

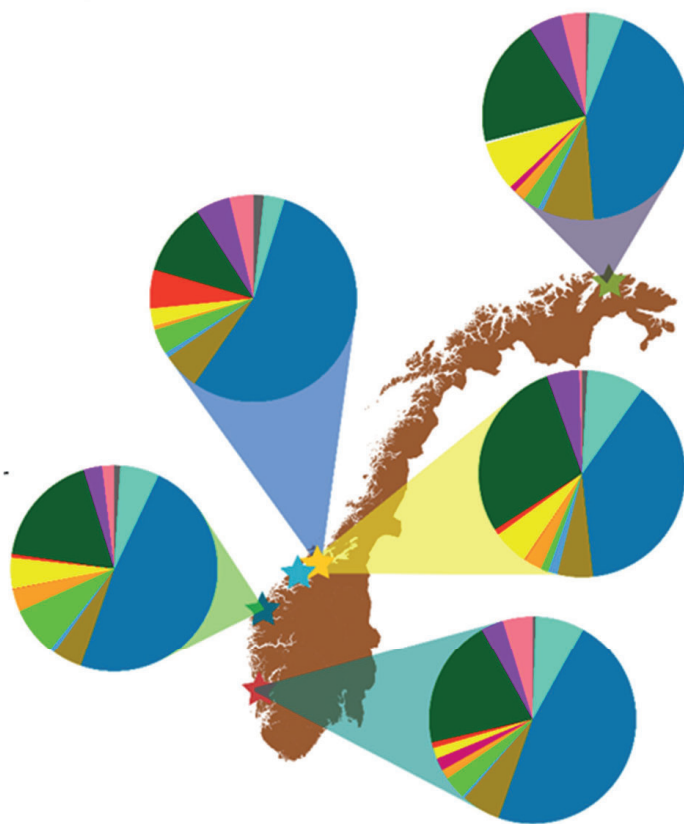
# Stabile og modne biofiltre er viktig for god fiskevelferd i RAS

Alt inn – alt ut, og full vask og desinfeksjon mellom hvert fiskeinnsett, er god latin i settefiskanlegg av gjennomstrømmingstypen. Men er dette en praksis som er ønskelig, og ikke minst gjennomførbar i RAS-anlegg? Her gjennomføres sentrale deler av vannbehandlingen av nitrifiserende bakterier, som mer enn noe ønsker seg et liv i stabile omgivelser. I denne artikkelen diskuterer en rekke RAS-leverandører og forskere hva som er den beste biosikkerhetspraksisen i RAS-anlegg.

## Modne biofilter kan være en god barriere mot patogene mikroorganismer

Et velfungerende RAS er et eget økosystem, der biotiske faktorer, fisk og mikroorganismer, lever i et samspill med hverandre under påvirkning av også kjemiske og fysiske faktorer. Hjertet (eller nyren om man vil) i slike anlegg

er biofilteret/bioreaktoren. Her lever og jobber svært mangfoldige og viktige bakteriesamfunn. Den kanskje viktigste jobben er det de nitrifiserende bakteriene som gjør. De utgjør som regel bare rundt 5-10% (Fig. 1) av bakteriesamfunnet, men gjør en helt nødvendig jobb for at vannet skal kunne gjenbrukes. Jobben er å omdanne giftig ammoniakk, skilt ut av fisken, til nitritt og videre til mindre



### Denne artikkelen er skrevet av:

Stine Wiborg Dahle, Deni Ribicic og Roman Netzer, SINTEF Ocean  
Frode Finne-Fridell, Pure Salmon Technology  
Kari Attramadal, Nofitech  
Astrid Buran Holan, ScaleAQ  
Leopold von Ubisch, VAQ  
Amund Litlabø, Leirvik  
Anthony J. Dinning, Sterner  
Sebastian Strauch, AKVA group

Figur 1. Sammensetning av mikrobiota i biofiltre fra fem RAS-anlegg i Norge (MonMicroprosjektet, FHF: Dahle et al., 2020b; Ribicic et al., in prep). De ulike fargene viser ulike grupper av bakterier, hvor lysgrønn representerer nitrifiserende bakterier.

giftig nitrat. I tillegg finnes det rikelig med heterotrofe bakterier som bryter ned løste organiske stoffer fra uspist fôr og avføring i vannet. Som **figur 1** viser er det ikke RAS-anleggets økosystem «standardisert». Det kan være nokså store variasjoner i bakteriesamfunnet mellom ulike anlegg som alle fungerer godt. Fellesnevneren alle må ha er tilstrekkelig nitrifikasjonskapasitet til å kunne håndtere den planlagte fiske- og utføringmengden.

Det tar lang tid før bakteriesamfunnet i et biofilter er modent nok til å rense vann som sirkuleres tilbake til fiskekarene. Som regel tar det minst seks uker før et nyoppstartet RAS har nitrifikasjonskapasitet slik at det er i stand til å ta imot fisk. Det tar enda lengre tid før biofilteret er robust og stabilt og kan håndtere endringer i salinitet, nitrogeninnhold, temperatur og variasjoner i organisk belastning. For å få et optimalt modnet biofilter må flere innsett av fisk passere systemet. Kanskje fungerer ikke biofilteret helt optimalt før etter et år eller mer med produksjon.

I et biosikkerhetsperspektiv kan det være interessant å minne om det vi kan kalle det store RAS-paradokset: Ethvert RAS-anlegg lar seg utmerket godt modne med anleggets normale, desinfiserte inntaksvann. Selv om man følger alle krav til desinfeksjon, eller legger seg på en høyere UV-dose enn anbefalt, vil det aldri mangle bakterier man kan modne et biofilter med. Da er det grunn til å spørre seg om man kan desinfisere seg bort fra faren for å få inn uønskede mikroorganismer. Den beste strategien for å sikre en barriere mot opportunistiske og patogene bakterier vil kanskje vise seg å ha et modent og velfungerende biofilter. En godt etablert mikrobiota i biofilteret og vannet, med høy diversitet, er et ugunstig miljø for invaderende arter av mikroorganismer. Det er vanskelig for uønskede og patogene agens å etablere seg, øke i antall og dominere samfunnet, fordi de holdes i sjakk av en lokalt tilpasset mikrobiota som allerede har vunnet konkurransen om ressursene under forholdene i akkurat det systemet. I en studie av fem kommersielle RAS for produksjon av smolt (MonMic-prosjektet, FHF), fant man en høy diversitet av bakterier i biofiltrene (**Figur 1**). I tillegg identifiserte man lave konsentrasjoner av

ulike patogene bakterier i anleggene. Disse anleggene hadde alle god produksjon, og dette viser, sammen med tidligere forskning, at modne systemer med høy mikrobiell diversitet holder patogene i sjakk. Det vil alltid være en risiko for at patogene mikroorganismer kan komme inn i systemene med vann, personell, fisk, utstyr eller luft, og dermed er en høy mikrobiell diversitet avgjørende for å sikre god produksjon. I tillegg vet man at en høy mikrobiell diversitet og stabilitet i vannet øker overlevelsen til marine fiskelarver, og danner et godt miljø for fiskens immunsystem og fordøyelse.

Fisken er hele tiden i nær kontakt med mikrobiotaen i vannet rundt seg. En god mikrobiell vannkvalitet er avgjørende for å sikre en god og normal utvikling av fisken, og gi god helse. I en studie av et kommersielt RAS ble det vist at den mikrobielle vannkvaliteten var bedre hos fiskegrupper som hadde vannbehandling i et godt modent biofilter, sammenliknet med nylig desinfiserte biofiltre som bare var modnet i kort tid før en ny fiskegruppe ble satt inn.

### Lovens bokstav

Akvabiosikkerhetsforskriften, som er forankret i verdens dyrehelseorganisasjon (WOAH), trådte i kraft 28.04.2022. Den stiller krav til at alle akvakulturanlegg skal ha en godkjent biosikkerhetsplan. Regelverket legger mer vekt på forebyggende tiltak og biosikkerhet enn tidligere. I forskriften står det blant annet (vedlegg 1, del 1, pkt 1a vii) at utstyr i akvakulturanlegget skal så langt det er mulig rengjøres og desinfiseres etter hver produksjonssyklus.

I henhold til forskriftens definisjoner og ordbruk, omfatter ikke begrepet «utstyr» verken lokaler, produksjonsenheter (kar etc) eller vannbehandlingssdelen i et RAS-anlegg. Altså bioreaktorer, mekaniske filtre, CO<sub>2</sub>-strippere mm. Så kan man stille spørsmål om dette er en bevisst utelatelse i EU-forordningens tekst? Men før man stiller eventuelle nasjonale krav om full rengjøring og desinfeksjon av RAS-anlegg med en definert hyppighet er det mange spørsmål som bør stilles: *Er jevnlig desinfeksjon og brakklegging av biofilteret for å etterleve "alt inn - alt ut" - prinsippet rimelig for RAS-anlegg?* (se bl.a., Kyst.no, 2022).

## BIOFILTER

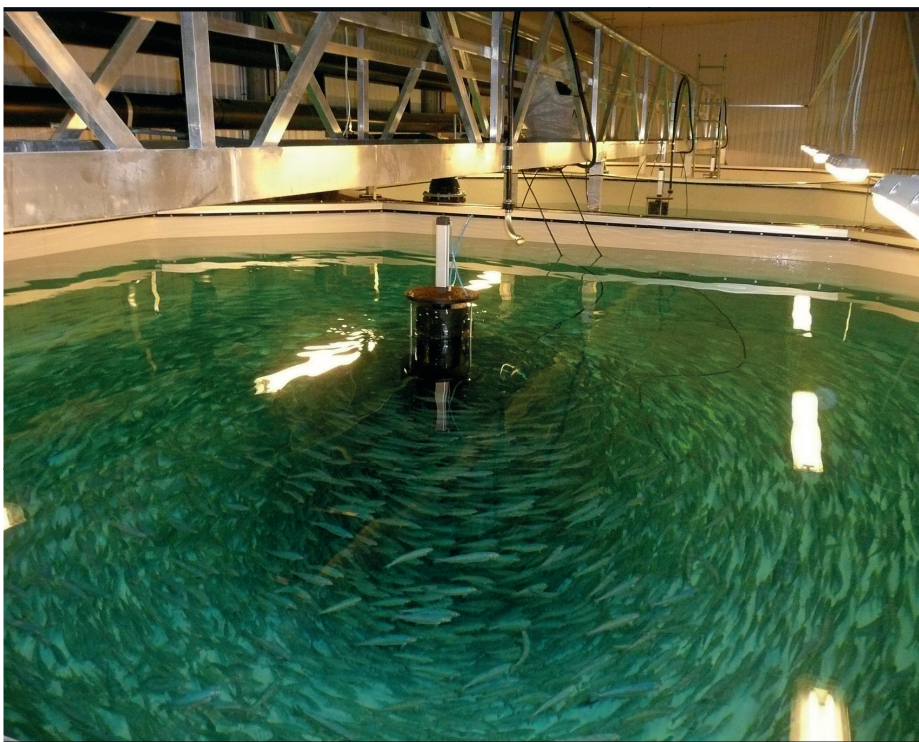
Et biofilter består av biologer med en stor overflate hvor det dannes en biofilm av mange ulike typer bakterier. Disse bakteriene har ulike funksjoner for å forbedre vannkvaliteten i et RAS-anlegg, men den viktigste jobben er å holde konsentrasjonen av giftige nitrogenforbindelser nede, i en prosess kalt nitrifisering. Biofilter finnes i mange varianter og størrelser, hvor de mest brukte i RAS er moving bed bioreaktor (MBBR) og fixed bed biofilter (FBBF).

## NITRIFISERING

Nitrifisering er en biologisk og aerob prosess som skjer i biofilmen i biofilter, der hovedsakelig nitrifiserende bakterier omdanner giftig ammoniakk til mindre giftige nitrogenforbindelser. Typisk skjer dette i to trinn, først sørger ammonium oksiderende bakterier for å omdanne ammonium til nitritt, og deretter vil nitritt oksiderende bakterier omdanne nitritt videre til nitrat.

## VASK

Benyttelse av mekanisk vaskeutstyr i kombinasjon med temperatur, trykk og pH med mål om å fjerne synlig smuss og biofilm fra overflater. Evaluert som "visuelt rent", og er en subjektiv vurdering.



I denne artikkelen diskuteres en rekke RAS-leverandører og forskere hva som er den beste biosikkerhetspraksisen i RAS-anlegg. Foto: ScaleAQ

*Er dette riktig vei å gå? Er det praktisk mulig? Kan det ha negativ effekt på den mikrobielle vannkvaliteten som er helt avgjørende for et velfungerende RAS og for god fiskehelse?*

Vi tar til orde for at RAS-anlegg må driftes på mikroorganismenes betingelser. Vår felles lange erfaring viser at RAS-anlegg ikke kan driftes som gjennomstrømningsanlegg.

## SYSTEMDESINFEKSJON

Overflatedesinfeksjon. Overflater blir behandlet med kjemi som er godkjent av Statens legemiddelverk og Miljødirektoratet for desinfeksjon ihht Forskrift om godkjenning og bruk av desinfeksjonsmidler i akvakulturanlegg og transportenheter. Målet er å bryte smitteveiene ved å behandle virus og bakterier slik at organismen ikke kan infisere fisk. Etter desinfisering kan man kvalitetssikre med ATP måling.

Desinfeksjon av inntaksvann til akvakultur reguleres gjennom "Forskrift om desinfeksjon av inntaksvann til og avløpsvann fra akvakulturrelatert virksomhet" der §10 beskriver desinfeksjon som en reduksjon i inaktivering av *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*: "For inntaksvann til akvakulturanlegg som driver klekking og produksjon av laksefisk og annen ferskvannsfisk gjelder at metoden gjennom anerkjent vitenskapelig dokumentasjon under relevante forsøksbetingelser (vannkvalitet, temperatur m.v.), skal vise minimum 3 log<sub>10</sub> (99.9%) inaktivering av *Aeromonas salmonicida*, subsp. *salmonicida*, og det er vist, eller på grunnlag av dose-responskurver for IPN-virus anses sannsynlig, at infeksjons lakseanemi virus (ILA-virus) også inaktiveres tilsvarende."

Denne forskriften er videre utledet i en veileder "Desinfeksjon av vann i akvakultur" fra Veterinærinstituttet. Den mest benyttede behandling for inntaksvannet er UV, og veilederen definerer dose for inntaksrensing til å være minimum 25 mWs/cm<sup>3</sup>.

Har man først valgt å overlata vannbehandlingen til bakterier, som i en stor bioreaktor dekker en overflate tilsvarende 40 fotballbaner, har man «skrevet en kontrakt» om å jobbe med og ikke mot disse bakteriene. Full nullstilling, med grundig rengjøring og desinfeksjon vil sannsynligvis alle RAS-anlegg måtte gjennomføres med års mellomrom. Dette vil vi diskutere i et avsnitt lengre ned, men først vil vi se hvordan vi mener anlegget bør driftes, vedlikeholdes og rengjøres i og mellom normale produksjonssyklusser.

## Desinfeksjon ikke alltid den beste løsningen

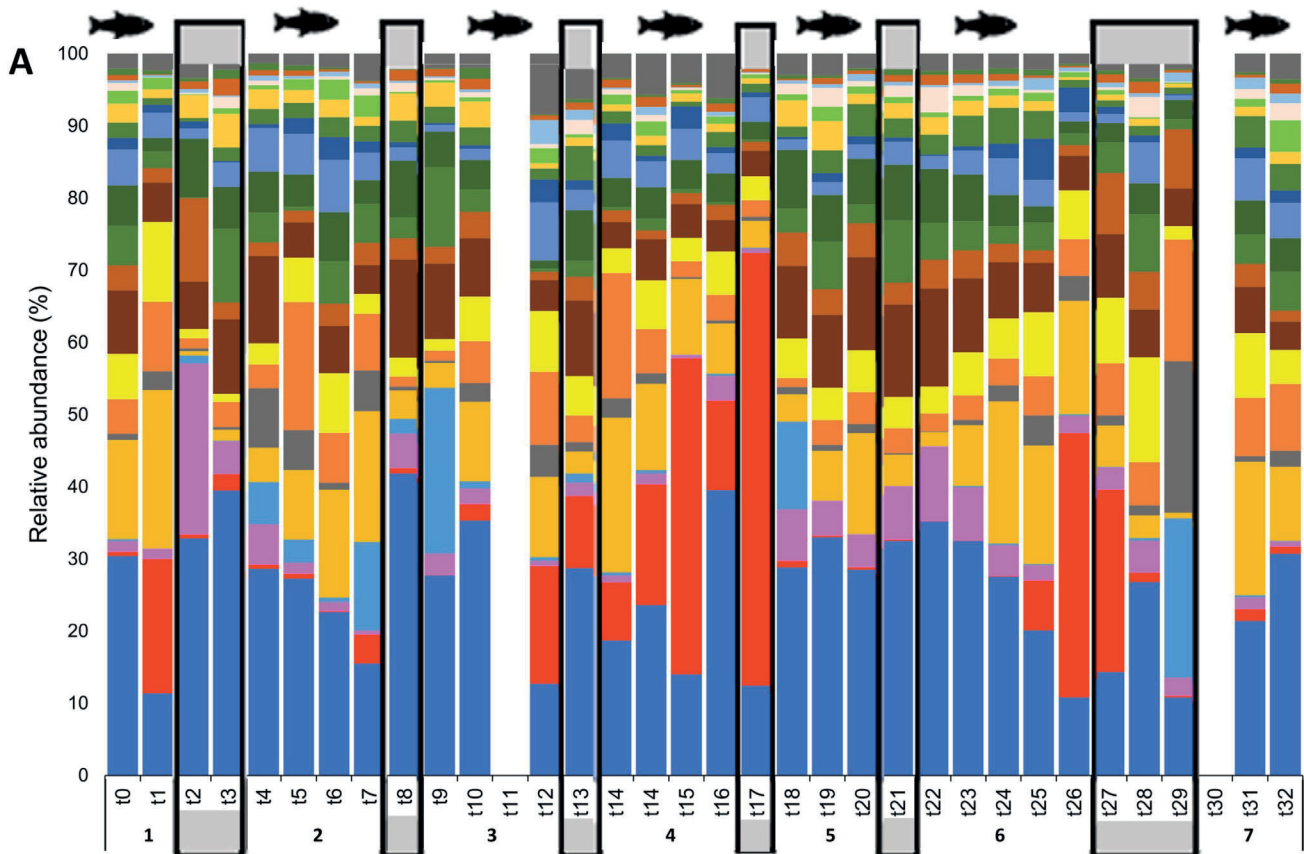
I denne artikkelen bruker vi begrepet desinfeksjon om inaktivering av biofiltermikrobiota mellom fiskegrupper.

Vi diskuterer ikke desinfeksjon av inntaksvann eller vann i RAS-sløyfa. Ved normal drift og uten mistanke om verken listeførte sykdommer eller sykdomsorganismer som ikke påvirker fiskens helse eller velferd, er ikke jevnlig desinfeksjon nødvendigvis den beste løsningen verken for systemet eller fisken. For det første får man i mange tilfeller ikke fjernet 100% av mikroorganismene, selv med de mest intense desinfeksjonsstrategier.

For det andre, kan man legge til rette for oppvekst av mikroorganismer med negative effekter på fisken. Nylige desinfiserte system gir rom for enklere invasjon og vekst som gjør at nykommere raskt kan ta over og ende opp med å dominere mikrobefolkningen i systemet. En rekke forskningsprosjekter ved SINTEF og NTNU har vist at desinfeksjon av vannet i RAS-sløyfa selekterer for opportunistiske bakterier.

Desinfeksjon av vannet i RAS-sløyfa har i vitenskapelige forsøk ført til høyere dødelighet for marine fiskelarver som torsk og dårligere gjellehelse for rognkjeks. For det tredje fjerner desinfeksjon også bakterier som er helt avgjørende for god helse og normal utvikling av fisken.

For det fjerde vil et nyoppstartet/umodent system/bioreaktor være mindre robust overfor svingninger i for eksempel pH, føring og temperatur, og dermed generere mer ustabilitet for fisken.



Figur 2. Sammensetning av mikrobiota i biofilteret for syv ulike fiskegrupper (fiskesymbol), i et kommersielt RAS-anlegg for smolt. Figuren viser at ved brakklegging (grå felt) endrer mikrobiotaen seg betraktelig. Brakkleggingsperiodene for dette anlegget varierte fra 8 og opp til 40 dager (For detaljer, se Dahle et al., 2023).

## Brakklegging

Enhver god produksjonsplan må etter vår mening inneholde fisketomme perioder mellom hvert innsett i en avdeling.

Både for å kunne svelge produksjonskameler som kan oppstå underveis, for eksempel forsinket utsett på sjø, men fremfor alt for å få tid til vanlig rengjøring av kar, vedlikehold og ettersyn og ikke minst mulighet til å bryte livssyklus til uønskete mikroorganismersom er avhengige av en vert. Her mener vi myndighetene må på banen med klare retningslinjerforbrakkleggingsperiodenes varighet, basert på oppdatert kunnskap om de viktigste patogenenes levetid i vann og biofilm. Varigheten av brakkleggingen er viktig fordi den også er utgangspunktet for våre anbefaling og kjemisk «vedlikeholdsføring» i en avdeling uten fisk.

Vel så viktig som brakkleggingens varighet er å være 100 % sikker på at avdelingen

faktisk er tom for fisk. Noen oppdrettere har innført begrepet rørfisk, for all fisk som befinner seg utenfor fiskekar.

I denne sammenheng er det naturlig nok rørfisk i anleggenes vannbehandlingsdel som er viktigst. Det kan være fisk i innløpskanaler til mekaniske filtre, i bioreaktorer og pumpesumper. Står det fisk her er avdelingen rett og slett ikke brakklagt selv om fiskekarene er tomme og tørre.

Det er et felles ansvar at forekomsten av rørfisk må forebygges gjennom riktig design, dimensjonering og arbeidsoperasjoner. Samtidig må det utvikles gode prosedyrer for å fjerne rørfisk om uheldet skulle være ute. Det jobbes i dag med fjerning av rørfisk ved distribusjon av letale doser bedøvelse eller annet.

## Stabil drift

Det viktigste stikkordet for riktig drift av et RAS-anlegg er stabilitet. Det gjelder for

## STERILISERING

Begrepet Sterilisering benyttes normalt ikke innenfor anvendt akvakultur, og skiller seg fra desinfisering ved at ingen mikroorganismer, inkludert bakteriesporer, overlever. Sterilisering forutsetter at utstyr er pakket før sterilisering- enten som vandampsterilisering eller tørrsterilisering, og det benyttes for eksempel autoklav. Steriliseringsbegrepet er normalt brukt innenfor kirurgi på sykehus.





Et nylig desinfisert system er sårbart for invasjon og oppvekst av uønskede opportunistiske mikroorganismer. Desinfeksjon av RAS tar også verdifull tid fra produksjon og koster mye. Bildet viser remontering av siler i bioreaktorer etter at betongen er behandlet. Foto: Pure Salmon Technology

## Oppsummering

- Et velfungerende biofilter er helt avgjørende for fisken i RAS, ved å sørge for lave nivåer av ammoniakk og nitritt
- Et RAS med godt modnet biofilter og vann gir fisken et mikrobielt miljø som er positivt for daglige helse, god vekst og normal utvikling
- Et godt modnet RAS er en god beskyttelse mot invasjon og oppvekst av sykdomsfremkallende mikroorganismer på grunn av den harde konkurransen om ressurser fra allerede lokalt tilpassede mikrober
- Et godt modnet biofilter tåler bedre variasjoner og endringer i miljøet, som for eksempel en plutselig økning i organisk materiale eller en dropp i temperatur
- Et nylig desinfisert system er sårbart for invasjon og oppvekst av uønskede opportunistiske mikroorganismer
- Full desinfeksjon (sterilisering) av modne RAS er svært vanskelig, selv med gode prosedyrer og topp motivasjon
- Desinfeksjon av RAS tar verdifull tid fra produksjon og koster mye

fisk og det gjelder for bakterier. Samtidig er det vanskelig å oppnå stabilitet i et RAS-anlegg fordi biomassen øker jevnt gjennom produksjonen, og fordi både temperatur- og salinitetsendringer, samt endringer i utføringsregime, kan være nødvendig i forbindelse med bl.a. smoltifisering. Ved normal drift og uten mistanke om listeførte sykdommer eller andre agens som fører til redusert fiskehelse eller velferd, er løsningen for god biosikkerhet også å lage et miljø der uønska bakterier ikke trives, der de blir hindret i å formere seg og skape problemer. For å skape et miljø der det er vanskelig for inntrengere å etablere seg må man sørge for hard konkurranse mellom mange ulike bakteriearter om mat og plass. Rikelig med oksygen må være til stede, for at de nitrifiserende bakteriene skal gjøre jobben sin.

Balansert føring og god partikkelfjerning bidrar til å holde konkurransen om bakteriematen sterk og hindrer at uønska bakterier får fotfeste. Organisk materiale som er tilgjengelig i systemet påvirker utviklingen av bakteriesammensetningen i svært stor grad. Uønskede opportunistiske bakterier er gode på å vokse

raskt når det er lav konkurranse og overskudd i ressurstilgang. Spesielt ved brakklegging mellom fiskegrupper, endrer bakteriesammensetningen seg betraktelig både i biofilter (se **Figur 2**) og i vannet. Vannutskiftingshastighet i kar og i anlegget som helhet er en annen parameter som i stor grad er med på å styre hvordan bakteriesammensetningen utvikler seg.

## Når er desinfeksjon nødvendig?

Desinfeksjon er åpenbart nødvendig når myndighetene krever det etter påvisning av listeførte sykdommer, eller ved påvisning av sykdommer eller agens som man ikke klarer å bekjempe gjennom brakklegging mellom innsett eller vår anbefalte strategi om å spille de kjemotrofe bakteriene gode gjennom mest mulig stabil drift. Vi tar også høyde for at regelmessig full nullstilling gjennom nedvask og desinfeksjon kan være ønsket strategi hos noen produsenter.

Til slutt må vi ta innover oss betydningen av at RAS-anlegget er et økosystem. Og i likhet med andre økosystemer gjennomgår også RAS-anlegget en suksesjon. Vi tror at alle RAS-leverandører og RAS-eiere må akseptere at en nullstilling kan være nødvendig. Om det skjer etter 3, 5 eller 7 års drift er med dagens kunnskap umulig å si, og det kan også være hensiktsmessig å gjennomføre dette i forbindelse med ombygging, utvidelse eller endringer i selskapenes generelle produksjonsplanlegging som gjør det naturlig med et produksjonsopphold.

Da er det vår oppgave å levere anlegg som gjør at dette kan gjennomføres på en mer ressursvennlig måte. Med tanke på bruk av tid, personell, kjemi og miljøbelastning.

## Vi trenger mer kunnskap!

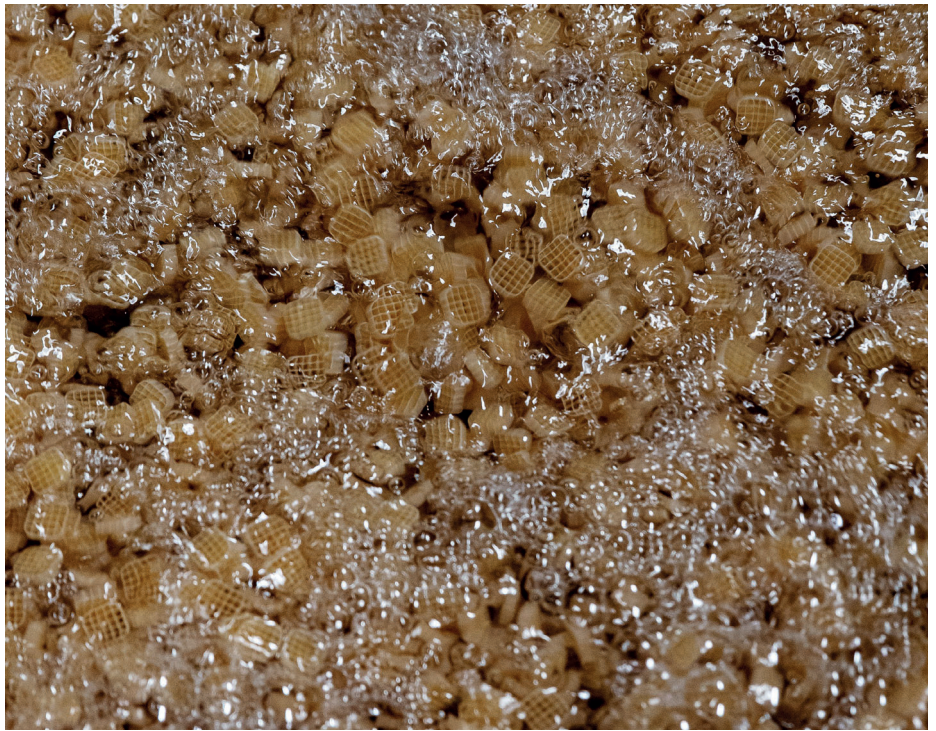
Forskere og akvakulturnæringen bør samarbeide tett for å øke den anvendbare kunnskapen rundt best mulig biosikkerhet i RAS, med hovedfokus på vannbehandlingsdelen. RAS produsentene oppfordrer, at de to biosikkerhet i RAS prosjektene som startet opp i 2023 (BRAS, FHF prosjekt nr 91792 og PathoRAS, FHF prosjekt nr 901826), har tett næringsforankring og at det overordnede målet er bedre fiskevelferd.



Videre er det viktig for god biosikkerhet med systematisk arbeid for å forstå bakteriedynamikken og faktorene som påvirker utviklingen av hele bakteriesamfunnet i biofilteret og produksjonsvannet. I tillegg til de to nevnte prosjektene som er i igangsatt, trenger vi mer kunnskap. Vi trenger kunnskap om hvordan legge til rette for stabile og effektive bakteriesamfunn i biofilter og risikobaserte desinfeksjonsstrategier i RAS. Dagens kunnskap støtter ikke rutinemessig desinfeksjon av biofilteret - det er hverken ønskelig eller gunstig for fisken, systemet eller oppdretterne •

## Referanser

- Attramadal, K.J.K., Bakke, I., Vadstein, O. (2018). *Mikrobiell kontroll i lukkede og landbaserte anlegg*. Norsk Fiskeoppdrett, 3, 44-49.
- Attramadal, K.J.K., Salvesen, I., Xue, R., Øie, G., Størseth, T.R., Vadstein, O., Olsen, Y. (2012). *Recirculation as a possible microbial control strategy in the production of marine larvae*. Aquaculture Engineering, 46, 27-39.
- Dahle, S.W., Bakke, I., Nordøy, K., Birkeland, M., Dalum, A., Attramadal, K.J.K. (2020a). *Production of lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) in RAS with distinct water treatments: Effects on fish survival, growth, gill health and microbial communities in rearing water and biofilm*. Aquaculture, 522, 735097.
- Dahle, S.W., Netzer, R., Lewin, A., Hageskal, G., Haugen, T., Ribicic, D. (2020b). *Overvåking av bakteriesamfunn i settefiskproduksjon. En studie av fem RAS-anlegg*. SINTEF rapport, 00470.
- Dahle, S.W., Gaarden, S.I., Buhaug, J.F., Netzer, R., Attramadal, K.J.K Busche, T., Aas, M., Ribičić, D., Bakke, I. (2023). *Microbial community structures and dynamics in a commercial RAS during seven production batches of Atlantic salmon fry (*Salmo salar*)*. Aquaculture, 565, 739155.
- Dahle, S.W., Attramadal, K.J.K., Vadstein, O., Hestdahl, H.I., Bakke, I. (2022). *Microbial community dynamics in a commercial RAS for production of Atlantic salmon fry (*Salmo salar*)*. Aquaculture, 546, 737382.
- Kyst.no (2022). *Mattilsynet om vask og desinfeksjon av biofilteret: Ikke et krav, men kommer man utenom?*



Et velfungerende biofilter er helt avgjørende for fisken i RAS, ved å sørge for lave nivåer av ammoniakk og nitritt. Et godt modnet RAS er en god beskyttelse mot invasjon og oppvekst av sykdomsfremkallende mikroorganismer på grunn av den harde konkurransen om ressurser fra allerede lokalt tilpassede mikrober. Foto: Nofitech



Desinfeksjon av modne RAS er svært vanskelig, selv med gode prosedyrer og topp motivasjon. Må man gjøre det skal overflater behandles med kjemi som er godkjent av Statens legemiddelverk og Miljødirektoratet for desinfeksjon. Foto: Pure Salmon Technology