakterie-DNA analysert, og deteksjonsnivå ble definert. Samtidig deteksjon av både *Y. ruckeri* og *F. psychrophilum* i samme prøve, såkalt multiplex analyse, ble også testet ut med DNA fra eksperimentelle prøver og fra reelle prøver fra anlegg. Metoden ble deretter verifisert ved screening av DNA fra alle tilgjengelige reelle prøver fra oppdrettsanleggene.

Resultatene viser at primersettene som ble designet spesifikt skiller de utvalgte bakterieartene fra andre arter og arter innen samme slekt. Ved analyse av eksperimentelle prøver påviser metoden

svært lave nivåer av de utvalgte bakterieartene, eksempelvis kunne *Y. ruckeri* detekteres i 1.24 ng input av DNA og *F. psychrophilum* i 0.0011 ng, i samme analyse. En eksempelfigur med deteksjon av *Y. ruckeri* og *F. psychrophilum*, men med ulike og trinnvis minskende input-mengde av isolert genomisk DNA fra de ulike mikrobene, er vist i Figur 40. Ved tilsats av genomisk DNA fra nær beslektete arter, *Y. enterocolitica* og *F. branchophilum*, ble det ikke detektert signal, hvilket viser at spesifisiteten til de designede primerne som ble brukt i analysen er god.



Figur 40. Multipleks analyse for samtidig deteksjon av of *F. psychrophilum* and *Y. ruckeri* ved tilsats av isolert genomisk DNA fra begge arter i ulike konsentrasjoner. Resultater (antall detekterte genkopier) presentert som søyler fra venstre til høyre for *F. psychrophilum* (tilsats gDNA mengde: 0; 0,0055; 0,022; 0,055; 0,077; 0,094; 0,1 og 0,11 ng), og for *Y. ruckeri* (tilsats gDNA mengde: 12,4; 11,8; 9,9; 6,2; 3,7; 1,9; 0,6 og 0 ng).

Begge arter ble også detektert ved analyse av DNA isolert fra reelle prøver fra oppdrettsanlegg. Totalt ble 132 prøver analysert, *Y. ruckeri* (1-40 genkopier) ble påvist i kun 3 prøver fra ett anlegg (A), mens *F. psychrophilum* (1-240 genkopier) ble påvist i 21 prøver fra 2 anlegg (3 fra anlegg A og 18 fra anlegg C), se Tabell 9. I samme analyse ble positiv kontroll for begge arter analysert med prøve tilsatt genomisk DNA. Sterilt vann ble brukt som negativ kontroll og gav ikke signal/deteksjon.

Tabell 9. Resultat fra deteksjon av *F. psychrophilum* and *Y. ruckeri* i prøver fra oppdrettsanlegg med multipleks ddPCR.

Anonymisert prøve nr.	Detekterte genkopier	
	<i>F. psychrophilum</i>	<i>Y. ruckeri</i>
1-3	0	40
4-25	1-240	0
26-132	0	0
Positiv kontroll <i>F. psychrophilum</i>	6640	0
Positiv kontroll <i>Y. ruckeri</i>	0	7480
Sterilt vann	0	0

Screening av DNA fra reelle prøver fra oppdrettsanleggene verifiserte deteksjon av *Y. ruckeri* i prøver fra anlegg hvor denne også ble påvist med 16S rRNA sekvensering, og *F. psychrophilum* i prøver der bakterien ble påvist på slektsnivå (*Flavobacterium* sp.) I tillegg kunne metoden detektere *F. psychrophilum* i prøver der den ikke ble påvist ved 16S sekvensering, noe som tyder på at ddPCR metoden er mer sensitiv for påvisning enn 16S sekvenseringsanalyse og kan komplettere denne mht. deteksjon av spesifikke patogener.

Som konklusjon viser resultatene at den etablerte metoden er en svært sensitiv og spesifikk metode for deteksjon av utvalgte bakteriearter. Metoden tillater lave DNA-nivåer som input i analysen, hvilket er en fordel da det har vært utfordrende å få nok DNA av god nok kvalitet fra prøvematerialet i prosjektet. Metoden har potensiale for rask screening av prøver og deteksjon av svært lave nivåer av *Y. ruckeri* og *F. psychrophilum*. Metoden kan videreutvikles til å inkludere andre patogener arter og/eller undergrupper av arter. Den etablerte metoden ble presentert som poster på Frisk Fisk 2019 (Hageskal et al. 2019), og et manuskript er innsendt for publisering.

6.8 Robotisering av DNA-isolering

Hovedmålet i arbeidspakke 4 var å overføre manuelle isoleringsprotokoller for DNA til robotisert format. Manuell isolering av DNA fra Sterivex filterenhet (brukt for isolering av DNA fra anleggsprøver i prosjektet) er tidkrevende, og det har vært utfordrende å få nok DNA av god nok kvalitet fra prøvematerialet i prosjektet. Beckman Coulter i7 robotsystem ble brukt for utvikling av den robotiserte DNA-isoleringsprotokollen. Den manuelle protokollen som ble brukt til DNA-isolering for metagenomanalyse i AP2 (ZYMO kit) ble optimalisert og justert, og også alternative prosedyrer ble testet for å undersøke hvilke prosedyrer som egner seg best og gir best resultat i en robotiserte pipeline. De ulike protokollene ble testet manuelt og sammenlignet med den brukte prosedyren fra ZYMO, for å utarbeide et forsøksoppsett med en metode og varianter av denne.

Videre ble flere ulike modifiseringer og optimaliseringer av metoden testet ut for å finne best mulig måte å isolere DNA fra Sterivex filter på. Som siste trinn ble den beste metode mtp. DNA utbytte overført til robot script.

Evaluering av DNA utbytte og kvalitet ble gjort med DeNovix (absorbans-måling), hvilket viser utbytte (ng DNA isolert) og renhet (A260/A230 og A260/A280). DNA-mengde ble også analysert vha. agarosegel (0,8%), hvilket visualiserer evt. fragmentering av isolert DNA under prosedyren.

Resultater fra noen av de ulike DNA-isoleringsprosedyrer som ble kjørt er presentert i Tabell 10. Der sammenlignes resultatene fra den manuelle metoden som ble brukt i prosjektet (ZYMO kit) med de metoder som ble brukt i AP4. Det ble funnet at en annen metode, Beckman GenFind V3 kit, og videre modifisering av denne, resulterte i et bedre utbytte av DNA enn manuell ZYMO-metode. DNA-utbyttet ble redusert da denne prosedyren ble overført til robot-plattformen, hvilket ikke er uvanlig. I videreutvikling av robot-script og videre optimalisering av de ulike trinnene kan det finnes potensiale for å forbedre utbyttet ved bruk av robotisert prosedyre. Når utbyttet av DNA isolert fra filter vha. de ulike metodene ble sammenlignet, så man tydelig det forbedrede utbyttet ved bruk av Beckman GenFind V3 kit metoden manuelt, men også reduksjonen observert ved bruk i robot (Tab. 4). Likevel er DNA-utbyttet vha. robotisert metode på lignende nivå som utbyttet ved bruk av ZYMO kit, hvilket er den metoden som rutinemessig ble brukt i MonMic-prosjektet. Som konklusjon vil dette si at lignende utbytte vil opprettholdes ved bruk av etablert robotisert metode, sammenlignet med den metoden som ble brukt i prosjektet, og som har gitt tilfredsstillende resultat ved sekvenseringsanalyser, men at denne har potensiale for å forbedres, slik at enda bedre utbytte kan oppnås ved bruk av robotisert DNA-isolering. Det oppnås definitivt en klar forbedring av DNA-utbytte ved å bruke den uttestede og optimerte versjonen av manuell DNA-isolering med Beckman GenFind V3 kit metoden.

Tabell 10. Sammenligning av DNA-utbytte isolert fra filter vha. de ulike metodene testet.

Prøvefortynning	Utbytte DNA etter rens (ng); metodesammenligning			
	ZYMO manuelt	Beckman GenFind V3 kit umodifisert manuelt	Beckman GenFind V3 kit modifisert 2 manuelt	Beckman GenFind V3 kit modifisert 2; robotisert
100x	316	760	1090	251
1000x	84	560	270	71
10 000x	20	140	110	18,5

7 Hovedfunn i prosjektet

1. De fem anleggene hadde alle en unik mikrobiota, forskjellig fra hverandre, sannsynligvis pga. ulik drift, design, geografisk beliggenhet samt et seleksjonspress som danner en "husflora"
2. Biofilter hadde høy diversitet og hadde en stabil sammensetning av bakterier over tid for fire av fem anlegg
3. Vi fant store forskjeller hos anleggene i stabilitet av bakteriesamfunn i vann og biofilm fra karvegg
4. Kjemiske/fysiske parametere som påvirket mikrobiotasammensetningen hos anleggene mest, var:
 - a. Fôr-type
 - b. Salinitet
 - c. Temperatur
 - d. Antall fisk i kar
 - e. Alkalinitet
5. Vi fant bare hos et av anleggene en korrelasjon mellom mikrobiota og dødelighet
6. Det ble observert en viss sammenheng mellom plassering av desinfeksjon i sløyfa og diversitet i resirkulerende og karvann
7. Det ser ut til at det er flere ulike normaltilstander av mikrobielle samfunn hos de ulike anleggene som fungerer bra. Dette betyr at det er viktig å følge med på endringene i baseprofilen i hvert enkelt anlegg
8. Ingen av anleggene hadde sykdomsutbrudd, dermed falt mulighet for å forutsi sykdomsutbrudd på et tidlig stadium bort
9. ddPCR er en metode som kan detektere lave nivå av patogene bakterier i prøver med høy bakgrunnsstøy, og kan være nyttig i detektering av fiskepatogene i RAS
 - a. Anleggene hadde lave nivå av *Flavobacterium psychrophilum* og *Yersinia ruckeri*
10. Maskinlæring i kombinasjon med mikrobiota kan være et svært nyttig verktøy for å forutsi uforutsette hendelser når det kommer til vannkvalitet, gitt en screening og simulering av ulike utfall.

8 Fremtidig arbeid og anbefalinger

MonMic var et banebrytende og storskala prosjekt som ble startet med ideen om å overvåke biologisk vannkvalitet i RAS ved bruk av moderne molekylære analyseverktøy. Over en periode på 15 måneder, ble fem ulike RAS-anlegg i Norge med produksjon av smolt overvåket for analyse av mikrobielle samfunn. Fire ulike prøvepunkter i hvert RAS ble fulgt i prosjektet. MonMic resulterte i store mengder av data ("Big Data"), både mikrobiota i RAS men også fysisk og kjemisk vannkvalitet og fiskehelse-parametere. En oppsummering av hovedfunnene er oppsummert i del 7. Gjennom prosjektet støtte vi på flere utfordringer og våre prosedyrer ble justert for å gjøre hele prosessen mer sømløs, fra prøveuttak til dataanalyser og rapportering. Den største utfordringen viste seg å være integrering av de fysiske og kjemiske vannkvalitetsdataene med mikrobiota. Dette hadde sin årsak i kompleksiteten av BigData, ulike format på fysiske og kjemiske vannkvalitets data, samt at ikke alle anleggene måler de samme parameterne og ikke måles på samme sted. For fremtidige prosjekter bør disse dataene samles inn på en mer konsistent måte og være definert på forhånd. Prosjektet hadde også hatt nytte av samme målepunkt for både mikrobiota og fysiske og kjemiske parametere. Dette hadde gitt mer innsikt i dynamikken i de mikrobielle samfunnene på en høyere nivå enn det som var mulig.

En av hovedfunnene i MonMic var at bruk av mikrobiota basert maskinlæring (ML) kan benyttes for å forutsi status hos ulike RAS, og derfor benyttes som et støtteverktøy i fremtida. Noen viktige krav må oppfylles for å ta i bruk et slikt verktøy. En screening av ulike prøvepunkter i RAS lenger enn 6 måneder er nødvendig for å opprette en baselinjeprofil og modell som er nøyaktig nok og tilpasset anlegget. Videre prøvetaking kan gjøres mer sjelden, men er nødvendig for å implementere nye data og for å øke modellens nøyaktighet og styrke. Videre kan forsøk med vann fra samme RAS benyttes for simulering av ulike scenario. Et eksempel kan være H₂S-problematikk, hvor vi kan benytte forhøyet nivå av H₂S-konsentrasjon som et tilfelle i RAS. H₂S er assosiert med sulfatreduserende bakterier, massedødelighet og store økonomiske tap, men fortsatt finnes det ingen hurtig og presis kvantifisering av H₂S. Ved å bruke mønster av mikrobiota for deteksjon av H₂S kontaminering i systemer kan dette være verdifullt. Ved å gjøre forsøk for å simulere økte konsentrasjoner av H₂S, spesifikke mønster av mikrobiota kan detekteres og integreres i modellen for det spesifikke anlegget. Til slutt kan slik en modell potensielt benyttes som et tidlig varslingsystem under normal produksjon. En viktig fordel ved å bruke mikrobiota for ulike

tilstander i et anlegg er at forandring i mikrobielle samfunn er et svært sensitivt og skjer mye tidligere enn negativ påvirkning på fiskehelse.

De fem anleggene var svært forskjellige i både drift og design, noe som gjorde det komplekst å sammenlikne samfunnene av mikrobiota og relatere funnene til spesifikke driftsparametere. Det kunne vært veldig interessant og viktig å sett videre på desinfeksjon i sløyfa, både med tanke på hvor og hvor mye, mot ingen desinfeksjon i sløyfa, hvor andre driftsparametere holdes like. Studier indikerer at desinfeksjon i sløyfa kan føre til lavere diversitet og selektere for såkalte opportunistiske bakterier, som kan være ugunstig for fiskehelsen, men dette er hovedsakelig studier fra marin produksjon, og burde vært inkludert for smoltproduksjon.

9 Leveranser i prosjektet

- L1 Møtereferat for oppstartsmøte
- L2 Møtereferat for planleggingsmøte CeBiTech
- L3 SOPer for prøvetaking
- L4 Liste med relevante bakterier og virus
- L5 Plan for innsamling av informasjon
- L6 Møtereferat for styrings- og referansegruppemøte
- L7 Statusrapport til FHF
- L8 Statusrapport til FHF
- L9 Møtereferat styringsgruppe mai, til FHF
- L10 Statusrapport til FHF
- L11 Møtereferat for styrings- og referansegruppemøte
- L12 Populærvitenskapelig publikasjon (Norsk Fiskeoppdrett, SINTEF.no)
- L13 Detaljert oversikt over innsamlet prøvemateriale
- L14 Notat om mikrobefundanalyser
- L15 Notat om ddPCR
- L16 Notat om robotiserte metoder
- L17 Statusrapport til FHF
- L18 Møtereferat styringsgruppe
- L19 2 vitenskapelige manuskripter
- L20 Notat fra dagseminar på deltakende anlegg
- L21 Notat fra MonMic workshop
- L22 Statusrapport til FHF
- L23 Faglig sluttrapport
- L24 Adm sluttrapport

L20 og L21 vil bli utført etter prosjektrapporten pga korona-situasjonen.

10 Utdanning

- Sunniva Ingebrigtsen Gaarden (2020). Characterising temporal dynamics in microbial communities from biofilm and water during commercial production of Atlantic salmon smolts in RAS. Master. Institutt for Bioteknologi og matvitenskap, NTNU. Juni 2020.



- Stine Wiborg Dahle (2022). Microbial water quality in fresh water and marine RAS for production of robust Atlantic salmon smolt and lumpfish juveniles. PhD-thesis. Institutt for Bioteknologi og matvitenskap, NTNU/SINTEF Ocean.

11 Publisering og media

11.1 Vitenskapelig

1. Lewin, A.S., Haugen, T., Netzer, R., Tøndervik, A., Dahle, S. W., Hageskal, G. (In review). Multiplex droplet digital PCR assay for detection of *Flavobacterium psychrophilum* and *Yersinia ruckeri* in Norwegian aquaculture. *Journal of Microbiological Methods*.
2. Ribicic, R., Netzer, R., Dahle, S.W. (In prep). Long-term monitoring of recirculating aquaculture system biofilters reveals unique microbiota dynamics and potential for application of supervised machine-learning for decision support. *Aquaculture*.
3. Dahle, S.W., Attramadal, K.J.K., Netzer, R., Bakke, I., Ribicic, D. (In prep). Microbial Community Dynamics in RAS during start-feeding of Atlantic salmon smolts (*Salmo salar*). *Aquaculture*.
4. Dahle, S.W., Ribicic, R., Netzer, R., Bakke, I., Hageskal, G., Lewin, A., Attramadal, K.J.K. (In prep). Microbial community dynamics in five different RAS for production of Atlantic salmon smolts (*Salmo salar*).

11.2 Populærvitenskapelig

- Norsk Fiskeoppdrett 03/2020

 **Settefisk » Vitenskapet**

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

11.3 Konferanser

- EAS, Montpellier, Frankrike (2018). Systematic microbiota profiling and development of decision support tools for next generation aquaculture management (pres).
- Nordic RAS, Ås, Norge (2018). Systematic Microbiota profiling and development of decision support tool for Next generation aquaculture management (pres).
- Nordic RAS, Berlin, Tyskland (2019). Next generation monitoring of biological water quality in RAS (pres).
- Frisk Fisk, Tromsø, Norge (2019). Water quality in RAS - Monitoring bacterial community composition and dynamics (pres).
- Frisk Fisk, Tromsø (2019). Method for simultaneous detection of *F. psychrophilum* and *Y. ruckeri* in Norwegian aquaculture by droplet digital PCR (poster).

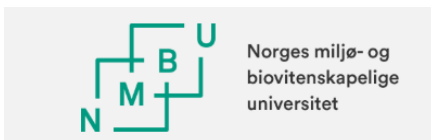
11.4 Media

- Gemini/Kyst.no/Forskning.no: Lager Helsestasjon for settefisk

<https://forskning.no/hav-og-fiske-sintef/forskere-lager-helsestasjon-for-settefisk/1122233>

- Kyst.no: FHF-satsing på bakteriefloraens betydning for laksens helse.
<https://www.fhf.no/nyheter/nyhetsarkiv/stor-fhf-satsing-paa-bakteriefloraens-betydningen-for-oppdrettslaksens-helse/>
- Hatchery International: Norwegian researchers launch hatchery water quality study
<http://magazine.hatcheryinternational.com/publication/?m=53689&i=469339&view=contentsBrowser>
- Tekfisk: Skal hjelpe oppdretterne til å få bedre kontroll
<https://fiskeribladet.no/tekfisk/nyheter/?artikkel=59528>

12 Samarbeid



MonFisk (NMBU). Det ble tatt ut prøver av gjeller og mucus hos alle de fem anleggene som deltok i MonMic. Disse har nå blitt sekvensert på samme måte som i MonMic og skal korreleres med vann- og biofilmmikrobiota fra MonMic i løpet av 2020. Dette vil publiseres i en masteroppgave og i et vitenskapelig tidsskrift som en del av en doktorgradsavhandling.

- Renate Sandberg (2020). Mapping bacterial community structures in gill and skin mucus of Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolt from five different RAS facilities. Master, Institutt for Bioteknologi og matvitenskap. Leveres høsten 2020.
- NTNU David Person (In review). Variations in mucous cell numbers in gills of Atlantic salmon pre smolt (*Salmo salar*) in commercial freshwater farms in Norway. Journal of Fish diseases.

13 Referanser

Attramadal, K. J., Truong, T. M. H., Bakke, I., Skjermo, J., Olsen, Y. and Vadstein, O. (2014). "RAS and microbial maturation as tools for K-selection of microbial communities improve survival in cod larvae." *Aquaculture* **432**: 483-490.

Bakke, I., Åm, A. L., Kolarevic, J., Ytrestøyl, T., Vadstein, O., Attramadal, K. J. K. and Terjesen, B. F. (2017). "Microbial community dynamics in semi-commercial RAS for production of Atlantic salmon post-smolts at different salinities." *Aquacultural Engineering* **78**: 42-49.

Bartelme, R. P., McLellan, S. L. and Newton, R. J. (2017). "Freshwater recirculating aquaculture system operations drive biofilter bacterial community shifts around a stable nitrifying consortium of ammonia-oxidizing archaea and comammox Nitrospira." *Frontiers in microbiology* **8**: 101.

Blancheton, J. P., Attramadal, K. J. K., Michaud, L., d'Orbcastel, E. R. and Vadstein, O. (2013). "Insight into bacterial population in aquaculture systems and its implication." *Aquacultural Engineering* **53**: 30-39.

Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M. and Asnicar, F. (2019). "Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2." *Nature biotechnology*: 1.

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A. and Holmes, S. P. (2016). "DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data." *Nature methods* **13**(7): 581.

Cordier, T., Esling, P., Lejzerowicz, F., Visco, J., Ouadahi, A., Martins, C., Cedhagen, T. and Pawlowski, J. (2017). "Predicting the Ecological Quality Status of Marine Environments from eDNA Metabarcoding Data Using Supervised Machine Learning." *Environ Sci Technol* **51**(16): 9118-9126.

De Schryver, P. and Vadstein, O. (2014). "Ecological theory as a foundation to control pathogenic invasion in aquaculture." *The ISME journal* **8**(12): 2360-2368.

Hageskal, G., Lewin, A. and Haugen, T. (2019). Method for simultaneous detection of *F. psychrophilum* and *Y. ruckeri* in Norwegian aquaculture by droplet digital PCR. *Frisk Fisk 2019*. Tromsø.

Hindson, B. J., Ness, K. D., Masquelier, D. A., Belgrader, P., Heredia, N. J., Makarewicz, A. J., Bright, I. J., Lucero, M. Y., Hiddessen, A. L. and Legler, T. C. (2011). "High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number." *Analytical chemistry* **83**(22): 8604-8610.

Katoh, K., Asimenos, G. and Toh, H. (2009). Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. *Bioinformatics for DNA sequence analysis*, Springer: 39-64.

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M. and Glöckner, F. O. (2013). "Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies." *Nucleic acids research* **41**(1): e1-e1.

Lane, D. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In 'Nucleic acid techniques in bacterial systematics'. (Eds E Stackebrandt, M Goodfellow) pp. 115-175, John Wiley and Sons: Chichester, UK.

Martins, C., Eding, E. H., Verdegem, M. C., Heinsbroek, L. T., Schneider, O., Blancheton, J.-P., d'Orbcastel, E. R. and Verreth, J. (2010). "New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: A perspective on environmental sustainability." *Aquacultural engineering* **43**(3): 83-93.

McMurdie, P. J. and Holmes, S. (2013). "phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data." *PloS one* **8**(4): e61217.

Nylund, S., Steigen, A., Karlsbakk, E., Plarre, H., Andersen, L., Karlsen, M., Watanabe, K. and Nylund, A. (2015). "Characterization of 'Candidatus Syngnamydia salmonis' (Chlamydiales, Simkaniaceae), a bacterium associated with epitheliocystis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)." Archives of microbiology **197**(1): 17-25.

Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., O'hara, R., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, M. H. H. and Wagner, H. (2010). "Vegan: community ecology package. R package version 1.17-4." <http://cran.r-project.org>. Acesso em **23**: 2010.

Price, M. N., Dehal, P. S. and Arkin, A. P. (2009). "FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix." Molecular biology and evolution **26**(7): 1641-1650.

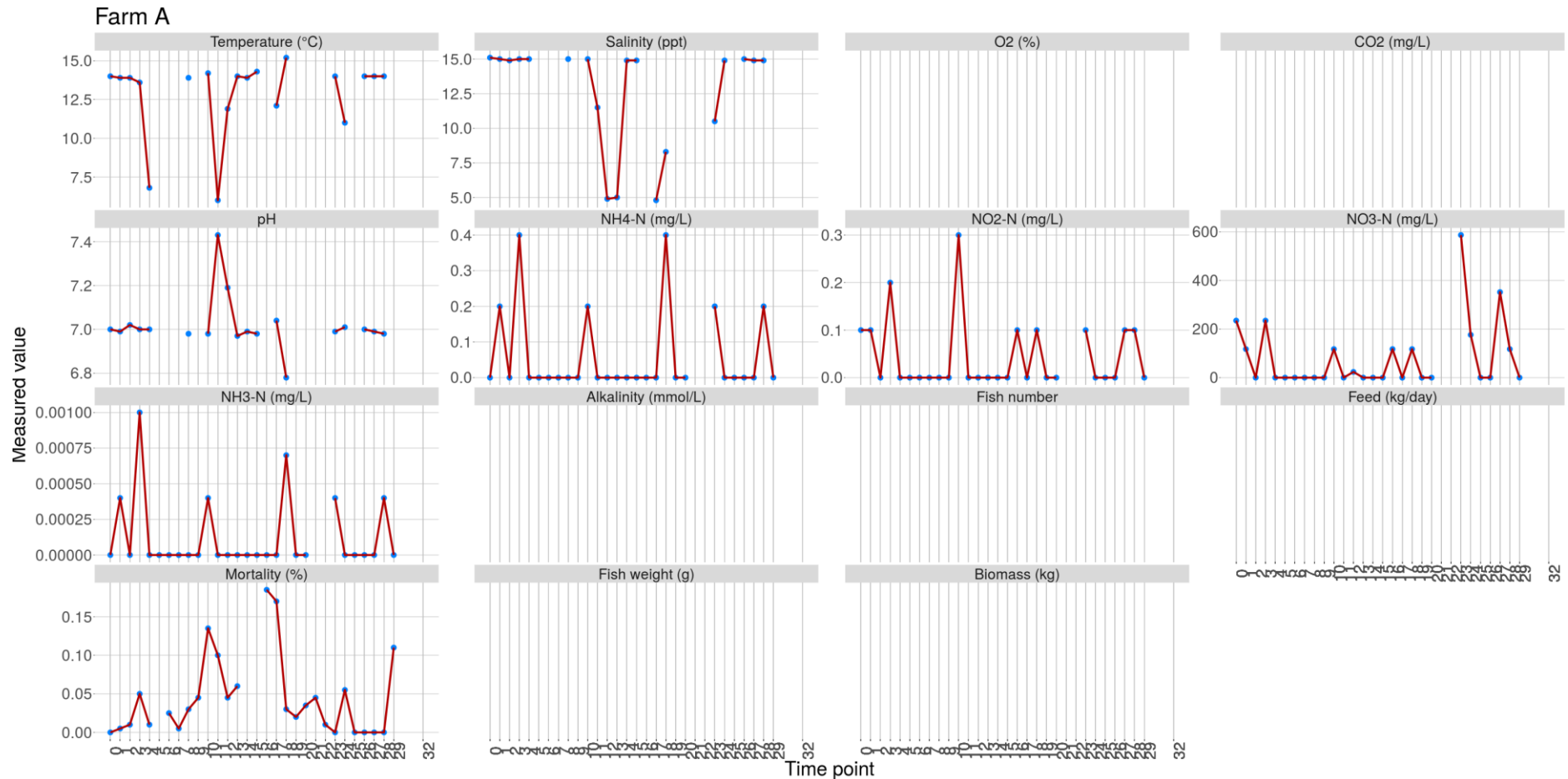
Schreier, H. J., Mirzoyan, N. and Saito, K. (2010). "Microbial diversity of biological filters in recirculating aquaculture systems." Current opinion in biotechnology **21**(3): 318-325.

Smith, M. B., Rocha, A. M., Smillie, C. S., Olesen, S. W., Paradis, C., Wu, L., Campbell, J. H., Fortney, J. L., Mehlhorn, T. L., Lowe, K. A., Earles, J. E., Phillips, J., Techtmann, S. M., Joyner, D. C., Elias, D. A., Bailey, K. L., Hurt, R. A., Preheim, S. P., Sanders, M. C., Yang, J., Mueller, M. A., Brooks, S., Watson, D. B., Zhang, P., He, Z., Dubinsky, E. A., Adams, P. D., Arkin, A. P., Fields, M. W., Zhou, J., Alm, E. J. and Hazen, T. C. (2015). "Natural Bacterial Communities Serve as Quantitative Geochemical Biosensors." mBio **6**(3): e00326-00315.

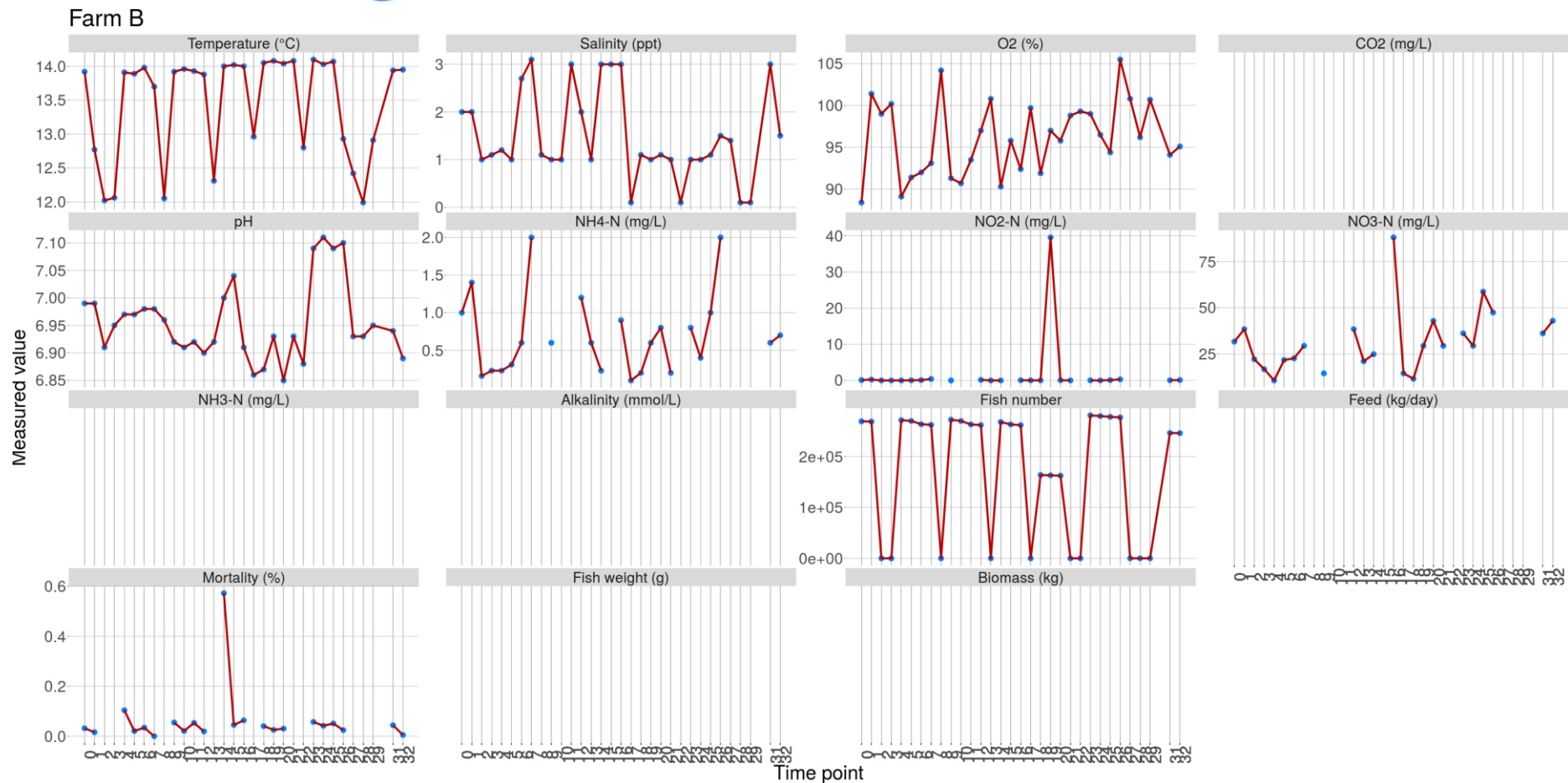
Tørud, B., Jensen, B. B., Gåsnes, S. K., Grønbech, S. and Gismervik, K. (2019). Dyrevelferd i settefiskproduksjonen (SMÅVEL). **Rapport 14-2019**.

Wietz, M., Hall, M. R. and Høj, L. (2009). "Effects of seawater ozonation on biofilm development in aquaculture tanks." Systematic and Applied Microbiology **32**(4): 266-277.

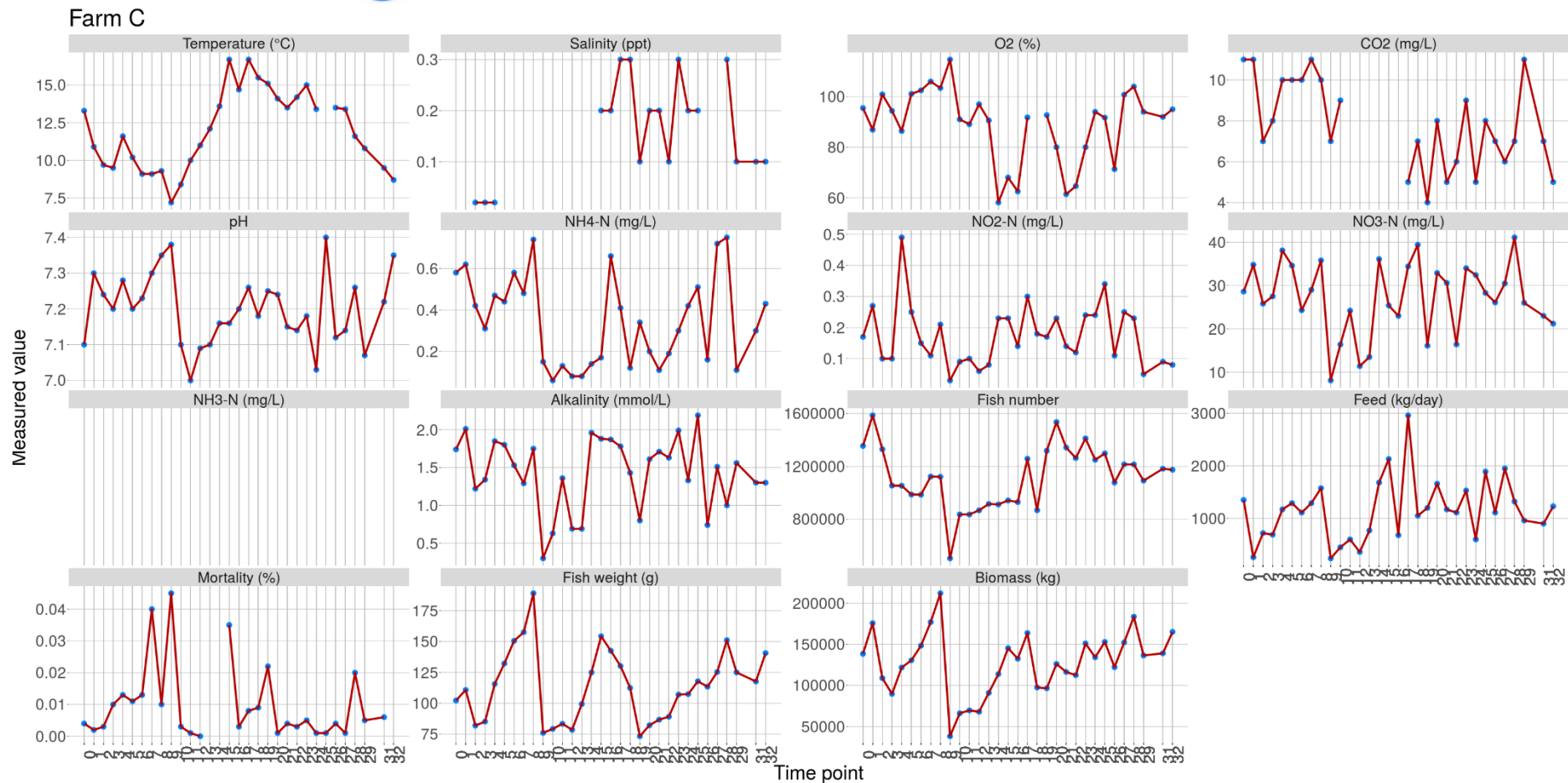
Vedlegg 1



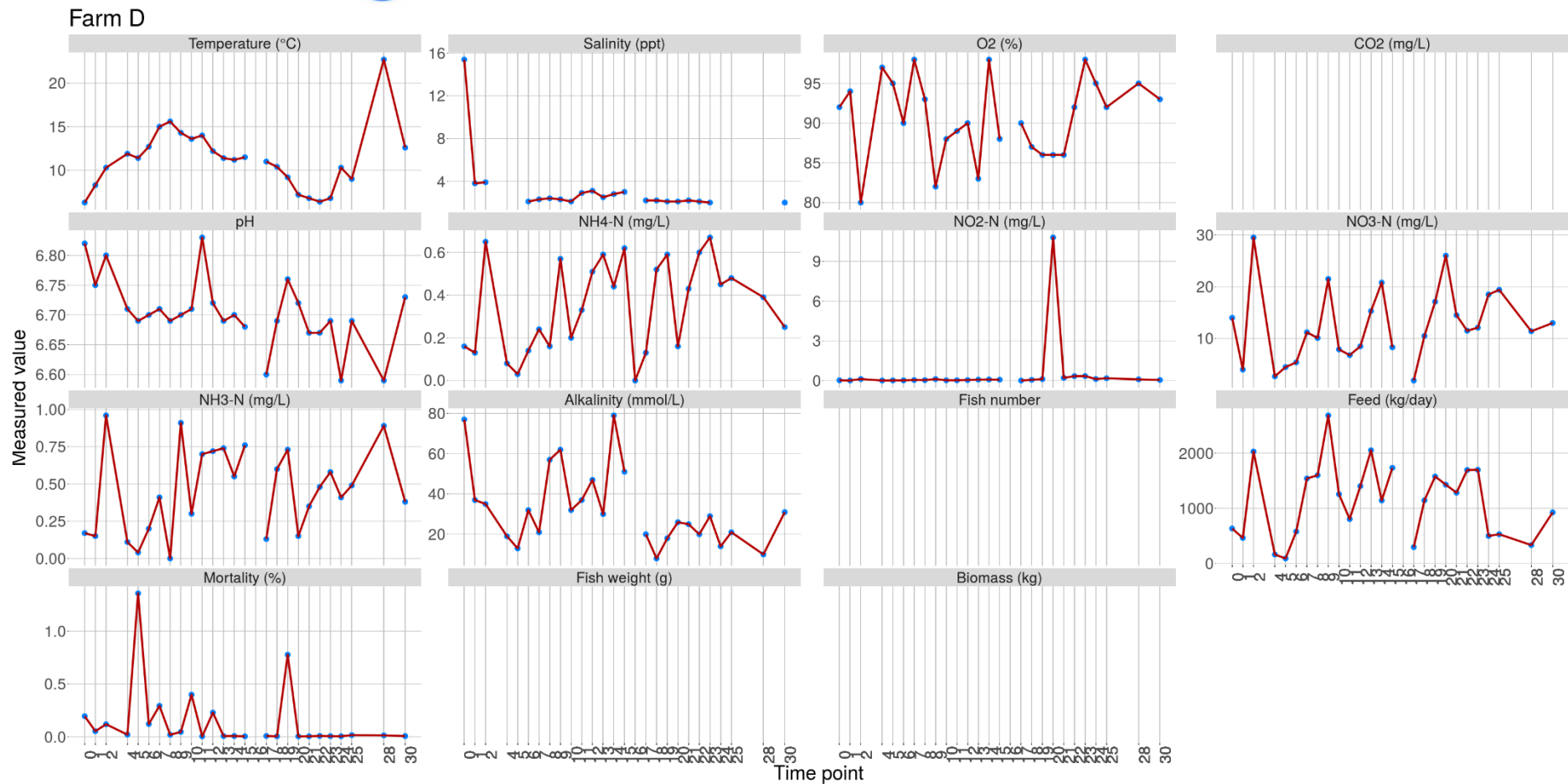
Figur 1. Fysisk og kjemisk vannkvalitetsparametere gjennom perioden for Anlegg A. X-aksen representerer tidslinjen, og y-akse viser verdier for hver parameter. Parametere som mangler er blank i figuren. Rød linje på blå prikker indikerer kontinuerlige målinger mens prikker uten rød linje indikerer målinger som ikke var kontinuerlige.



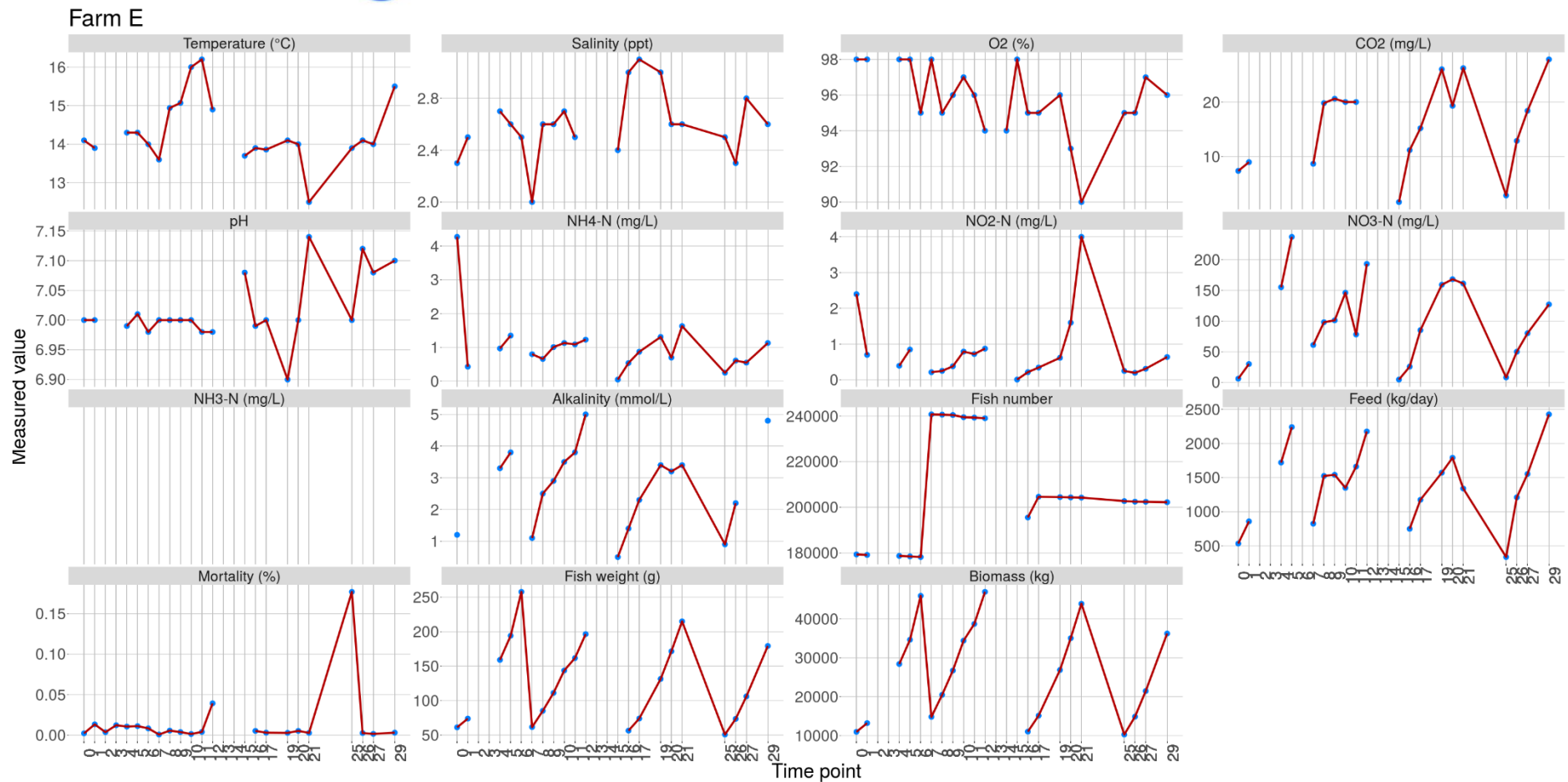
Figur 2. Fysisk og kjemisk vannkvalitetsparametere gjennom perioden for Anlegg B. X-aksen representerer tidslinjen, og y-akse viser verdier for hver parameter. Parametere som mangler er blank i figuren. Rød linje på blå prikker indikerer kontinuerlige målinger mens prikker uten rød linje indikerer målinger som ikke var kontinuerlige.



Figur 3. Fysisk og kjemisk vannkvalitetsparametere gjennom perioden for Anlegg C. X-aksen representerer tidslinjen, og y-akse viser verdier for hver parameter. Parametere som mangler er blank i figuren. Rød linje på blå prikker indikerer kontinuerlige målinger mens prikker uten rød linje indikerer målinger som ikke var kontinuerlige.



Figur 4. Fysisk og kjemisk vannkvalitetsparametere gjennom perioden for Anlegg D. X-aksen representerer tidslinjen, og y-akse viser verdier for hver parameter. Parametere som mangler er blank i figuren. Rød linje på blå prikker indikerer kontinuerlige målinger mens prikker uten rød linje indikerer målinger som ikke var kontinuerlige.



Figur 5. Fysisk og kjemisk vannkvalitetsparametere gjennom perioden for Anlegg E. X-aksen representerer tidslinjen, og y-akse viser verdier for hver parameter. Parametere som mangler er blank i figuren. Rød linje på blå prikker indikerer kontinuerlige målinger mens prikker uten rød linje indikerer målinger som ikke var kontinuerlige.