

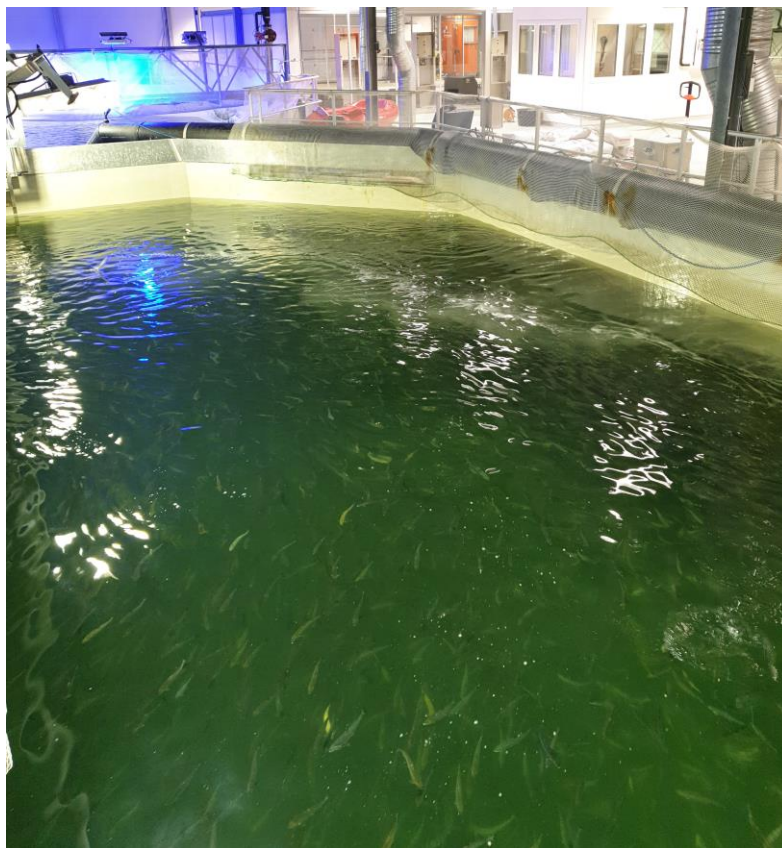
# **FHF SLUTTRAPPORT**

## **MICROBIAL COLONISATION IN RAS**

**Project 901470**

**Prosjektansvarlig: Professor Heidrun Wergeland, UiB**

**Prosjektmedarbeider: Dr. Irene Roalkvam, UiB**



**UNIVERSITETET I BERGEN**

# Innhold

<b>1</b>	<b>Sammendrag</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>Innledning</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>Problemstilling og målsetning</b>	<b>6</b>
<b>4</b>	<b>Prosjektgjennomføring</b>	<b>8</b>
<b>5</b>	<b>Oppnådde resultater og diskusjon</b>	<b>11</b>
<b>6</b>	<b>Hovedfunn</b>	<b>20</b>
<b>7</b>	<b>Leveranser</b>	<b>21</b>

## **1. Sammendrag**

I lukkede resirkulerende akvakultur system (RAS) er det viktig med god vannkvalitet for vellykket vekst og utvikling av post-smolt laks. De nitrifiserende mikroorganismene i biofilteret bidrar til god vannkvalitet ved å omdanne ammonium til nitrat, og redusere mengden organisk materiale i vannet. En av de største utfordringene ved oppstart av nytt RAS er å få etablert en populasjon med nitrifiserende bakterier i biofilteret sånn at filteret er operativt når fisken blir satt inn. I dette prosjektet har vi fulgt etableringen av nitrifiserende bakterier i to nye RAS biofiltre, og sammenlignet effektiviteten av to ulike inokulum for RAS biofilter i veksteksperimenter. Resultatene viste at de nitrifiserende populasjonene i de to nye RAS biofiltre utviklet seg ulikt. Dette ble sannsynligvis forårsaket av store variasjoner i vannkvaliteten de første 4 månedene av driften, og ulik biomasse tilknyttet hvert biofilter. Biofilteret tilknyttet kar med lite fisk hadde best modning i form av lavere nitritt konsentrasjoner og høyere andel nitrifiserende bakterier etter 4 måneder. Pågående korrelasjonsanalyser vil muligens vise faktorer som er gunstige for biofilteraktivering. Vekstforsøkene viste at overført biofiltermateriale fra et modnet RAS oppnådde nitritt og nitrat produksjon tidligst sammenlignet med kommersielt inokulum, og nådde de høyeste konsentrasjonene over tid. Sekvensering av 16S rRNA gener viste også at kulturene med overførte biofilter materiale hadde størst andel nitrifiserende bakterier etter 39dagers inkubasjon.

## **English Summary**

In recirculating aquaculture systems (RAS) good water quality is essential for successful breeding of post-smolt Atlantic salmon. The nitrifying microorganisms in the biofilter play an important role in water improvement; by converting ammonium to nitrite and nitrate, and removing some of the organic matter. One of the greatest challenges when starting a new RAS is to establish the nitrifying population in the biofilter so that the biofilter is fully operational before the fish is installed. In this project we have monitored the establishment of a nitrifying population in two new RAS biofilters, and compared the nitrifying performances of two different biofilter inoculums in growth experiments. The results showed great differences in the development of nitrifying population in the new biofilters. This is probably caused changing water quality during the first 4 months of production, and differences in stocking densities in tanks associated with each biofilter. The biofilter associated with low biomass had the most successful activation progress, due to lower concentrations of nitrite during production and high relative abundance of nitrifying bacteria after 4 months. Statistical analyses are ongoing, and might identify correlations between factors that can influence the biofilter activation process. The growth experiments showed that transferred biofilter material from an established RAS generated nitrite and nitrate earliest, compared to commercial inoculum, and also

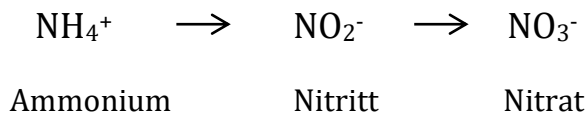
achieved the highest concentrations of nitrite and nitrate. The 16S rRNA gene sequencing showed that growth cultures containing transferred biofilter material had the highest proportion of nitrifying bacteria in the total population after 39 days of incubation.

## 2. Innledning

### *Faglig bakgrunn:*

Store ressurser brukes i dag på innovasjon og teknologiutvikling innen akvakultur for å skape gode løsninger for bærekraftig sjømatproduksjon. Derfor bygges det stadig flere landbaserte oppdrettsanlegg basert på Resirkulerende akvakultur system (RAS) langs norskekysten. Noen av fordelene med RAS anleggene er lavt vannforbruk pga. lav utskiftningsrate av vann sammenlignet med andre oppdrettsteknologier, enklere avfallshåndtering, økt stabilitet i vannkvalitet og god kontroll over de mikrobielle miljøene som fisken lever i. Den marine RAS teknologien brukes hovedsakelig til oppdrett av laks i Norge, særlig i den første delen av post-smolt perioden. Dette gjør at fisken har kortere oppholdstid i merdene i sjøen før den er slakteklar, noe som gir mindre luseangrep, færre lusebehandlinger, økt fiskevelferd og bedret økonomi fordi man totalt sett får færre utgifter og mindre fiskedød.

RAS anleggene krever flere steg med filtrering og rensing av vannet for å opprettholde god vannkvalitet ettersom det er lav utskiftningsrate av vannet i karene. Et av de første stegene i denne prosessen er biofiltrering, der vannet ledes gjennom et stort kammer fylt med plastterninger som har en overflate dekket av biofilm som inneholder ulike bakterier. Blant disse er spiller de nitrifiserende bakteriene en veldig viktig rolle ved at de fjerner giftig ammonium som skilles ut av fiskens gjeller og omdanner det til nitritt og videre til nitrat:



Nitrifisering av ammonium til nitrat utføres i to steg, der to ulike grupper av bakterier samarbeider om prosessen. I tillegg til nitrifisering kan bakteriene i biofilteret være involvert i flokkulering og nedbryting av organiske materiale fra vannet. De har også en positiv effekt for fiskens helse fordi ønskede miljøbakterier tar opp plassen og ressursene fra potensielt sykdomsfremkallende bakterier slik at disse ikke slipper til.

En god sammensetning av bakterier i biofilteret er viktig for å danne et funksjonelt filter som gir god vannkvalitet. Dessverre kan det være vanskelig å få i gang et nytt RAS fordi modningsprosessen av nytt biofilter tar lang tid. De nitrifiserende bakteriene vokser svært sakte, særlig de som omdanner nitritt til nitrat, og det kan ta flere måneder før biofilteret inneholder den ønskede bakteriepopulasjonen som gjør at filteret fungerer optimalt. Til tross for at det finnes ulike metoder for å etablere bakteriene i biofilteret, inkludert tilsetning av ønskede bakterier ved inokulering, er den langsomme utviklingen av den nitrifiserende populasjonen den største utfordringen når et nytt RAS skal startes

opp eller driftes over tid. Per i dag finnes det lite informasjon om optimale vekstvilkår for de nitrifiserende bakteriene i RAS eller hvilke faktorer som påvirker utviklingen av bakteriene i biofilteret.

*Prosjektets omfang:*

Prosjektet består av to deler: 'Mikrobiell kolonisering av RAS biofilteret' (A) og 'Optimal salinitet for mikrobiell oksidasjon av ammonium' (B). Del A involverte ukentlig prøvetaking av biofilm fra to biofiltre og vann fra tilhørende kar hos Erko Settefisk AS gjennom den første produksjonssyklusen (4mnd). Mikroorganismer i prøvematerialet ble identifisert ved bruk sekvenseringsteknologi, og dataene ble supplert med vannkjemi parametere målt i samme periode av Erko Settefisk AS. Del B ble utført som lab eksperiment ved UiB, og var basert på dyrkningsforsøk med bakteriekulturer. Mikroorganismer i kulturene ble identifisert som over, og konsentrasjonene av Nitrogenholdige stoffer ble målt.

*Prosjekt organisering:*

Professor Heidrun Wergeland, Institutt for Biovitenskap, Universitetet i Bergen  
(Prosjektleder)

Forsker PhD Irene Roalkvam, Institutt for Biovitenskap, Universitetet i Bergen  
(Prosjektmedarbeider)

*Sammarbeidspartnere:*

Rune Sandvik, Erko Settefisk AS

Solveig Nygård, Fomas Fiskehelsetjeneste

Forsker PhD Karine Drønen, UiB

Prosjektet vil bli koordinert sammen med det pågående MONITOR prosjektet (ledet av Heidrun Wergeland) som er finansiert av NFR. Prosjektet er basert på grunnforskning og utdanning ved Institutt for Biovitenskap ved UiB innen mikrobiologi og fiskehelse.

### 3. Problemstilling og Målsetning

#### *Mikrobiell kolonisering av RAS biofilteret (A)*

Oppstartsperioden av nytt RAS kan gi et ustabil miljø for fisken, med varierende vannkvalitet og et umodnet biofilter som ikke umiddelbart håndterer ammonium produksjonen fra fisken. I denne studien fikk vi en unik mulighet til å følge den mikrobielle modningen av to nye biofilter hos Erko Settefisk AS gjennom de 4 første månedene av produksjonen. I tillegg til å studere utviklingen av bakteriepopulasjonene i biofiltrene, ble data med relevante vannkjemi parametere for samme periode skaffet fra Erko Settefisk AS slik at endringer i bakteriepopulasjonen kan tolkes i forhold til endringer i vannkvalitet. Pågående korrelasjonsanalyser vil sannsynligvis kunne indikere hvilke faktorer som påvirker utviklingen av de nitrifiserende bakteriene i biofilteret i positiv eller negativ retning, og kanskje også vise hvilke andre typer bakterier som fremmer modning av biofilteret.

Basert på resultater fra denne studien vil det foreligge informasjon om koloniseringen og utviklingen av de nitrifiserende bakteriene i biofilteret, og anbefalinger angående oppstart av RAS biofilter som vil være nyttige for andre RAS anlegg.

Resultatmål til Del A:

- Identifisere og dokumentere hvilke mikroorganismer som etablerer seg i et nytt RAS biofilter, med særlig fokus på bakterier som er involvert i nitrifiseringsprosessen.
- Studere hvilken kombinasjon vannkjemi parametere som fremmer eller hemmer modningen av biofilteret.
- Bidrag til oppdrettsnæringen med anbefalinger om oppstart av RAS biofilter basert på resultatene i prosjektet, spesielt om optimal vannkvalitet for modning av bakteriepopulasjonene i biofilter.
- Stabil vannkvalitet og effektiv modning av biofilteret kan gi mer robust post-smolt og redusert fiskedød i oppstartsfasen. Dette kan på sikt også gi redusert forsikringskostnad for første produksjonssyklus i marint RAS.
- Publikasjon i nasjonale og internasjonale tidsskrift.

#### *Optimal salinitet for mikrobiell oksidasjon av ammonium (B)*

Alle bakterier har best vekst ved sin optimale salinitet, og justering av saliniteten kan gi effektiv og vellykket etablering av ønskede bakterier i et nytt RAS biofilter. For de nitrifiserende bakteriene kan optimal salinitet gi kortere modningstid av biofilteret og deretter effektiv ammonium oksidasjon. I denne studien vil vi bruke bakteriekulturer på

lab til å undersøke hvordan ulik salinitet påvirker utviklingen og veksten av bakteriene i kulturer tilsatt to ulike kilder med inokulum. Videre vil vi sammenligne nitrifiseringen til bakteriekulturer med optimal salinitet de ulike inokulumene ved å kvantifisere produksjon av nitritt og nitrat fra ammonium i kulturene.

Vekstforsøkene vil gi informasjon om anbefalt salinitet for nitrifiserende bakterier i to ulike typer inokulum som kan brukes i marine RAS, og indikere hvilken type inokulum som gir den mest effektive modningen av nytt RAS biofilter. Dette kan være nyttig informasjon for fremtidige marine RAS anlegg som skal aktivere nytt biofilter.

Resultatmål til Del B:

- Identifisere og sammenligne den mikrobielle sammensetningen i to inokulum for marint RAS: kommersielt inokulum og biofilmbærere fra modnet RAS biofilter.
- Bestemme optimal salinitet for best vekst og høyest omdanningsrate (ammonium til nitrat) for nitrifiserende bakterier i de ulike inokulumene for marint RAS.
- Bidrag til oppdrettsnæringen med anbefalinger om oppstart av RAS biofilter basert på resultatene i prosjektet.
- Publikasjon i nasjonale og internasjonale tidsskrift.



## 4. Prosjektgjennomføring

### *Mikrobiell kolonisering av RAS biofilteret (A)*

I denne studien har vi fulgt den mikrobielle koloniseringen av to nye biofiltre i oppstartsfasen til en ny RAS modul hos Erko settefisk AS. Denne marine RAS modulen består av 4 kar (1150m<sup>3</sup> hver) og to biofiltre (300m<sup>3</sup> biofiltermateriale i form av plastterninger i hvert filter), der hvert biofilter er tilkoblet 2 kar (Figur 1). RAS modulen har kapasitet til totalt 500.000 post-smolt laks som vokser fra ca 80-90g til ca 800g i løpet av en produksjonssyklus på 4 måneder.

Produksjonen startet i desember 2017, og det ble tatt ukentlige prøver gjennom den første produksjonssyklusen av biofilm fra begge biofiltrene og vann fra ett av de tilhørende karene til hvert filter.



*Figur 1. Det marine RAS anlegget til Erko Settefisk AS består av 4 kar med en kapasitet på 125.000 post-smolt laks hver (venstre). Modulen inneholder også 2 biofiltre som er tilknyttet to kar hver, der mikrobiell aktivitet bidrar til å forbedre vannkvaliteten ved å fjerne ammonium og organisk materiale i vannet. Ulike bakterier danner en biofilm med kompleks samfunnsstruktur på plastterningene i biofilteret (høyre). Foto: Karine Drønen og Irene Roalkvam.*

Fra biofiltrene ble det gjort DNA ekstraksjon fra biofilm fra 2-3 plastterninger. I tillegg ble 240ml vann fra karene filtrerte for å samle pelagiske mikroorganismer som ble brukt i DNA ekstraksjon. Molekylærbiologiske metoder ble brukt for å identifisere og beskrive det mikrobielle samfunnet i hver prøve (samme metoder brukes i det pågående MONITOR prosjektet). Et markørgen (16S rRNA genet) som finnes i alle mikroorganismer ble amplifisert ved hjelp av PCR, før alle prøvene ble individuelt merket og blandet sammen til en prøve (ampliconbibliotek). Moderne Ion Torrent sekvensering av prøven ble utført på UiB, og påfølgende oppdeling av sekvenser i individuelle prøver og kvalitetssjekk av datasettet ble gjort ved å bruke ulike

bioinformatiske verktøy. Tilslutt ble mikroorganismene i hver prøve identifisert ved søk i databaser med genetisk informasjon.

De mikrobielle resultatene støttet av målte vannkjemi parametere ved Erko Settefisk AS og egne observasjoner av situasjonen i anlegget ved de ukentlige prøvetakingene. Fra probene i anlegget fikk vi daglige mål på temperatur, salinitet, pH og konduktivitet. I tillegg ble konsentrasjoner av TAN (totalt ammonium nitrogen), ammonium, nitritt og nitrat målt ved bruk av reagenssett og fotometer av personalet ved Erko Settefisk AS, og daglig fiskedød ble estimert.

### *Optimal salinitet for mikrobiell oksidasjon av ammonium (B)*

Optimal salinitet for de nitrifiserende bakteriene i biofilteret ble studert ved bruk av bakteriekulturer i veksteksperimentet på lab ved UiB (Figur 2). Vi sammenlignet effektiviteten av to ulike biofilter inokulum: kommersielt inokulum og overførte biofilmbærere (plastterninger) fra et modnet RAS biofilter.



*Figur 2: Bakteriekulturene ble tilsatt overført biofiltermateriale fra modnet RAS eller kommersielt inokulum. Kulturene inneholdt også sjøvann blandet med ferskvann til ønsket salinitet, ammonium, kilde til organisk materiale og rene biofilmbærere klare til kolonisering. Foto: Irene Roalkvam.*

I det første eksperimentet var målet å finne optimal salinitet for hvert inokulum. De to typene inokulum ble dyrket ved 9 ulike saliniteter, dvs. 16-32‰ NaCl (alle kulturene hadde 3 paralleller), hvor ferskvann og sjøvann hentet hos Erko settefisk AS ble blandet for å oppnå ulike saliniteter. Kulturene ble tilsatt ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) og organisk kilde, og deretter inkubert ved  $14^\circ\text{C}$  i 4 uker.

I det andre eksperimentet ble det brukt optimale saliniteter for hvert inokulum i kulturene, basert på resultatene fra det forrige eksperimentet. Kulturer tilsatt

kommersielt inokulum hadde 20‰ NaCl, mens kulturer tilsatt biofilm bærere hadde 26‰ NaCl. Kulturene ble inkubert ved 14°C i 40 dager.

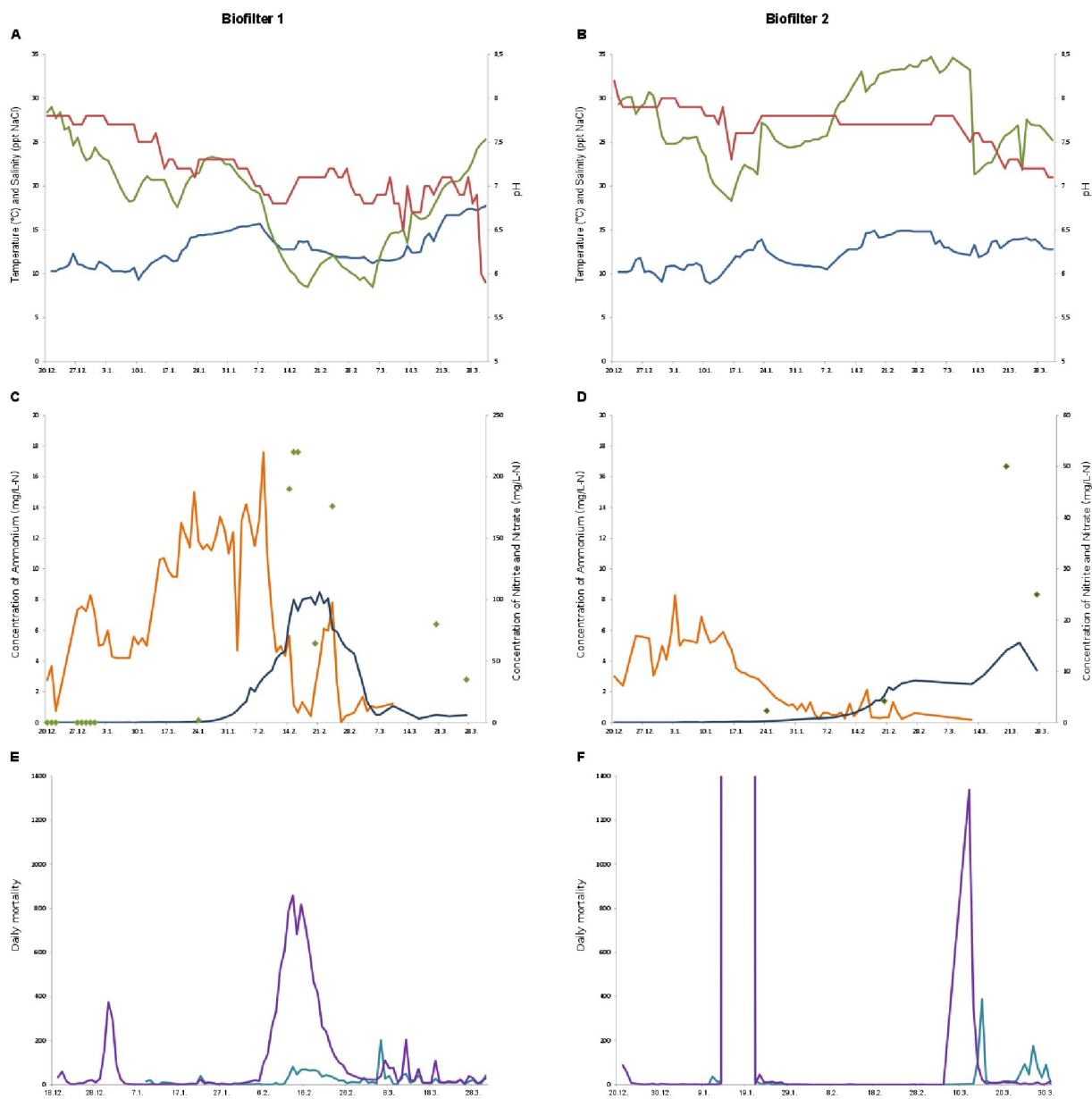
I begge eksperimentene ble konsentrasjoner av nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ), nitritt ( $\text{NO}_2^-$ ) og ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) målt ved bruk av reagenssett og fotometer for å følge omdanningen av ammonium til nitrat i kulturene. I det første eksperimentet ble konsentrasjonene målt ved endepunktet av vekstforsøket, mens i det andre eksperimentet ble det jevnlig tatt ut prøvevolum underveis. I tillegg ble det mikrobielle populasjonene i kulturene studert ved å telle antall celler i en CASY celle teller (første eksperimentet) eller ved å sekvensere 16S rRNA gener fra bakterier i både vekstmedium og biofilmer på plastterninger (andre eksperimentet).

## 5. Oppnådde resultater

### *Mikrobiell kolonisering av RAS biofilteret (A)*

Den mikrobielle modningen av to nye biofiltre i den nye RAS modul til Erko Settefisk AS ble studert ved å ta hyppige prøver av vann og biofilm gjennom den første produksjonssyklusen på 4 måneder. Biofiltrene ble aktivert ved å overføre et lite antall biofilmbærere fra biofilteret i en eldre og operativ RAS modul hos Erko Settefisk AS. Hvert biofilter var tilkoblet vannet fra 2 kar, slik at vannkvaliteten kunne justeres individuelt i hver halvdel av RAS modulen. Hvert kar fikk satt inn ca 125.000 post-smolt ved oppstart, men tekniske problemer førte til at fiskemengden ble redusert til ca 10.000 i hvert kar tilknyttet det ene biofilteret (Figur 3f). Dette førte til følgende studiesituasjon: Biofilter 1 hadde normal fisketetthet (100%) i tilhørende kar, mens Biofilter 2 hadde lav fisketetthet (8%) i tilhørende kar.

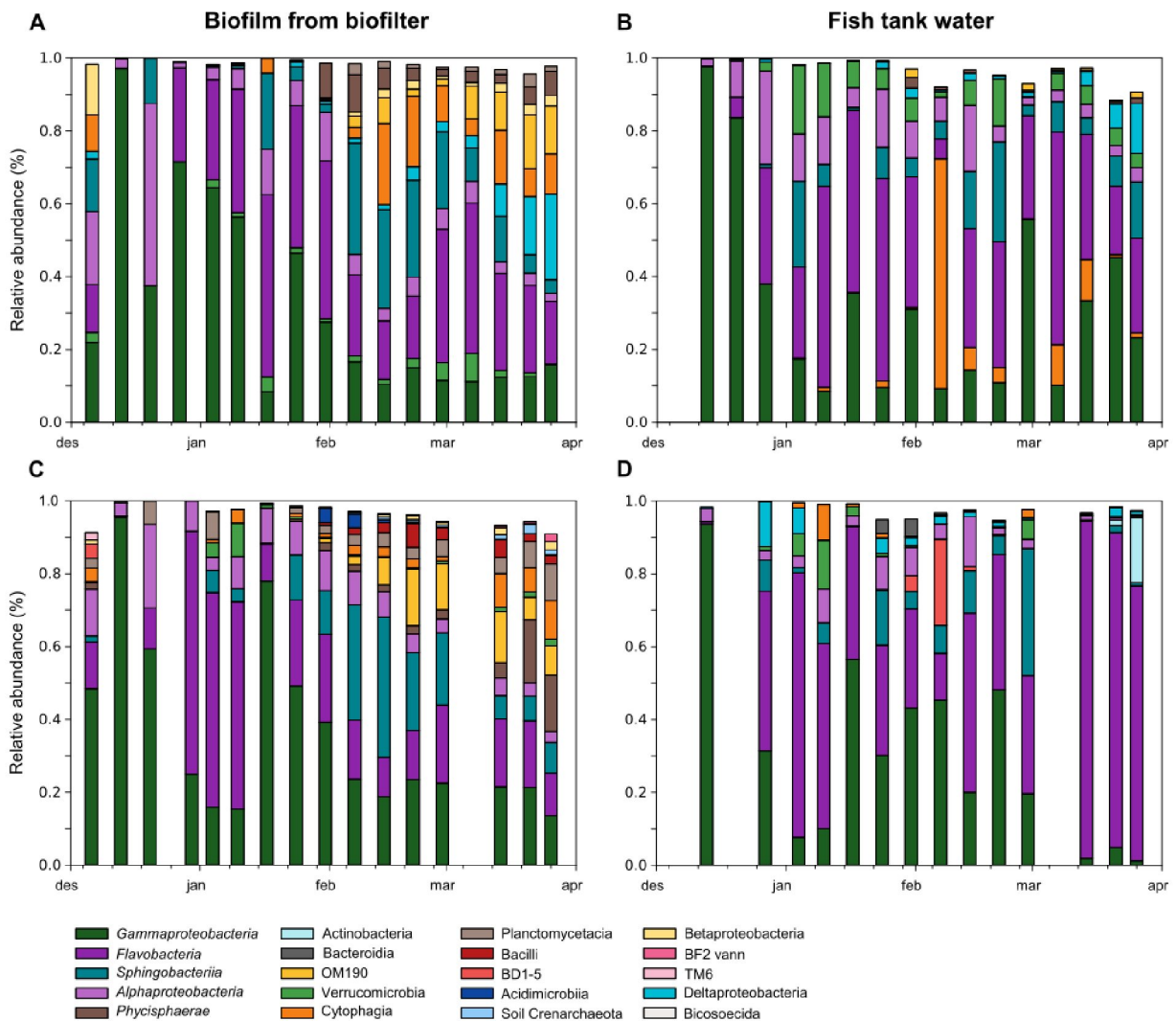
Vannkvaliteten ble overvåket daglig i anlegget, og målingene viste stor variasjon av enkelte vannkjemi parametere. Alle karene hadde høy pH i starten, sannsynligvis grunnet karbonatmineraler fra byggestøv og betong (Figur 3a, b). Temperaturen var stigende, men ble holdt innen rimelige grenseverdier for laks. Den gjennomsnittlige saliniteten i karene knyttet til Biofilter 1 var 22,3 ppt NaCl, bortsett fra en periode i februar-mars 2018 da saliniteten ble senket betraktelig for å fremme helning av sår i huden hos fisken (Figur 3a). I karene knyttet til Biofilter 2 var den gjennomsnittlige saliniteten 27,4 ppt NaCl gjennom hele perioden (Figur 3b). Ettersom biofilteret ikke var ferdig modnet da fisken ble satt inn ble det problemer med høye konsentrasjoner av ammonium og nitritt, spesielt i karene tilknyttet Biofilter 1 der biomassen var størst. Tilsetning av et oksiderende kjemikalium (Loz) bidro til nitrifisering av ammonium, og er nok årsaken til mye av nitrat produksjonen som ble detektert. I karene tilknyttet Biofilter 1 ble det målt opp til 17,6 mg/L ammonium og over 100 mg/L nitritt i løpet av produksjonssyklusen, noe som er meget høye verdier (Figur 3c). De høyeste konsentrasjonene ble målt i februar-mars da fiskene hadde sårdannelse, og økt fiskedød i den påfølgende perioden kan skyldes svekket helse grunnet sår eller dårlig vannkvalitet på grunn av høye konsentrasjoner av nitrogenholdige stoffer (Figur 3e). I karene tilknyttet Biofilter 2 ble det målt opp til 8,3 mg/L ammonium og 15,6 mg/L nitritt (Figur 3d). Karene tilknyttet Biofilter 2 hadde ikke økt fiskedød direkte forårsaket av sykdom eller grunnet sykdom eller høye konsentrasjoner av nitrogenholdige stoffer, men heller på grunn av teknisk svikt (midten av januar) og transportskader på nylig satt inn fisk (midten av mars) (Figur 3f).



*Figur 3: Vannkjemi parametere og fiskedød ble registrert daglig i Biofilter 1 og Biofilter 2. Temperatur (blå), og pH (rød) var ganske stabile over tid i Biofilter 1 (a) og Biofilter 2 (b), mens salinitet (grønn) var variabel. Konsentrasjonene av ammonium (oransj), nitritt (mørk blå) og nitrat (grønne punkter) var betydelig høyere i Biofilter 1 (c) enn Biofilter 2 (d). Legg merke til ulike verdier på aksene. Perioder mer økt fiskedød ble relatert til dårlig vannkvalitet eller sår i Biofilter 1 (e), og til teknisk svikt eller transportskader i Biofilter 2 (f).*

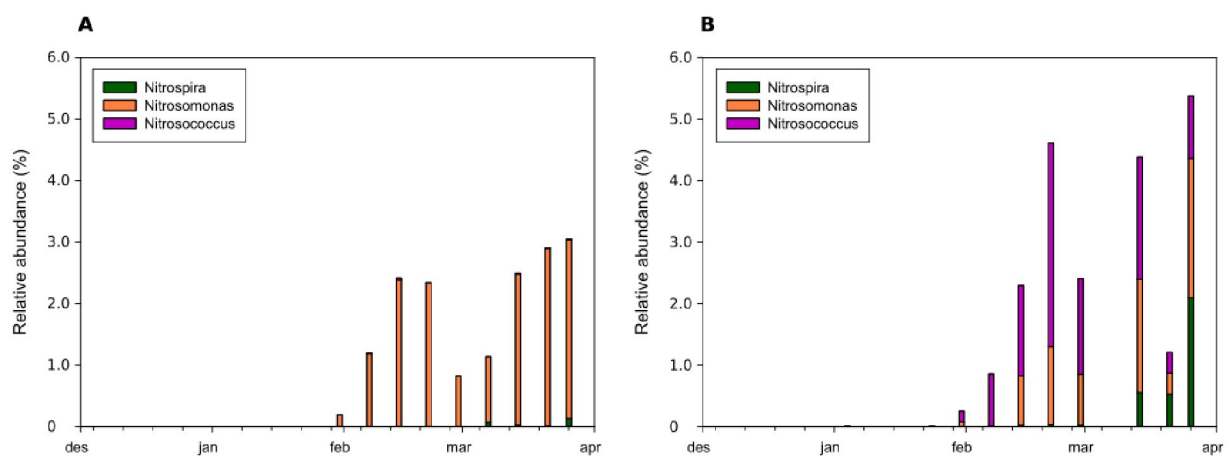
Bakteriepopulasjonene i biofilm på bærere fra biofiltrene eller vann fra tilhørende kar ble analysert ved å bruke moderne 16S rRNA gen sekvensering. Fra begge biofiltrene var det en tydelig suksesjon over tid, der mange ulike grupper bakterier hadde etablert seg i biofilmen mot slutten av produksjonssyklusen (Figur 4a, c). Disse bakteriepopulasjonene var forholdsvis stabile over tid, selv i perioder med ugunstige

vekstvilkår (unormal pH eller salinitet) eller lav vannkvalitet (høy konsentrasjon av ammonium, nitritt eller nitrat). I vannprøvene ble det funnet mange av de samme mikroorganismene som i biofilmene, men i disse prøvene hadde bakteriepopulasjonene større variasjon av de dominerende gruppene (Figur 4b, d). Alle de mest dominerende mikroorganismene som ble funnet i prøvene, det vil si bakterier og arker (en annen gruppe mikroorganismer enn bakterier) som hadde større en 2% relativ andel av populasjonen, var marine bakterier som ikke representerer en sykdomsrisiko, men som spiller en viktig rolle med næringsopptak fra anlegget og bidrar til å lage et godt miljø for fisken.



Figur 4: Resultatene av 16S rRNA gen analyser av biofilmene fra bærere i Biofilter 1 (a) og Biofilter 2 (b) viste en suksesjon, der samfunnsstrukturen ble mer kompleks over tid. Vannprøvene fra kar tilknyttet Biofilter 1 (b) og Biofilter 2 (d) viste større variasjon over tid enn biofilmene. Mikrobielle grupper som utgjør 2% eller mer av det totale samfunnet er vist i figuren.

Deteksjon av mikroorganismer som er knyttet til nitrifisering er av spesiell interesse i oppstartsfasen av et nytt biofilter, ettersom de spiller den viktigste rollen i biofiltreringen. Resultatene viser også disse hadde en gradvis suksessjon over tid, der den nitrifiserende populasjonen tilslutt utgjorde en andel på 3% av hele bakteriesamfunnet i Biofilter 1 (Figur 5a) og 5,4% i Biofilter 2 (Figur 5b). I biofilter 1 ble det hovedsakelig funnet *Nitrosomonas*, en av bakteriene som kan omdanne ammonium til nitritt, mens i Biofilter 2 ble det funnet både *Nitrosomonas* og *Nitrosococcus* som kan gjøre denne prosessen. De saktevoksende medlemmene av *Nitrospira* er knyttet til omdannelse av nitritt til nitrat, og denne gruppen ble funnet i begge biofiltrene, men utgjorde en større andel av bakteriesamfunnet i Biofilter 2. Resultatene er også støttet av de ansatte hos Erko Settefisk AS som bekreftet at Biofilter 2 var bedre modnet og hadde større effektivitet etter den første produksjonssyklusen, sammenlignet med Biofilter 1.



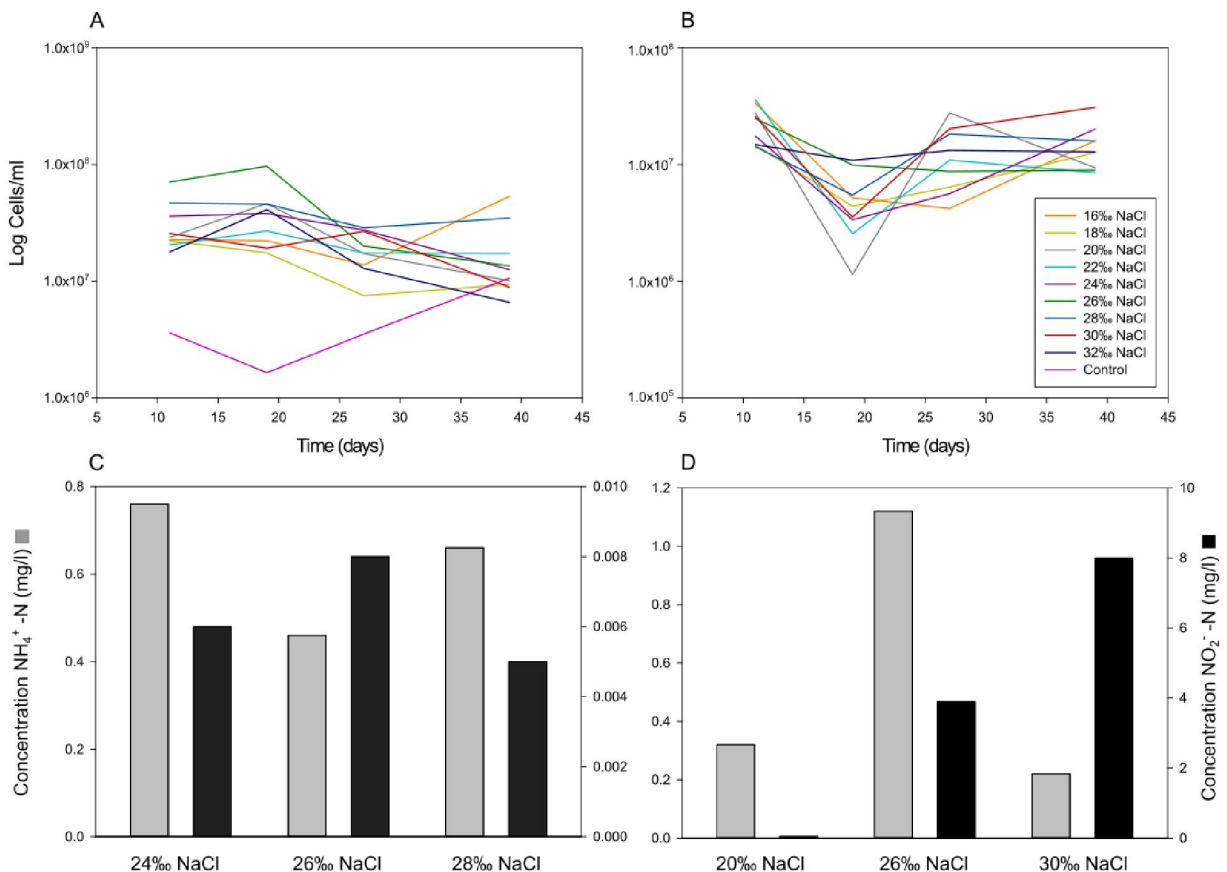
Figur 5: Analysene viste at sammensetningen av ulike nitrifiserende bakterier var ulik i Biofilter 1 (a) og Biofilter 2 (b). I biofilter 1 utgjorde den nitrifiserende populasjonen også en mindre andel av det totale samfunnet enn i Biofilter 2.

Oppstarten av nytt RAS biofilter kan være krevende ettersom et umodnet filter har dårligere kapasitet for å fjerne ammonium og organiske stoffer fra vannet, noe som kan påvirke fiskens velferd og helse på sikt. Studien viste at det ble dannet biofilm med økende kompleksitet i samfunnsstrukturen over tid i begge biofiltrene, men at den nitrifiserende populasjonen var betydelig større i biofilter 2 som var tilknyttet kar med liten biomasse. I biofilter 2 ble det funnet bakterier assosiert med begge stegene i nitrifikasjon, det vil si omdanning av ammonium til nitritt og videre til nitrat. I biofilter 1 var det en veldig liten andel med bakterier som kunne utføre det siste steget i nitrifikasjonen. Begge biofiltrene gjennomgikk perioder med varierende vannkvalitet og perioder med økt fiskedød, og pågående korrelasjonsanalyser mellom vannkvalitet og utbredelsen av nitrifiserende bakterier kan forhåpentligvis fortelle hvilke faktorer som påvirker modningen av biofilteret i positiv eller negativ retning.

### Optimal salinitet for mikrobiell oksidasjon av ammonium (B)

Veksteksperimentet med ulike saliniteter viste at bakteriekulturer tilsatt kommersielt inokulum eller overførte biofilm bærere fra et modnet RAS biofilter hadde vekst optimum ved ulike saliniteter. Kulturer tilsatt biofilm bærere hadde generelt god vekst, der kulturen med 26‰ NaCl viste høyest celletall/ml (Figur 6a). Konsentrasjonene av ammonium og nitritt var ganske like i kulturer med 24‰, 26‰ og 28‰ NaCl, men kulturen med 26‰ NaCl hadde den laveste konsentrasjonen av ammonium ved eksperimentets slutt, noe som indikerer høy ammonium omsetning (Figur 6c). Erko Settefisk AS kjører ofte produksjonssyklusene ved 26‰ NaCl, så det er rimelig å anta at bakteriene i biofilmen på bærerne kan tilpasse seg denne saliniteten. Nitrat ble ikke målt på grunn av problemer med reagenssettet for nitratmålinger, men beregninger viser at nitrat må ha blitt produsert.

Kulturer tilsatt kommersielt inokulum vokste saktere og hadde lavere celletall/ml, sammenlignet med kulturer tilsatt biofilmbærere (Figur 6b). Kulturene med 20‰ NaCl hadde høyest celletall. Både kulturer med 20‰ NaCl og 30‰ NaCl hadde lav konsentrasjon av ammonium (Figur 6d), men kulturen med 20‰ NaCl hadde samtidig lavest konsentrasjon av nitritt, noe som indikerte høy nitrat konsentrasjon. I tillegg opplyste produsenten av det kommersielle inokulumet at nitrifiseringsraten var noe lavere ved høyere salinitet.

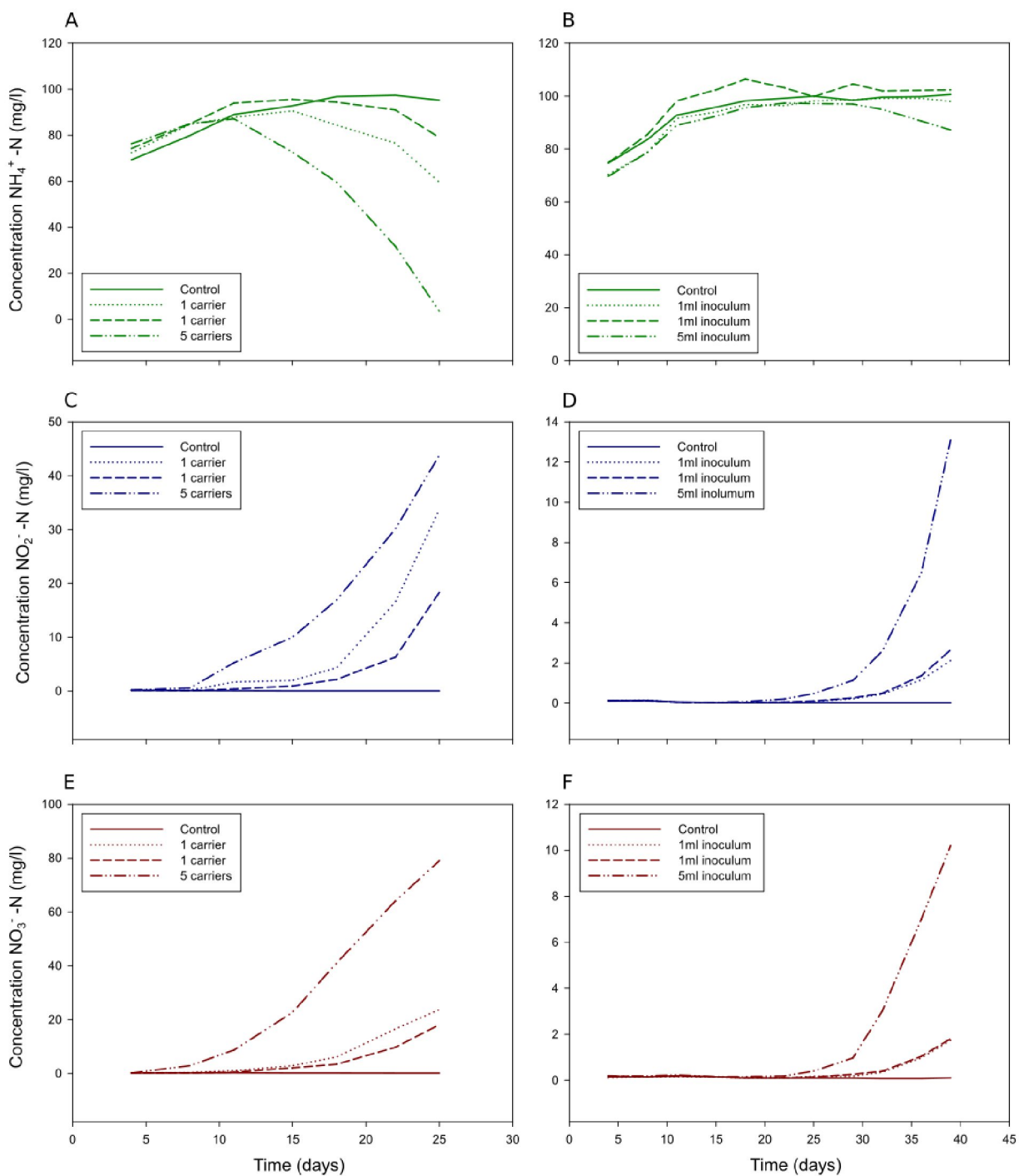




*Figur 6: Det første veksteksperimentet involverte kulturer med ulike saliniteter. Celletall/ml og konsentrasjon av ammonium og nitritt ble målt i kulturer tilsatt biofilmbærere fra etablert RAS biofilter (a, c) eller kommersielt innokulum (b, d). Legg merke til ulike skalaer på aksene for ammonium og nitritt konsentrasjoner (c, d).*

Både celledetelling og kvantifiserte vannkjemi parametere viste at optimal salinitet for kommersielt innokulum og overførte bærere var henholdsvis 20‰ and 26‰ NaCl. Derfor ble vekstbetingelser i kulturene optimalisert ved å bruke disse salinitetene for de ulike innokulumene i det andre vekstforsøket. Mikrobielle analyser viste at den nitrifiserende populasjonen i kommersielt innokulum var veldig ulik den i biofilmen på biofilmbærere fra modnet RAS biofilter. Det kommersielle innokulumet var dominert av ammonium oksiderende arker som er kjent for å ha en ganske lav ammonium oksidasjonsrate. De nitrifiserende bakteriene i biofilm fra bærerne utgjorde en liten andel av den totale populasjonen i biofilteret, men disse bakteriene har generelt en høyere ammonium oksidasjonsrate sammenlignet med arker.

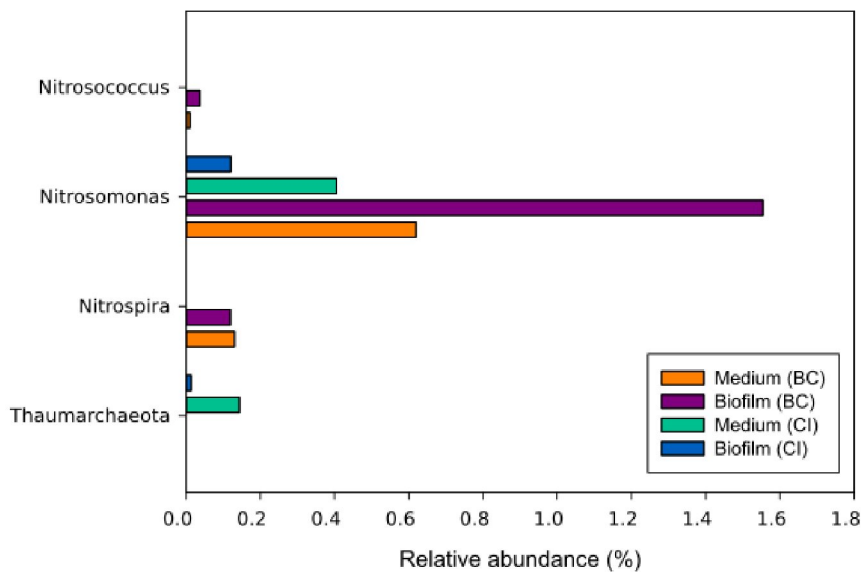
Basert på resultatene over ble det startet et nytt veksteksperiment med parallelle kulturer tilsatt enten biofilmbærere fra et etablert RAS eller kommersielt innokulum, der kulturene hadde henholdsvis 26‰ and 20‰ NaCl for å gi optimale vekstvilkår. Resultatene fra vekstforsøket viste at kulturene tilsatt biofilmbærere fra et etablert RAS etablerte nitrifiseringsprosessen tidligere enn i kulturene tilsatt kommersielt innokulum, og nådde i tillegg høyere konsentrasjoner av både nitritt og nitrat (Figur 7). I kulturene tilsatt biofilmbærere ble nitritt og nitratproduksjon påvist samtidig, etter 4 dager (Figur 7c, e). I kulturer tilsatt kommersielt innokulum ble nitritt og nitratproduksjon først observert etter henholdsvis 15 og 18 dager.



Figur 7: Kvantifisering av ammonium, nitritt og nitrat gjennom det andre vekstforsøket. Nedgangen i ammonium konsentrasjon var kraftigere i kulturer tilsatt biofilmbærere fra etablert RAS (a), sammenlignet med kommersielt inokulum (b). I tillegg oppstod produksjon av nitritt og nitrat tidligere i kulturer tilsatt biofilmbærere (c, e) enn i kulturer tilsatt kommersielt inokulum (d, f). Legg merke til den store forskjellen i skalaen på aksene for nitritt og nitrat fra de ulike kulturene.

Analysene av de mikrobielle populasjonene i kulturene viste også at nitrifiserende bakterier etablerte seg over tid. Disse bakteriene utviklet seg tilsynelatende ganske sakte, og ved eksperimentets slutt punkt utgjorde de en maksimal andel på 2,3% av den

totale populasjonen kulturene. *Nitrosomonas*, en bakterie assosiert med ammonium oksidasjon, ble funnet i alle kulturene, men utgjorde størst andel av det mikrobielle samfunnet i prøver fra kulturer tilsatt biofilmbærere fra etablert RAS (Figur 8). I disse prøvene ble det også påvist en liten andel med *Nitrosococcus*, en bakterie som også gjør ammonium oksidasjon. Kulturene tilsatt kommersielt inokulum hadde lavere andel med *Nitrosomonas*, men hadde istedenfor innslag av *Thaumarchaeota*, en ammonium oksiderende arke som sannsynligvis stammer fra det kommersielle inokulumet. Bakterier som er knyttet til nitritt oksidasjon ble kun påvist i kulturer tilsatt biofilmbærere fra etablert RAS i form av bakterier beslektet med *Nitrospira* (Figur 8). Det ble detektert små mengder nitrat i kulturene tilsatt kommersielt inokulum (Figur 7f), men mengden nitritt oksiderende bakterier var sannsynligvis så liten at den var under deteksjonsgrensen for vår metode.



Figur 8: Bakteriepopulasjonen i både medium (væske) og biofilm (biofiltermateriale) ble analysert ved hjelp av 16S rRNA sekvensering. Kulturer tilsatt biofilmbærere fra etablert RAS (biofilm carrier, BC) hadde bakterier involvert i både ammonium oksidasjon (*Nitrosomonas* og *Nitrosococcus*) og nitritt oksidasjon (*Nitrospira*) ved slutten av eksperimentet. Kulturer tilsatt kommersielt inokulum (commercial inoculum, IC) inneholdt mikroorganismer for ammonium oksidasjon (*Nitrosomonas* og *Thaumarchaeota*), mens nitritt oksiderende bakterier ikke ble påvist. X-aksen viser hvor stor andel de ulike mikroorganismene utgjør av den totale populasjonen.

Bakterier som *Nitrospira* er ofte tilstede i RAS biofilter, der de spiller en viktig rolle med å omdanne giftig nitritt til ufarlig nitrat. Beskrevne arter av *Nitrospira* kan være vanskelige å dyrke og de er kjent for å vokse sakte, og derfor blir de ansett som flaskehalsen i prosessen med å modne biofilteret. Resultatene fra veksteksperimentet viste at overførte biofilmbærere fra et modnet RAS er det beste inokulumet for å starte opp biofilteret i et nytt RAS ettersom bakterier for både ammonium oksidasjon og nitritt oksidasjon ble påvist innen 40 dager. Både nitritt og nitrat produksjonen oppstod raskere i disse kulturene sammenlignet med kulturer tilsatt kommersielt inokulum, og betydelig høyere konsentrasjoner av metabolittene var oppnådd ved slutten av

eksperimentet. De ammoniumoksidierende arkene som dominerte i det kommersielle inokulumet så ikke ut til å etablere seg i biofilteret, og ble sannsynligvis utkonkurrert av nitrifiserende bakterier med høyere omsetningsrate.

Den eksperimentelle testmodellen fra dette prosjektet kan senere benyttes i andre RAS for å teste effektiviteten av den mikrobielt nitrifiserende prosessen i andre anlegg, og dermed kanskje identifisere nye nitrifiserende mikroorganismer som kan være effektive i marine RAS. Fremtidige studier med veksteksperimenter i større skala er også nødvendig for å finne det mest optimale forholdstallet mellom inokulum og vann ved oppstart av nytt RAS.

Det er verdt å merke seg at våre data er oppnådde under eksperimentelle forhold. Ved overføring av for eksempel biofilter materiale mellom biofilter eller til nytt biofilter må den mikrobielle tilstanden være kartlagt. Dette er også svært viktig for å unngå overføring av uønskede mikroorganismer. Denne kartleggingsmetoden vi har brukt er egnet til å kartlegge bakterier ned til slektsnivå og den kan for eksempel suppleres med andre metoder analyser for spesifikke arter eller patogene arter.

## 6. Hovedfunn

### *Mikrobiell kolonisering av RAS biofilteret (A)*

- En mikrobiell suksesjon ble observert både i vannet og biofilteret i løpet av den første produksjonssyklusen.
- De mikrobielle populasjonene i biofilm i biofilteret er stabile over tid, selv ved varierende vannkvalitet.
- Biofilteret knyttet til kar med lav biomasse hadde høyest andel av nitrifiserende bakterier.
- De saktevoksende bakteriene som omdanner nitritt til nitrat hadde betydelig større andel i biofilmen fra biofilter tilknyttet kar med lav biomasse.

### *Optimal salinitet for mikrobiell oksidasjon av ammonium (B)*

- Det kommersielle inokulumet hadde en optimal salinitet på 20ppt NaCl for bakterievekst, noe som er lavere enn saliniteten som vanligvis brukes ved oppdrett av post-smolt laks.
- Den nitrifiserende populasjonen i kommersielt inokulum vokser saktere og har lavest effektivitet av ammonium oksidasjon, sammenlignet med et modnet RAS biofilter. Dette betyr at det tar lang tid før filteret er operativt med tanke på nitrifiseringsprosessene.
- Overføring av biofilterbærere fra et modnet RAS biofilter gav den tidligste og høyeste produksjonen av nitrat og nitritt i veksteksperimentene, sammenlignet med kommersielt inokulum.
- I kulturer tilsatt biofilterbærere fra et modnet RAS ble det påvist bakterier som kunne utføre hele oksidasjonsprosessen fra ammonium til nitrat, mens kulturer tilsatt kommersielt inokulum inneholdt bakterier og arker som kunne utføre oksidasjon av ammonium til nitritt.
- Gitt at mikroorganismene i biofiltermateriale er nøye kartlagt og analysert for å unngå smitterisiko, vil overføring av biofilmbærere fra biofilteret i et modnet, velfungerende RAS til et nytt RAS være den mest effektive måten å inokulere det nye biofilteret med nitrifiserende bakterier.

## 7. Leveranser

- Arbeidene (Del A og B) vil bli presentert i form av poster på den internasjonale konferansen arrangert av EAFP i Portugal i september 2019.
- Arbeidene vil bli publiserte i internasjonale vitenskapelige tidsskrift.
  - Arbeidet fra *Mikrobiell kolonisering av RAS biofilteret (A)* er i slutfasen, det gjenstår å tolke de siste statistiske korrelasjonsanalysene og skrive ferdig manuskriptet. Tentativ tittel: "A case study of biofilter activation in marine recirculation aquaculture system (RAS) for rearing post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)".
  - Arbeidet fra *Optimal salinitet for mikrobiell oksidasjon av ammonium (B)* er ferdigstilt og sendt ble sendt til Aquaculture i februar 2019. Tentativ tittel: "Evaluation of inoculum for establishment of nitrifying population in the biofilter of recirculating aquaculture systems (RAS)".
- Arbeidene er også planlagt som populærvitenskapelig artikkel til publisering i norske fagblad, f.eks. Norsk Fiskeoppdrett, i løpet av 2019.
- Prosjektet vil bli omtalt på Monitor (NFR) prosjektets hjemmesider: ([www.fishmicrobes.com](http://www.fishmicrobes.com)) og FHF sine hjemmesider (<https://www.forskningsradet.no/prosjektbanken/#/project/NFR/267545>).