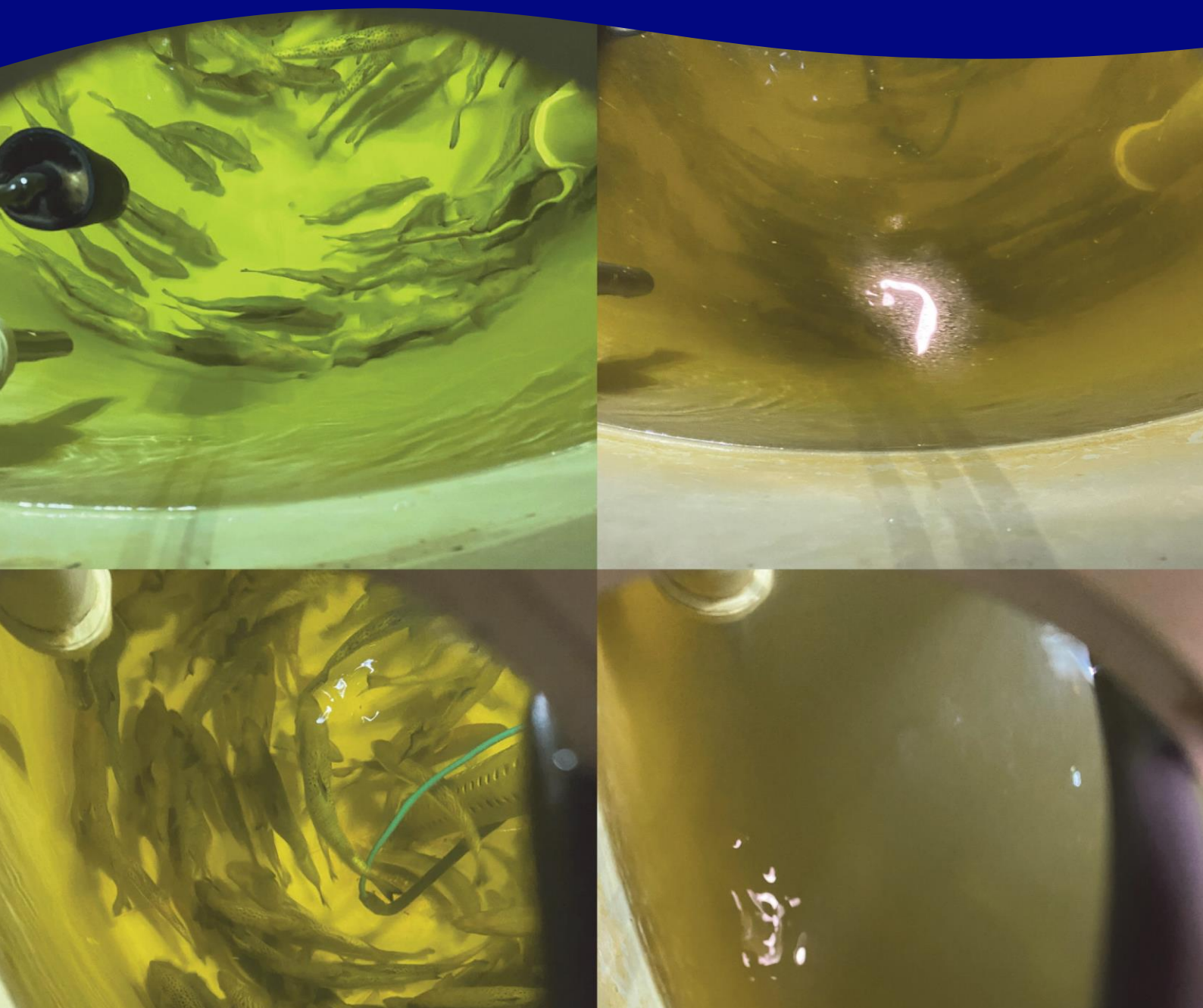


8074-2025

Mikrobiota assosiert med atlantisk laks i overgangen fra ferskvann til sjøvann i RAS: effekt av høy/lav partikkelbelastning og konsekvenser for fiskevelferd og -helse

MikroRAS – FHF 901735



Rapport

Løpenummer: 8074-2025

ISBN 978-82-577-7811-8
NIVA-rapport
ISSN 1894-7948

Denne rapporten er
kvalitetssikret iht. NIVAs
kvalitetssystem og
godkjent av:

Ole-Kristian Hess-Erga
Prosjektleder/
Hovedforfatter

Åse Åtland
Kvalitetssikrer

Trine Dale
Forskningsleder

© Norsk institutt for
vannforskning.
Publikasjonen kan siteres
fritt med kildeangivelse.

Forsidebilde
Ole-Kristian Hess-Erga

www.niva.no

Norsk institutt for vannforskning

Tittel norsk/engelsk

Mikrobiota assosiert med atlantisk laks i
overgangen fra ferskvann til sjøvann i RAS:
effekt av høy/lav partikkelbelastning og
konsekvenser for fiskevelferd og -helse
(MikroRAS - 901735)

Sider

44 + vedlegg

Dato

12.03.2025

Forfatter(e)

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

Fagområde

Akvakultur

Distribusjon

Åpen

Oppdragsgiver(e)

Fiskeri- og havbruksnæringens
forskningsfinansiering AS (FHF)

Kontaktperson hos oppdragsgiver

Sven Martin Jørgensen og Morten
Lund

Utgitt av NIVA

Prosjektnummer 210258

Oppdragsgivers utgivelse:

Prosjektnummer 901735

Sammendrag

Resultatene fra MikroRAS viste flere utfordringer ved forhøyet partikkelbelastning, men også en rekke praktiske fordeler ved lav partikkelbelastning. Forhøyet partikkelnivå, som er vanlig å finne i kommersielle RAS, påvirket fiskens prestasjon i RAS negativt, sannsynligvis gjennom metabolske effekter. Etter overføring til sjøvann med gode forhold, ble det observert kompensatorisk vekst hos fisk utsatt for høy TSS i RAS og det tok 3 måneder før forskjellene var utjevnet. Resultatene viser også at forhøyet TSS kan forsinke smoltifiseringen, og dermed er det særlig viktig å unngå økt belastning og svingninger i TSS i denne fase. Den forhøyede partikkelbelastningen førte også til betydelig redusert sikt i vannet, redusert nitrifikasjon og økt forekomst av heterotrofe bakterier som både kan utkonkurrere de nitrifiserende bakteriene og ha negative effekter på fiskens helse. Lav partikkelbelastning kan dermed medføre en rekke praktiske fordeler, som lettere observasjon av fisken, mindre behov for rengjøring og generelt bedre tid til å sikre god biologisk produksjon.

Emneord: Akvakultur, RAS, partikler, mikrobiota

Keywords: Aquaculture, RAS, particles, microbiota

Innholdsfortegnelse

Forord	4
Sammendrag	5
Summary	7
1 Innledning	9
2 Problemstilling og formål	11
3 Prosjektgjennomføring	12
4 Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon	17
Hovedfunn	39
5 Referanser	41
6 Leveranser	45
7 Appendiks	47

Forord

Prosjekt MikroRAS har pågått fra 01. oktober 2021 til 12. mars 2025 og vært finansiert av Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering AS (FHF). Prosjektet har vært et samarbeid mellom FoU-partnerne NIVA, NTNU, UiB og Marineholmen RASLab. FHF har vært representert ved Sven Martin Jørgensen og Morten Lund. Referansegruppen har bestått av Julia Fossberg Buhaug (Siri Ag), Kari Johanne Kile Attramadal og Marit Holmvåg Mehus.

Tusen takk for alle bidragene, diskusjonene og et utmerket samarbeid!

Vennlig hilsen

Ole-Kristian Hess-Erga, prosjektleder

Bergen, 12. mars 2025

Sammendrag

I RAS resirkuleres vann, og vannrensing er nødvendig for å fjerne avfallsprodukter som organisk materiale fra fôr og feces, ammonium og CO₂. Toksisk ammonium omdannes til nitrat ved hjelp av nitrifiserende bakterier i biofiltre. Disse saktevoksende, autotrofe bakteriene er del av komplekse biofilmsamfunn, som påvirkes av driften i anlegget. For eksempel kan økt organisk belastning medføre utfordringer knyttet til oppvekst av heterotrofe bakterier i biofilmen. I tillegg finnes det mikrobefund (mikrobiomer eller mikrobiota) suspendert i vannet, i biofilm på kar- og rørvegger, samt i fiskens slimhinner. Disse mikrobiomene formes av de fysiske og kjemiske omgivelsene. Samtidig påvirker de den kjemiske vannkvaliteten gjennom mikrobielle omdannelser og de kan dermed påvirke fiskens helse. Å fremskaffe økt kunnskap om sammenhengen mellom vannkvalitet, laksens mikrobiom og dens velferd/helse i smolt/postsmolt-RAS og påfølgende påvekst, har vært MikroRAS-prosjektets overordnede mål. Slik kunnskap vil kunne føre til optimaliserte driftsbetingelser og dermed vesentlige kostnadsbesparelser i form av bedre produksjon, lavere dødelighet, og mindre sykdom for enkeltoppdrettere og for næringen som helhet.

For å oppnå målene for prosjektet ble det gjennomført et langtidsforsøk i 6 RAS-enheter på Marineholmen RASLab, hvorav 3 enheter ble driftet med lav partikkelbelastning (1-2 mg/l TSS – LTSS) og 3 enheter med høy partikkelbelastning (7 mg/l TSS – HTSS), og deretter en simulert overføring til sjø. Langtidsforsøket gjorde det mulig å studere effekten av smoltifisering og økende salinitet på laksens feces-, skinn- og gjellemikrobiomer ved høy og lav partikkelbelastning (AP 1), hvordan partikkelbelastning i RAS før, under og etter smoltifisering påvirker laksens mikrobiomer, mukosale helse, velferd og prestasjon også etter den første tiden i sjøen (AP 2) og effekten av partikkelbelastning og endret salinitet; før, under og etter smoltifisering på fysiokjemisk- og mikrobiologisk vannkvalitet, nitrifikasjon og biofilm- og partikkel-assosiert mikrobiota (AP 3).

Resultatene fra MikroRAS viste flere utfordringer ved forhøyet partikkelbelastning, men også en rekke praktiske fordeler ved lav partikkelbelastning.

Forhøyet partikkelnivå, som er vanlig å finne i kommersielle RAS, påvirket fiskens prestasjon i RAS negativt, sannsynligvis gjennom metabolske effekter. Etter overføring til sjøvann med gode forhold, ble det observert kompensatorisk vekst hos fisk utsatt for høy TSS i RAS og det tok 3 måneder før forskjellene var utjevnet. Resultatene viste også at forhøyet TSS kan forsinke smoltifiseringen, og dermed er det særlig viktig å unngå økt belastning og svingninger i TSS i denne fase. I tillegg vil det økte energiforbruket til kompensatoriske mekanismer gjøre fisken mer sårbar for ytterligere stress. Den forhøyede partikkelbelastningen førte også til betydelig redusert sikt i vannet, redusert nitrifikasjon og økt forekomst av heterotrofe bakterier som både kan utkonkurrere de nitrifiserende bakteriene og ha negative effekter på fiskens helse. Lav partikkelbelastning kan dermed medføre en rekke praktiske fordeler, som lettere observasjon av fisken, mindre behov for rengjøring og generelt bedre tid til å sikre god biologisk produksjon. I tillegg vil lav partikkelbelastning føre til bedre effekt av vannbehandling (utlufting av CO₂, desinfeksjon, nitrifikasjon m.m.) og redusert risiko for bakteriell produksjon av uønskede metabolitter (f.eks. H₂S og geosmin).

Fiskeprøvene resulterte dessverre i sekvenseringsdata av dårlig kvalitet, både når det gjelder amplikonsekvensering av markørgenet 16S rRNA (for karakterisering av sammensetning av samfunn) og metagenomsekvensering (for kartlegging av de funksjonelle genene). Dette skyldes antakelig en stor andel fiskevev i prøvene. Mulige løsninger kan ligge i utvikling av nye metoder for prøvetaking eller strategier for selektiv fjerning av verts-DNA før DNA-sekvensering.

Kunnskapen fra MikroRAS kan motivere næringen til å innføre tiltak for å redusere tilførselen av organisk materiale til vannet og forbedre partikkelfjerningen. Tiltakene kan være optimalisering av egen drift og bidrag til metodiske nyvinninger, samt utvikling av utstyr som sikrer bedre partikkelfjerning.

Summary

In RAS, water is recycled, and water purification is necessary to remove waste products such as organic material from feed and feces, ammonium and CO₂. Toxic ammonium is converted to nitrate by nitrifying bacteria in biofilters. These slow-growing, autotrophic bacteria are part of complex biofilm communities, which are affected by the operation of the facility. For example, increased organic load can cause challenges related to the growth of heterotrophic bacteria in the biofilm. In addition, there are microbial communities (microbiomes or microbiota) suspended in the water, in biofilms on tank and pipe walls, and in the mucous membranes of the fish. These microbiomes are shaped by the physical and chemical environment. At the same time, they affect the chemical water quality through microbial transformation and can thus affect the health of the fish. To provide increased knowledge about the relationship between water quality, the salmon microbiome and its welfare/health in smolt/post-smolt RAS and subsequent growth, has been the overall goal of the MikroRAS project. Such knowledge could lead to optimized operating conditions and thus significant cost savings in the form of better production, lower mortality, and less fish disease for individual farmers and for the industry.

To achieve the goals of the project, a long-term trial was conducted in 6 RAS units at Marineholmen RASLab, of which 3 units were operated with low particle loading (1-2 mg/l TSS – LTSS) and 3 units with high particle loading (7 mg/l TSS – HTSS), and then a simulated transfer to sea. The long-term trial made it possible to study the effect of smoltification and increasing salinity on the salmon's faecal, skin and gill microbiomes at high and low particle loading (AP 1), how particle loading in RAS before, during and after smoltification affects the salmon's microbiomes, mucosal health, welfare and performance also after the initial time in the sea (AP 2) and the effect of particle loading and changing salinity; before, during and after smoltification on physiochemical and microbiological water quality, nitrification and biofilm and particle-associated microbiota (AP 3).

The results from MikroRAS showed several challenges with elevated particle loading, but also a number of practical advantages with low particle loading.

Elevated particle levels, which are commonly found in commercial RAS, negatively affected the performance of fish in RAS, probably through metabolic effects. After transfer to seawater with good conditions, compensatory growth was observed in fish exposed to high TSS in RAS and it took 3 months for the differences to be equalized. The results also showed that elevated TSS can delay smoltification, and thus it is particularly important to avoid increased load and fluctuations in TSS in this phase. In addition, the increased energy consumption for compensatory mechanisms will make the fish more vulnerable to further stress. The elevated particle load also led to significantly reduced visibility in the water, reduced nitrification and an increased occurrence of heterotrophic bacteria that can both outcompete the nitrifying bacteria and have negative effects on the health of the fish. Low particle load can thus lead to several practical advantages, such as easier observation of the fish, less need for cleaning and generally better time to ensure good biological production. In addition, low particle load will lead to a better effect of water treatment (e.g. degassing of CO₂, disinfection, nitrification) and a reduced risk of bacterial production of unwanted metabolites (e.g. H₂S and geosmin).

Unfortunately, the fish samples resulted in poor quality sequencing data, both in terms of amplicon sequencing of the marker gene 16S rRNA (for characterizing community composition) and metagenome sequencing (for mapping the functional genes). This is probably due to a large proportion of fish tissue in the samples. Possible solutions may lie in the development of new sampling methods or strategies for selective removal of host DNA prior to DNA sequencing.

The knowledge from MikroRAS may motivate the industry to introduce measures to reduce the input of organic matter to the water and improve particle removal. The measures may include optimization of own operations and contributions to methodological innovations, as well as development of equipment that ensures better particle removal.

1 Innledning

I takt med utviklingen, har laksenæringen i stor grad erstattet tradisjonelle gjennomstrømningsanlegg med resirkulerende akvakultursystemer (RAS), og det planlegges en rekke landbaserte matfiskanlegg med RAS. Næringens ønske om større og mer robust smolt, samt muligheten for utsett til ulike tider på året og kortere tid i sjø, har vært drivkraften for denne utviklingen og åpnet opp for produksjon av storsmolt. I RAS resirkuleres vann, og vannrensing er nødvendig for å fjerne avfallsprodukter som organisk materiale fra fôr og feces, ammonium og CO₂. Toksisk ammonium omdannes til nitrat ved hjelp av nitrifiserende bakterier i biofiltre. Disse saktevoksende, autotrofe bakteriene er del av komplekse biofilmsamfunn, som påvirkes av driften. For eksempel kan økt organisk belastning medføre utfordringer knyttet til oppvekst av heterotrofe bakterier i biofilmen (Guerdat m.fl. 2011). I tillegg finnes det mikrobefunn (mikrobiomer eller mikrobiota) suspendert i vannet, i biofilm på kar- og rørvegger, samt i fiskens slimhinner. Disse mikrobiomene formes av de fysiske og kjemiske omgivelsene. Samtidig påvirker de den kjemiske vannkvaliteten gjennom mikrobielle omdannelser og de kan påvirke fiskens helse (Blancheton m.fl. 2013). Et RAS-anlegg kan derfor sees som et svært komplekst mikrobielt økosystem (Vadstein m.fl. 2018), men hvordan disse mikrobiomene interagerer med hverandre er dårlig forstått.

Fiskens slimhinneepitel i gjellene, huden og tarmen er den første forsvarslinjen mot patogene mikrober og fremmedlegemer i det ytre miljøet. Samtidig er det et paradoks at disse slimhinnene er kolonisert av såkalte «kommensale» bakteriesamfunn, mikrobiomer. Disse fiskemikrobiomene er svært forskjellige fra mikrobefunnene i vannet som omgir fisken (Zhang m.fl. 2019). Mens tarmmikrobiomer er svært viktig for vertens helse, og bidrar til velfungerende fordøyelses- og immunsystem, økt energiutbytte fra diett, og beskyttelse mot patogene mikroorganismer (Fan og Pedersen 2021), er den eventuelle funksjonen av skinn- og gjellemikrobiomer for vertens helse ikke kjent. Til tross for de forskjellige fysiologiske funksjonene til slimhinnevevet i disse organene, har de en felles struktur. Det er en økende mengde forskning på slimhinnefysiologi og immunologi, og det er vist at slimhinneoverflater er veldig følsomme for endringer i miljøet (Cabillon og Lazado 2019) og spiller en viktig rolle i fiskens generelle helsestatus. Akkumulerende partikler, spesielt fine partikler, anses å være skadelige for fiskevelferd, helse og ytelse (Bilotta og Brazier 2008 m.fl.). En økning av partikulært organisk materiale (POM) kan videre redusere synligheten av maten (Barrett m.fl. 1992; De Robertis m.fl. 2003), skade gjellevev (Au m.fl. 2004), indusere stressresponser (Redding m.fl. 1987) og påvirke osmoregulering (Au m.fl. 2004). For atlantisk laks mangler det inngående studier av effekten av partikler på mikrobiomer, smoltifisering, helse og velferd. Kunnskap om samspillet mellom partikler, fisk- og vann-mikrobiomer og hvordan disse påvirker slimhinnenens helse er ikke-eksisterende.

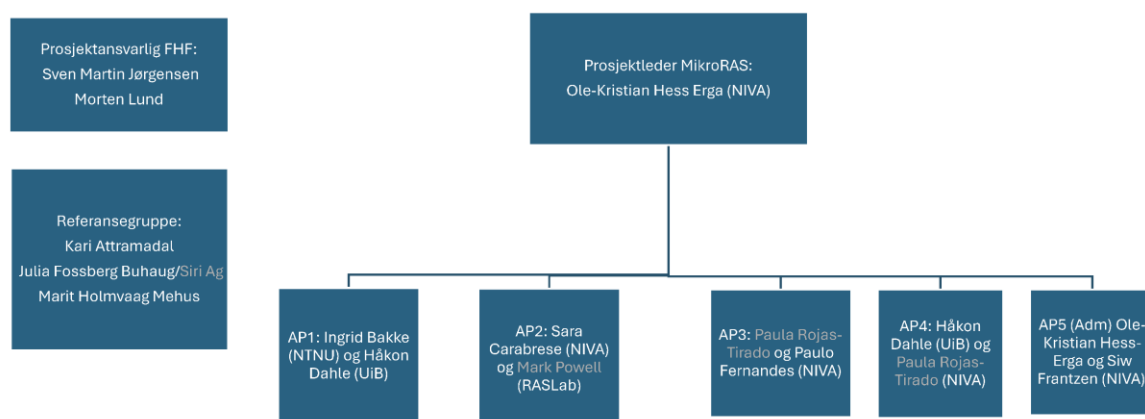
I RAS fjernes partikler med mekaniske filtre, men små partikler akkumulerer (Brinker og Rösch, 2005). Opptil 95 % av de suspenderte partiklene i RAS er mindre enn 20 µm og fjernes i liten grad av de mekaniske filtrene (Chen m.fl. 1993; Fernandes m.fl. 2015). Disse kan fungere som substrat og habitat for heterotrof bakterievekst, både i og utenfor biofilteret (Pedersen m.fl. 2017, Rojas-Tirado m.fl. 2019). Hvordan partikulært organisk materiale (POM) påvirker spesifikke bakteriers tilstedeværelse i RAS (Rojas-Tirado m.fl. 2018; Fossmark m.fl. 2020; Gregersen 2020) og hvordan dette igjen påvirker fisken, diskuteres (Becke m.fl. 2017; Chapman m.fl., 1987; Bullock m.fl., 1994; Lake og Hinch 1999; Au m.fl., 2004), men noen studier antyder en sammenheng mellom mikrobielle grupper i vannet og akkumulerte partikler i RAS (f.eks. Pedersen m.fl. 2017). Derimot er det velkjent at bakteriell nedbryting av POM fører til økt oksygenforbruk og kan føre til H₂S produksjon med alvorlige konsekvenser for fisken (Letelier-Gordo m.fl. 2020). Det er videre indikasjoner på at forhøyet organisk- og partikkelbelastning i akvakultursystemer vil gi grobunn for opportunistiske bakterier både i vannet og assosiert med fisken (Vestrum m.fl. 2020, Bugten m.fl. 2022). Lite er kjent om partiklenes form eller størrelsesfordeling i RAS har betydning for laksens vekst og velferd, eller for hvilke heterotrofe bakteriegrupper som forekommer i systemet.

Produksjon av laksesmolt og storsmolt i RAS har blitt en vanlig driftsform som kan ha gunstige effekter også i sjøfasen, men også gi nye utfordringer (f.eks. Ytrestøyl m.fl. 2018, Tørud m.fl. 2019, Remen m.fl. 2020). De komplekse fysiologiske og anatomiske endringene som oppstår under smoltifisering og tilpasningen til det marine miljøet er energikrevende prosesser, noe som bl.a. gjør postsmolt mer følsom for stressfaktorer (Jarungsiapisit m.fl. 2016). Lite er kjent når det gjelder hvordan laksens mikrobiomer endrer seg gjennom smoltifiseringen og ved overføring til vann med økt salinitet. Det er vist at både tarm- og skinn-mikrobiomer endrer seg hos laks etter utsetting i sjø (Dehler m.fl. 2017; Lokesh og Kiron, 2016), men hvilken betydning dette eventuelt har for fiskens slimhinnehelse vites ikke. Ifølge teorier innen mikrobiell økologi kan plutselige endringer i et miljø (perturberinger) øke sannsynligheten for oppblomstring av opportunistiske og patogene bakterier (Rojas-Tirado m.fl. 2019), men om laksens mikrobiomer er involvert i sykdom etter overføring til sjø er ikke kjent.

Ovennevnte har vært den faglige bakgrunnen for MikroRAS-prosjektet som har pågått siden 1. oktober 2021 til avslutningen 12. mars 2025. Prosjektet har vært fullfinansiert av Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering AS (FHF). Prosjektarbeidet har vært sterkt knyttet til et langtidsforsøk i RAS der hensikten var å undersøke effekt av økt partikkelbelastning på mikrobiomer, fiskehelse og vannkvalitet. Forsøket inkluderte 6 identiske RAS-enheter. Tre av dem ble operert ved lav og tre ved forhøyet partikkelbelastning gjennom en ferskvanns- og en brakkvannsfase. Deretter ble det utført en simulert overføring til sjø. Prosjektaktivitetene ble organisert i fem arbeidspakker med underliggende aktiviteter. Resultatene fra AP 1 (Effekter av partikkelbelastning på mikrobiomene), AP 2 (Effekter av partikkelbelastning på laksens velferd og helse) og AP 3 (Effekter av partikkelbelastning på vannkvaliteten) ble integrert og oppsummert i AP 4 for å illustrere sammenhenger mellom mikrobefunnene, fiskehelse- og -velferd og vannkvalitet.

Langtidsforsøket ble gjennomført ved Marineholmen RASLab som også stilte nødvendige fisk til rådighet. Forsøket ble godkjent av Mattilsynet med bakgrunn i FOTS-søknad (ID 29601).

Prosjektet har vært et samarbeid mellom NIVA, NTNU, UiB og Marineholmen RASLab. FHF har vært representert ved Sven Martin Jørgensen og Morten Lund. Referansegruppen har bestått av Julia Fossberg Buhaug (Siri Ag), Kari Johanne Kile Attramadal og Marit Holmvaag Mehus. (Figur 1).



Figur 1. Prosjektorganisering, -roller og -ansvar i prosjektet MikroRAS. Grå tekst indikerer at disse personene ikke har vært med i hele perioden.

2 Problemstilling og formål

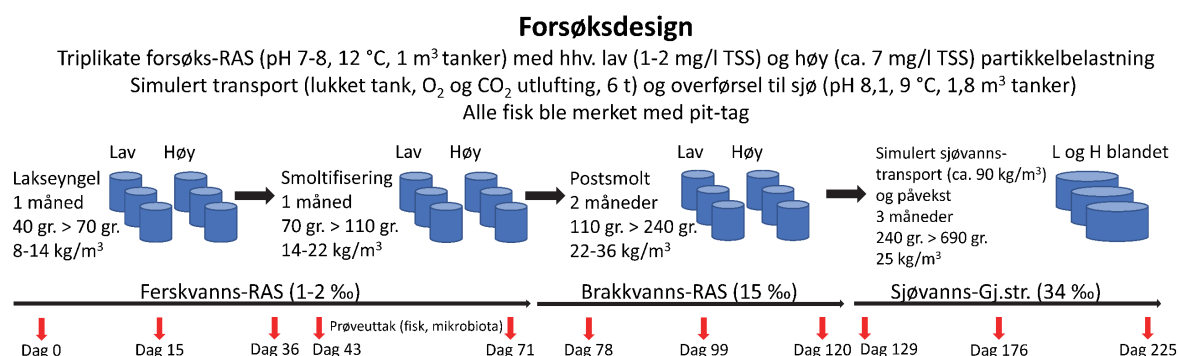
Ny kunnskap om sammenhengen mellom vannkvalitet, laksens mikrobiom og dens velferd/helse i smolt/postsmolt-RAS og påfølgende påvekst, vil kunne føre til optimaliserte driftsbetingelser og dermed vesentlige kostnadsbesparelser i form av bedre produksjon, lavere dødelighet, og mindre sykdom for enkeltoppdrettere og for næringen som helhet, og i vesentlig grad bidra til utviklingen av RAS som en bærekraftig industri.

Prosjektets hovedmål var derfor å fremskaffe økt kunnskap om sammenhengen mellom mikrobiomer i laks og produksjonsmiljø, fiskehelse, biofilterfunksjon og vannkvalitet gjennom smoltifisering og postsmoltfasen ved ulike partikkelbelastninger i RAS, samt effekter ved overførsel til sjø, og å bruke denne kunnskapen for å optimalisere drift av RAS i disse fasene. Hovedmålet ble delt opp i følgende delmål:

1. Karakterisere effekten av smoltifisering og økende salinitet på laksens feces-, skinn- og gjellemikrobiomer ved høy og lav partikkelbelastning.
2. Karakterisere hvordan partikkelbelastning i RAS før, under og etter smoltifisering påvirker laksens mikrobiomer, mukosale helse, velferd og prestasjon også etter den første tiden i sjøen.
3. Karakterisere effekten av partikkelbelastning og endret salinitet; før, under og etter smoltifisering på fysiokjemisk- og mikrobiologisk vannkvalitet, nitrifikasjon og biofilm- og partikkel-assosiert mikrobiota.
4. Integrere resultatene fra delmål 1 – 3 for å kunne å illustrere sammenhenger og gi råd om hvordan kunnskapen kan bidra til produksjon av en mer robust fisk som presterer bedre i sjøfasen.

3 Prosjektgjennomføring

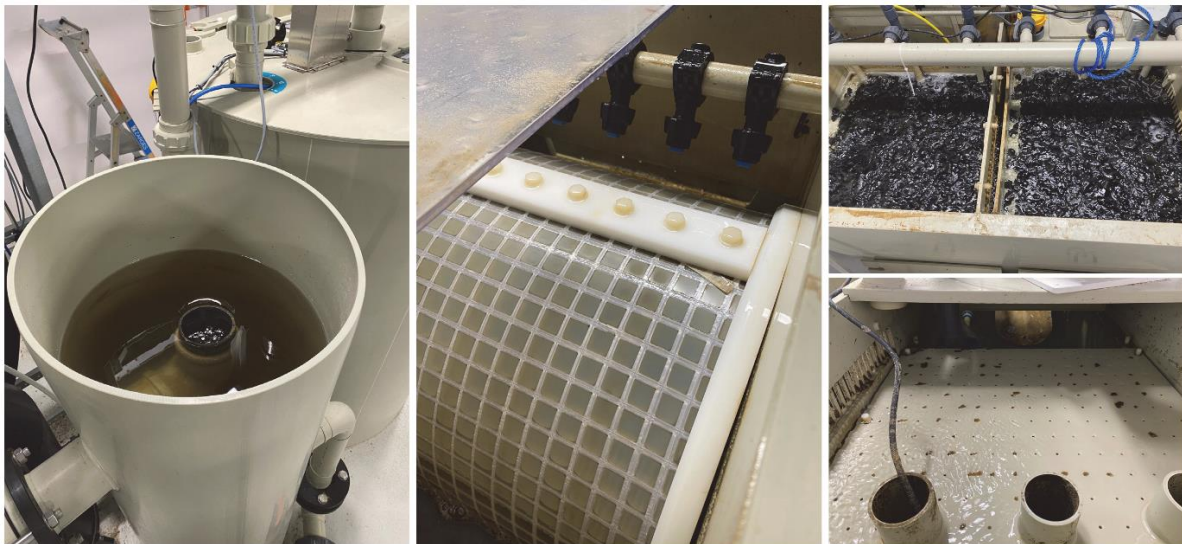
Prosjektarbeidet har vært bygget opp rundt delmålene og for å oppnå målene ble det gjennomført et langtidsforsøk i 6 RAS-enheter og deretter en simulert overføring til sjø, totalt 225 dager (Figur 2). Prosjektaktivitetene ble organisert i fem arbeidspakker med underliggende aktiviteter. Resultatene fra AP 1-3 ble integrert og oppsummert i AP 4 for å illustrere sammenhenger mellom mikrobefunnene, fiskehelse- og -velferd og vannkvalitet, for dermed kunne gi råd om hvordan resultatene kan bidra til produksjon av en mer robust laks som presterer bedre i sjøfasen.



Figur 2. Plan for forsøksdesign, operasjonelle betingelser og prøveuttak. Det ble tatt ut 6 fisk fra hvert kar/tidspunkt i RAS-fasen og 9 fisk fra hhv. lav (LTSS) og høy (HTSS) per tidspunkt i sjøvannsfasen for fiskehelse og mikrobiotaanalyser, samt biofilm og partikler som skissert i figuren. Partikler og bakterieantall, samt -aktivitet ble målt ukentlig. Øvrige vannkvalitetsparametere ble målt kontinuerlig (pH, salinitet, temp, O₂) eller med jevne mellomrom (øvrige).

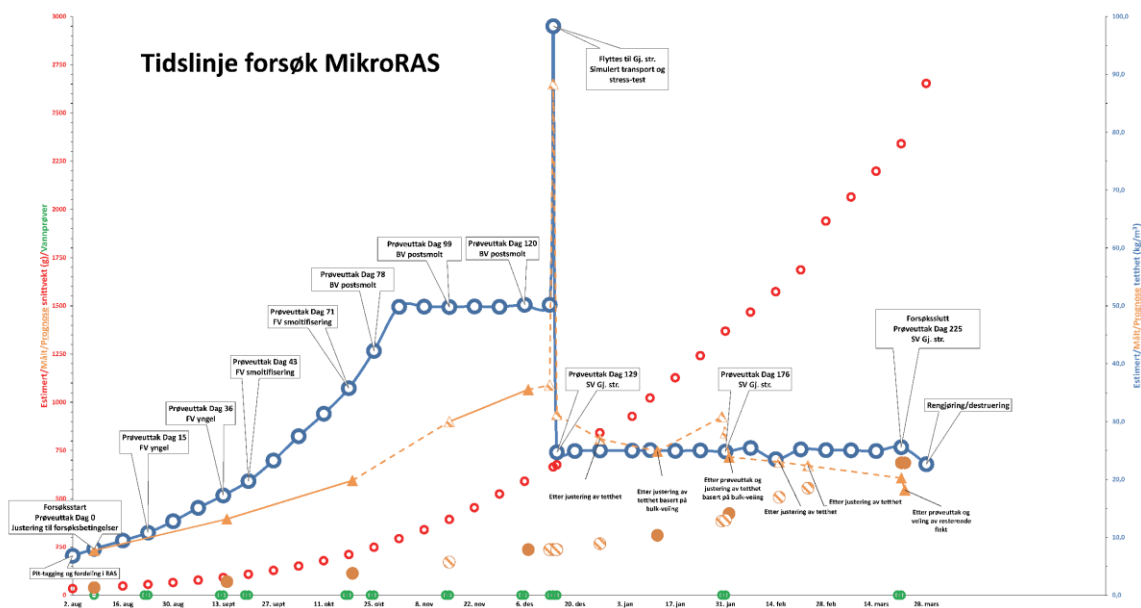
Forsøket benyttet fasilitetene til Marineholmen RASLab i Bergen (6 stk. RAS-enheter med 1 m³ kar og et totalt systemvolum på 2,2 m³) og tilhørende gjennomstrømssystem (3 kar à 1,8 m³). Hver RAS hadde automatisk logging av kritiske VK-parametere (pH, temperatur, salinitet, oksygen) og automatisk fôringsanlegg. Det ble benyttet 10-15 % overføring (Skretting Nutra RC 2 mm i ferskvannsfasen, Skretting Nutra RC 3 mm i brakkvannsfasen og Skretting Nutra Olympic 4 mm i sjøvannsfasen) i forhold til Skrettings fôringsstabell. Vannutskiftingen i RAS fasen ble justert slik at alle triplikate RAS fikk lik vannutskifting.

Lav og høy partikkelbelastning ble generert ved hhv. bruk av trommelfilter og swirl separator (Figur 3), og tilbakeføring av spylevann og oppsamlet slam. Lav partikkelbelastning tilsvarte 1-2 mg/l TSS (LTSS), mens høy partikkelbelastning tilsvarte 7 mg/l TSS (HTSS) i gjennomsnitt. Det ble for øvrig ikke oppnådd like høy partikkelbelastning som opprinnelig planlagt, men partikkelbelastningen i HTSS tilsvarer det som finnes i mange kommersielle anlegg. I forhold til karene med lav TSS kan den andre eksperimentelle gruppen likevel kalles høy i denne sammenhengen.



Figur 3. Vannbehandlingselementer i RAS-enhetene; swirl separator (464 mm Ø), trommelfilter (40 µm), biofilter (0,58 m³ MBB, KSK saddle chips 1.0, 625 m²/m³, 65 % fyllingsgrad), og CO₂-luffer.

RAS-enhetene ble satt i drift med modnede biolegemer den 20. juli 2022. PIT-merket yngel ble overført til forsøkskarene 2. august og kontrollveid til ca. 39,5 gram i gjennomsnitt ved forsøksstart den 8. august. Umiddelbart etter prøveuttaket ved forsøksstart 8. august (dag 0) ble det iverksatt tiltak for å skape forsøksbetingelsene (beskrevet ovenfor) til de 2 eksperimentelle gruppene (hhv. lav TSS og høy TSS). Smoltifisering ble indusert i henhold til standard protokoll (Handeland m.fl. 2001) og fisken ble gitt et vintersignal fra starten (8. august) fram til 14. september (ca. 5 uker), vha. en fotoperiode på 12 timer lys og 12 timer mørke (12L:12D), og etter dette gikk fisken på kontinuerlig lys. Den 19. oktober (dag 72) ble ferskvannet skiftet til brakkevann ($15 \pm 0,9$ ppt) og nye biolegemer som var modnet i brakkevann, erstattet ferskvanns-biolegemene. Ved overgang til sjøvannsfasen (dag 129) ble det simulert en 6 timers transport i sjøvann i fire 600 liters kar med utlufting (tetthet ca. 90 kg/m³). Sjøvannsfasen simulerte overføring til åpne merder og foregikk i tre 1,8 m³ kar med gjennomstrømmende sjøvann ($33,6 \pm 0,6$ ppt) og blandede grupper av fisk fra lav og høy TSS. Fisketettheten ble holdt rundt 25 kg/m³ i sjøvannsperioden (maksimal tillatt tetthet i åpne merder) ved jevnlig uttak av fisk, frem til forsøkslutt 21. mars 2023 (dag 225). Fra forsøksstart til forsøkslutt ble det utført 10 uttak av fisk (Figur 4). Ved hvert uttak ble det undersøkt hhv. 18 individer i RAS-fasen og 9 individer i sjøvannsfasen per TSS behandling for effekter på mikrobefunnene, fiskehelse- og -velferd. Fiskens vekt og lengde ble målt ved totalt 7 tilfeller (dag 0, 37, 72, 121, 157, 177 og 225) i løpet av hele forsøket.



Figur 4. Tidslinje for forsøket i MikroRAS. Planlagte (blå og røde symboler), gjennomførte (oransje og grønne symboler) og estimerte (stiplet linje/skraverte symboler) forhold av gjennomsnittlig fiskestørrelse (røde og oransje sirkler), gjennomsnittlig tetthet (gjennomtrukne symboler) og prøveuttak (grønne symboler for vannprøver og tekstbokser for uttak av fisk og mikrobiotaprøver) vises for hele tidsperioden, 8. august 2022 til 21. mars 2023.

3.1 Effekt av smoltifisering og økende salinitet på laksens tarm-, skinn-, og gjellemikrobiomer ved lav og høy partikkelbelastning (AP 1)

Fiskens mukosale fysiologi endres i løpet av smoltifiseringen, og påvirkes også av økning i salinitet. Dette vil trolig medføre markante endringer i fiskens skinn-, gjelle- og tarmmikrobiomer. Brå endringer i seleksjonspresset som virker på et mikrobiom kan medføre redusert diversitet og økt sannsynlighet for oppblomstring av opportunistiske bakterier. Det ble derfor tatt prøver av fiskens feces og skinn i RAS før og under smoltifisering, samt i postsmoltfasen for å sikre informasjon om suksessen av mikrobiomer. Dette arbeidet ble ledet av Ingrid Bakke (NTNU) i samarbeid med Håkon Dahle (UiB) og partnerne NIVA og RASLab. Sammensetning og alfa- og beta-diversitet av mikrobefunn ble kartlagt ved bruk av Illumina-sekvensering av 16S rDNA v3+v4 amplicon. Illumina-sekvensering ble også benyttet til metagenomikk for å kartlegge funksjonelt potensiale og til å rekonstruere mikrobielle genomer (MAGs). Prosesserte sekvenseringsdata i form av ASV (amplicon sequencing variants)-tabeller som inkluderte taksonomisk informasjon ble analysert videre ved hjelp av multivariatstatistikk, andre statistiske metoder og analyseverktøy (tilgjengelig bl.a. i de R-baserte «Phyloseq» og «Vegan»-pakkene).

3.2 Laksens velferd og helse før, under og etter smoltifisering ved lav og høy partikkelbelastning i RAS (AP 2)

Under smoltifisering er fisken mer følsom for stressfaktorer slik som forhøyet partikkelbelastning. Fiskens første forsvarslinje mot invaderende patogene mikroorganismer, nemlig slimhinneoverflatene på gjeller og hud gjennomgår strukturelle og immunologiske forandringer. I denne arbeidspakken ble det derfor brukt en tverrfaglig tilnærming med bruk av nyutviklede metoder, for å forstå effekten av partikkelbelastning på fiskevelferd, mukosalhelse og prestasjon også etter utsett i sjø. Dette arbeidet ble

ledet av Sara Calabrese (NIVA) i samarbeid med Mark Powell (RASLab). Fysiologiske responser ble evaluert gjennom primære (plasmakortisol), sekundære (plasmaioner) og tertiære responser (vekst og gen-uttrykk av stress/inflammasjons-markører i gjelle/skinn epitelet). Smoltkvaliteten ble evaluert gjennom måling av Natrium-Kalium-ATPase (NKA) aktivitet og endring i genuttrykk for ionetransportene (*NKA $\alpha 1a$, $\alpha 1b$ og NKCC*). FISHWELL-skåringskjemaet ble benyttet til operative (ytre) velferdsindikatorer. I tillegg ble sensormålinger av oksygen benyttet til å estimere oksygenforbruket og analyser av akkumulert kortisol i karvannet ble brukt som en stressindikator. Vekt og lengde av alle individene ble registrert flere ganger i løpet av forsøket (Figur 4). Appetitten ble kvantifisert ved registrering av forspill og SGR (Specific Growth Rate), og FCR (Feed Conversion Ratio) kunne dermed beregnes.

3.3 Vannkvalitet, nitrifikasjon og partikkel-assosiert mikrobiota før, under og etter smoltifisering ved lav og høy partikkelbelastning i RAS (AP 3)

Suboptimal fjerning og akkumulering av POM kan føre til nedsatt vekst og velferd for fisk, økt vekst av heterotrofe bakterier og dermed svekket biofilterytelse. Det er ukjent hvilket partikkelnivå, -form eller -størrelsesfordeling, bakterieantall og sammensetning i eller utenfor biofilteret som påvirker laksens vekst og velferd, både i ferskvanns- og sjøvanns-RAS. Derfor er kvalitativ og kvantitativ informasjon om bakteriekonsentrasjon og sammensetning av bakteriesamfunn viktig for å avdekke effekter (i fisk og system) og for å forstå og kontrollere vannbehandlingsprosessene. Dette arbeidet ble ledet av Paula Rojas-Tirado (frem til 31.10.2023) i samarbeid med Paulo Fernandes (begge NIVA) og partnerne RASLab, UiB og NTNU. Det ble benyttet online og manuelle sensorer, samt tatt vannprøver etter kar og etter vannbehandlingen. Det ble registrert temperatur, O₂, CO₂, pH, salinitet (daglig), NH₄, NO₂, NO₃ (to-tre ganger i uken), mikrobiologiske vannkvalitet (bakterieantall og -aktivitet), PO₄, SO₄, H₂S og partikler (ved hvert hoveduttak). Sammen med partikkelantall, -overflateareal, volum, -form og uregelmessighet ble målingene vurdert for innflytelse på fiskehelse og biofilteret. I tillegg ble det tatt prøver for å bestemme partikkelassosierte bakterier (PAB), frittlevende bakterier og biofilm-mikrobiota.

3.4 Integrere resultater fra AP 1, AP 2 og AP3 for å illustrere sammenhenger mellom laksens mikrobiota, velferd/helse, vannkvalitet, nitrifikasjon og partikkel-assosiert mikrobiota før, under og etter smoltifisering ved lav og høy partikkelbelastning i RAS (AP 4)

For å få en bedre forståelse av sammenhenger mellom laksens mikrobiota, velferd/helse, vannkvalitet, nitrifikasjon og partikkel-assosiert mikrobiota før, under og etter smoltifisering ved lav og høy partikkelbelastning i RAS ble resultatene fra AP 1, AP 2 og AP 3 vurdert samlet. Dette arbeidet ble ledet av Håkon Dahle (UiB) i samarbeid med øvrige prosjektdeltagere. Multivariat analyse ble benyttet for å utforske og illustrere sammenhenger mellom ulike kjemiske, fysiske og biologiske faktorer. Biologiske faktorer omfatter data om bakteriesammensetning og data om vekst, genuttrykk, og helse hos fisk.

3.5 Prosjektadministrasjon, koordinering og formidling (AP 5)

Prosjektorganiseringen har bidratt til en effektiv gjennomføring hvor elementene ble belyst og formidlet rask og nøyaktig til forskermiljø og næringen. Dette arbeidet ble ledet av Ole-Kristian Hess-Erga i

samarbeid med Siw Frantzen (begge NIVA) og bidrag fra alle partnerne. Alle møter, kommunikasjon, dokumenter, presentasjoner, publikasjoner og data ble delt gjennom prosjektets Teams-kanal. Det er også opprettet egen prosjektside på [Niva.no](https://niva.no). Resultatene ble formidlet både som populærvitenskapelige artikler, presentasjoner og vitenskapelige manuskript.

4 Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon

Overskriften på hvert underkapittel reflekterer alle delmålene i prosjektet og funnene beskrevet under hvert underkapittel svarer samtidig ut delmålene. Rekkefølgen på underkapitlene/delmålene er for øvrig endret i forhold til den opprinnelige rekkefølgen av arbeidspakkene, da vi mener dette gir bedre lesbarhet og oversikt.

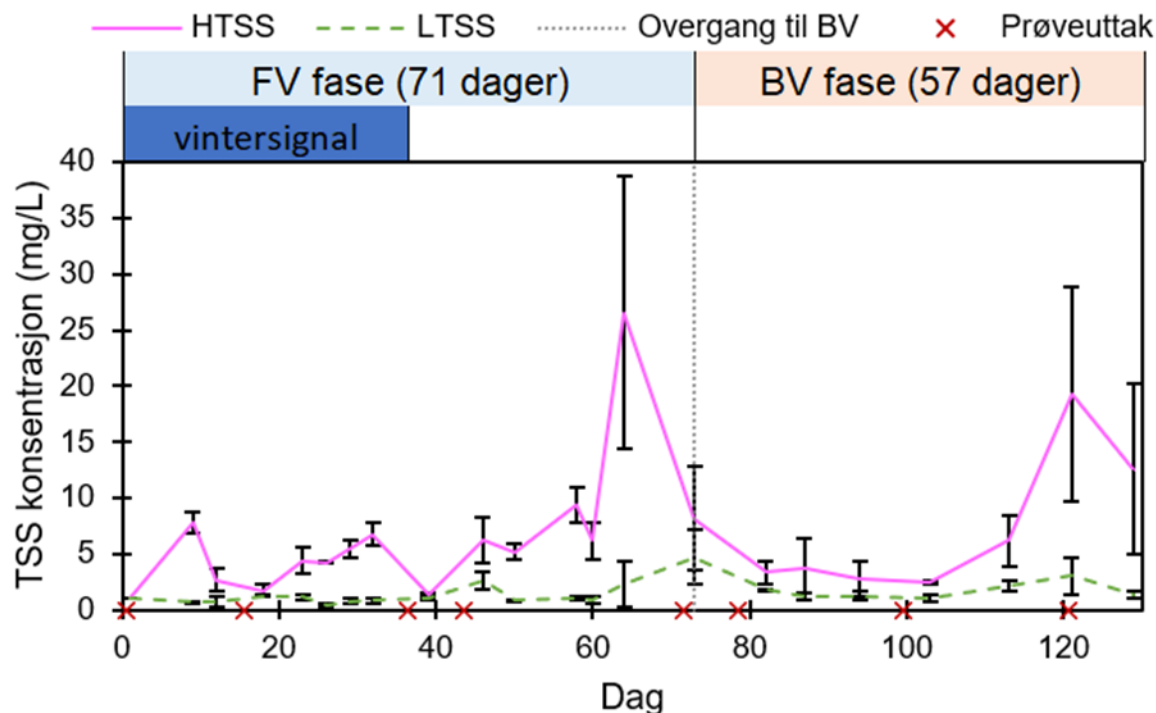
Delmålene er i stor grad oppnådd og det er identifisert tiltak som kan iverksettes for å oppnå hovedmålet; fremskaffe økt kunnskap om sammenhengen mellom mikrobiomer i laks og produksjonsmiljø, fiskehelse, biofilterfunksjon og vannkvalitet gjennom smoltifisering og postsmoltfasen ved ulike partikkelbelastninger i RAS, samt effekter ved overførsel til sjø, og å bruke denne kunnskapen for å optimalisere drift av RAS i disse fasene. I tillegg er det identifisert områder hvor det fremdeles mangler kunnskap og foreslått nye undersøkelser for optimalisering av fiskeproduksjonen i RAS.

For å oppnå målene for prosjektet ble det gjennomført et langtidsforsøk i 6 RAS-enheter og deretter en simulert overføring til sjø. Forsøket forløp problemfritt i henhold til beskrivelsen i kapittel 3. Forsøkets tidslinje og enkelte registreringer er vist i Figur 4.

4.1 Vannkvalitet, nitrifikasjon og partikkel-assosiert mikrobiota før, under og etter smoltifisering ved lav og høy partikkelbelastning i RAS (AP 3)

Dette arbeidet har hatt som mål å svare ut delmål 3: Karakterisere effekten av partikkelbelastning og endret salinitet; før, under og etter smoltifisering på fysiokjemisk- og mikrobiologisk vannkvalitet, nitrifikasjon og biofilm- og partikkelassosiert mikrobiota.

Vannkvaliteten i de 6 RAS-enhetene ble manipulert fra starten av forsøket (dag 0). Tre enheter fikk lav partikkelbelastning, tilsvarende 1-2 mg/l TSS, benevnt LTSS. De øvrige 3 enheter fikk forhold som ofte observeres i kommersielle RAS, tilsvarende ca. 7 mg/l TSS, benevnt høy TSS eller HTSS (Figur 5). LTSS ble oppnådd ved bruk av trommelfilter og swirl separator og for HTSS ble hhv. spylevann og oppsamlet slam tilbakeført med jevne mellomrom. Fisken i de to eksperimentelle gruppene (LTSS og HTSS) var like fra start, hadde likt fôropptak og overlevelse, men resultatene indikerer at fisken i LTSS presterte bedre enn HTSS i RAS-fasen (Tabell 1). Dette utdypes i kapittel 4.2.1.



Figur 5. TSS konsentrasjon i ferskvanns- (FV) og brakkvannsfasen (BV) i RAS. LTSS i grønt og HTSS i rosa. Stiplet linje viser overgangen fra ferskvann til brakkvann, røde kryss viser hovedprøveuttak (Dag 0, 15, 36, 43, 71, 78, 99 og 120) og variasjonen mellom de 3 karene er indikert med standardavvik. Modifisert fra Fiksdal, masteroppgave, 2023.

Tabell 1. Fiskens forhold og vekst i RAS-fasene, ferskvann og brakkvann.

Parameter	Enhet	FV fase (71 dager)		BV fase (57 dager)	
		LTSS (n = 3)	HTSS (n = 3)	LTSS (n = 3)	HTSS (n = 3)
Fôropptak	kg	14,1 ± 0,5	14,0 ± 1,0	20,1 ± 0,2	20,0 ± 0,8
CFB (Cumulativ Feed Burden)	kg/m ³	0,96 ± 0,36	0,88 ± 0,06	2,3 ± 1,0	2,2 ± 0,1
Fiskens startvekt	g	39,4 ± 4,4	39,5 ± 4,2	117,1 ± 22,7	110,4 ± 17,9
Fiskens sluttvekt	g	117,1 ± 22,7	110,4 ± 17,9	247,5 ± 50,9*	223,8 ± 49,2*
Biomasseøkning	kg	12,8 ± 0,1*	11,7 ± 0,5*	19,3 ± 1,0*	15,8 ± 2,0*
Overlevelse	%	99,8 ± 0,4	99,6 ± 0,4	100	99,8 ± 0,4
Fôrfaktor	g/g	1,13 ± 0,08	1,22 ± 0,25	1,09 ± 0,06	1,36 ± 0,16

* betyr signifikant forskjell ($p < 0,05$) mellom LTSS og HTSS i den samme fasen.

Vannkvalitetsparameterne i RAS-fasene var innenfor normale verdier som observeres ved kommersiell produksjon av laks i RAS (Tabell 2). Vannkvalitet parameterne i RAS-fasene, ferskvann og brakkvann. pH, salinitet, temperatur og oksygenmetningen var tilnærmet identiske for LTSS og HTSS, iht. ferskvanns- og brakkvannsfasen. Måleparameterne for partikler og organisk materiale viste naturlig nok forskjell mellom LTSS og HTSS, men også noe forskjell mellom ferskvannsfasen og brakkvannsfasen. Dette kunne også tydelig observeres ved visuell observasjon av karvannet (Figur 6).

Tabell 2. Vannkvalitet parameterne i RAS-fasene, ferskvann og brakkvann.

Parameter	Enhet	FV fase (71 dager)		BV fase (57 dager)	
		LTSS (n = 3)	HTSS (n = 3)	LTSS (n = 3)	HTSS (n = 3)
pH	-	6,86-8,18	6,86-8,46	7,11-7,87	6,99-8,14
Temperatur	°C	12,4 ± 0,2	12,3 ± 0,1	12,3 ± 0,0	12,2 ± 0,1
Salinitet	ppt	1,42 ± 0,08	1,47 ± 0,07	15,5 ± 0,2	14,5 ± 1,0
O ₂	%	91,1 ± 4,0	95,5 ± 1,5	92,0 ± 2,7	93,2 ± 1,9
Alkalitet	mEq/l	0,58 ± 0,03	0,91 ± 0,33	1,50 ± 0,13	3,23 ± 0,30
CO ₂	mg/l	3,65 ± 0,41	4,64 ± 0,46	5,76 ± 0,03	7,85 ± 0,12
TAN	mg N/l	0,30 ± 0,15	0,52 ± 0,10	0,16 ± 0,01	0,29 ± 0,04
NO ₂ -N	mg N/l	0,30 ± 0,12	0,54 ± 0,13	0,10 ± 0,01	0,24 ± 0,05
NO ₃ -N	mg N/l	27,6 ± 9,9	18,3 ± 3,9	47,2 ± 11,2	25,0 ± 6,2
TOC	mg C/l	5,48 ± 0,05	7,81 ± 0,08	9,27 ± 0,23*	18,48 ± 0,42*
DOC	mg C/l	5,44 ± 0,05	7,56 ± 0,09	8,53 ± 0,23*	14,90 ± 0,35*
POC	mg C/l	0,52 ± 0,03	0,59 ± 0,02	0,73 ± 0,07*	3,58 ± 0,24*
TSS	mg/l	1,13 ± 0,02*	6,77 ± 0,18*	2,07 ± 0,06*	7,31 ± 0,29*
Turbiditet	NTU	0,28 ± 0,09	0,44 ± 0,21	0,42 ± 0,08*	2,56 ± 3,27*
k-verdi	1/t	0,023 ± 0,005	0,044 ± 0,009	0,026 ± 0,010*	0,342 ± 0,076*
Bakteriekonsentrasjon	celler x10 ⁶ /ml	0,62 ± 0,32	0,66 ± 0,38	1,19 ± 1,09*	1,45 ± 1,28*
Partikkelkonsentrasjon	#part/ml	2 066 ± 52	2 754 ± 74	6 881 ± 260*	22 117 ± 2 029*

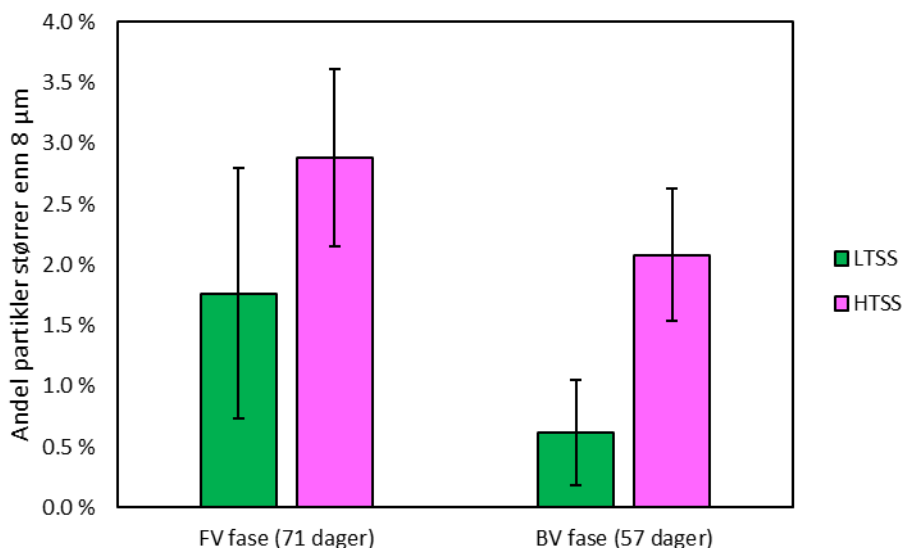
* betyr signifikant forskjell ($p < 0,05$) mellom LTSS og HTSS i den samme fase.



Figur 6. Visuell observasjon av sikt i vannet i ferskvannsfasen og i brakkvannsfasen ved lav og høy TSS og ved 2 forskjellige tidspunkt.

4.1.1. Undersøke i hvilken grad høy organisk belastning påvirker partikkelkarakteristikk, kjemisk- og mikrobiologisk vannkvalitet og mikrobiota suspendert i vannet

I HTSS vannet var det litt høyere alkalitet (ANOVA, $p = 0,008$), CO_2 (ANOVA, $p < 0,001$), TOC (ANOVA, $p = 0,007$), DOC (ANOVA, $p = 0,005$), POC (ANOVA, $p = 0,043$), turbiditet (ANOVA, $p = 0,029$), k-verdi (ANOVA, $p = 0,020$), bakteriell mengde (ANOVA, $p < 0,001$), og partikkelkonsentrasjon (ANOVA, $p = 0,048$) (Tabell 2). Som nevnt førte tilbakeføring av slam og spylevann til et mørkere og mer uklart vann i HTSS gruppe (Figur 6), med høyere partikkelkonsentrasjon og turbiditet. Dette er i samsvar med tidligere studier (Becke m.fl. 2017, 2018 og Schumann & Brinker 2020). Fiskene fra HTSS hadde dårligere fôrfaktor, sannsynligvis forårsaket av økt energiforbruk og/eller redusert fôrfordøyelse og næringsopptak, som dermed førte til høyere produksjon av feces og urin, og er i samsvar med andre studier (McCormick m.fl. 1998, Olsen m.fl. 2005, Skov m.fl. 2013). Det samlede resultatet av tilbakeført spylevann og slam og redusert fôrfaktor, ble en høyere organisk belastning i HTSS og en høyere andel større partikler, i forhold til LTSS. I HTSS var 2,3 % av partiklene større enn $8 \mu\text{m}$, mens 1,6 % av partiklene var større enn $8 \mu\text{m}$ i LTSS (Figur 7). Denne forskjellen i størrelse, samt den totale mengden organisk materiale i HTSS stimulerte heterotrof bakterievekst, som vist i økt bakterieantall (flow cytometri) og -aktivitet (k-verdi) i vannet, i forhold til LTSS (Tabell 2) som er i samsvar med andre studier (Michaud m.fl. 2014, 2006 og Rojas-Tirado m.fl. 2019). Det ble også funnet litt høyere forekomst av *Rhodobacteraceae* og *Flavobacteraceae* i vannet for HTSS-RAS, både for prøver samlet på 0,2 og $8 \mu\text{m}$ filter. Ved dag 121 (ved slutten av brakkvannsfasen i RAS) var to bakteriepopulasjoner av slekta *Leucothrix* svært dominerende i vannprøvene samlet på $8 \mu\text{m}$ filter, spesielt i HTSS-prøver (henholdsvis 28 % og 17 % i HTSS mot 19 % og 12 % i LTSS). Disse bakteriepopulasjonene var altså assosiert med høyere partikkelbelastning. *Leucothrix* er kjent som marine, filamentære bakterier som koloniserer overflater. De infiserer bentiske marine organismer og kan medføre sykdom (Johnson m.fl. 1971). Selv om vi ikke kjenner til at disse bakteriepopulasjonene medførte sykdom hos fisken kan vi anta at de er en indikasjon på redusert mikrobiell vannkvalitet.

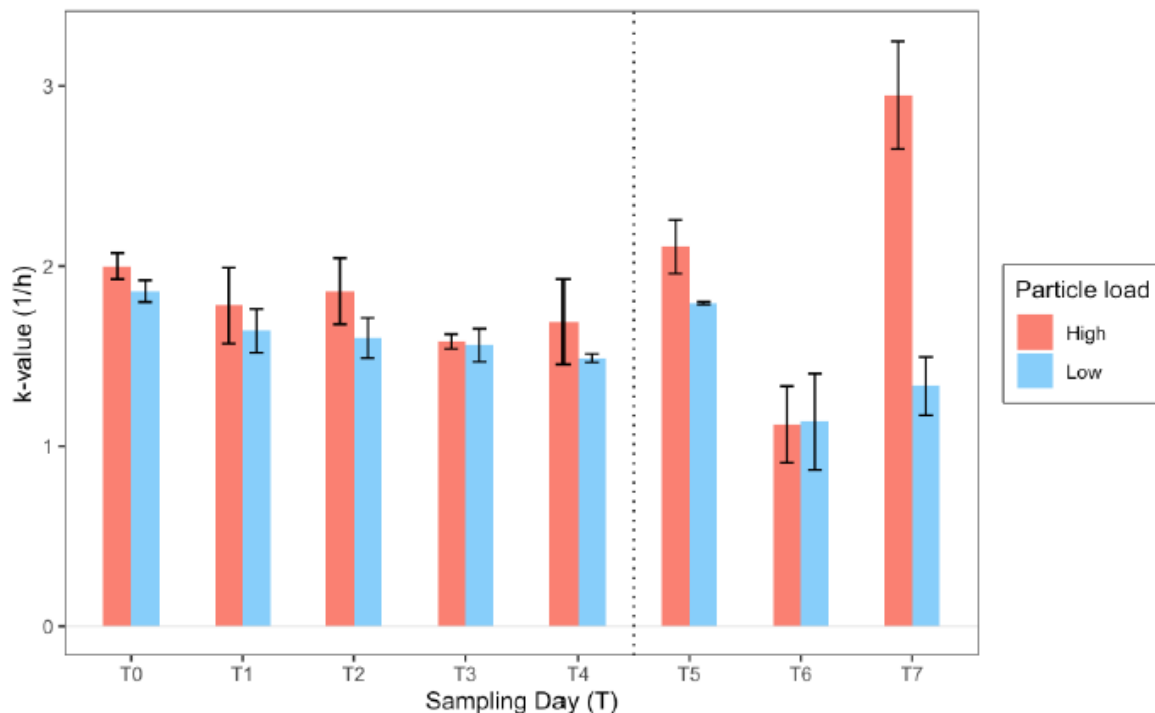


Figur 7. Andel partikler større enn $8 \mu\text{m}$ i LTSS (grønne søyler) og i HTSS (rosa søyler).

4.1.2. Undersøke i hvilken grad høy organisk- og partikkelbelastning påvirker nitrifikasjonsraten og biofilter-mikrobiota

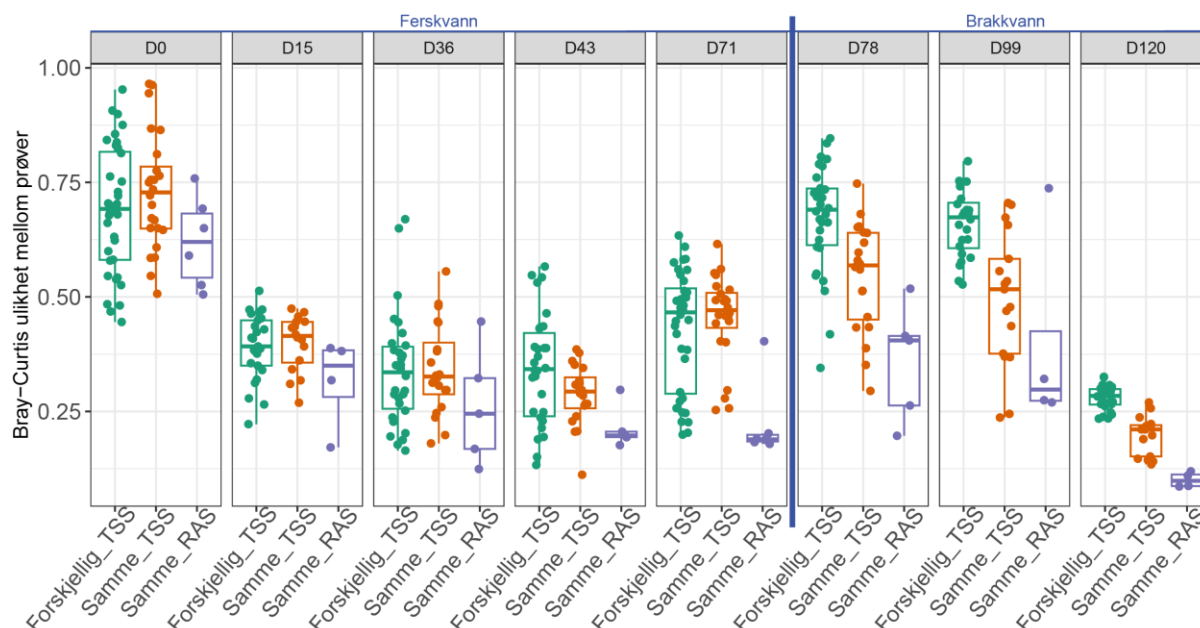
Økt partikkelbelastning i HTSS påvirket mikrobiota både i vannet og i biofiltrene, noe som samsvarer med andre studier (Guerdat m.fl. 2011, Pedersen m.fl. 2017). Biofiltrene i HTSS hadde høyere heterotrof bakteriell aktivitet (Figur 8) enn dem i LTSS. Karakterisering av biofilmsamfunnene viste at sammensetningen av biofilm-mikrobiota var relativt lik mellom HTSS- og LTSS-systemene i ferskvannsfasen, men at de divergerte etter overgangen til brakkvann (Figur 9). En toveis PERMANOVA

viste signifikante forskjeller i sammensetning av biofilm-mikrobiota både mellom prøvetidspunkt ($R = 0.41$, $p < 0.001$) og mellom HTSS og LTSS ($R = 0.05$, $p < 0.001$). Noen bakteriepopulasjoner innen familiene *Rhodobacteraceae* og *Flavobacteraceae* hadde høyere forekomst i biofilmmikrobiota i HTSS, mens andre populasjoner innen de samme familiene hadde høyere forekomst i LTSS. Det var dermed ikke en enkelt taksonomisk gruppe på høyere nivå som dominerte avhengig av partikkelbelastning. Bakteriepopulasjonene som varierte er ikke kjent for å være patogene eller for å produsere metabolitter med negativ innvirkning på fisken. Mens *Flavobacteriaceae* er heterotrofe bakterier, er *Rhodobacteraceae* kjent for diverse energimetabolismer og kan ha både heterotrof og fototrof metabolisme. Det var altså en økning i forekomst av heterotrofe bakterier i biofilmsamfunnene i HTSS sammenliknet med i LTSS i brakkvannsfasen. Videre observerte vi at biofilm-mikrobiotaen endret seg mye over tid, spesielt i brakkvannsfasen, der forekomsten av nitrifiserende bakterier gikk kraftig ned etter at de nye brakkvannsfiltrene ble satt inn i systemene på dag 72. Dette så ut til å skje fortere ved høy enn ved lav TSS, men det var stor variasjon mellom individuelle biomedie-legemer og denne forskjellen mellom RAS med høy og lav TSS var ikke signifikant. Denne nedgangen kan forklares med at de nitrifiserende bakteriene hadde blitt favorisert ved hjelp av høye TAN-konsentrasjoner i modningsfasen, og nedgangen antakelig var en respons på redusert tilgang på TAN etter at de ble satt inn i RAS. Videre vil en eventuell overdimensjonering av biofiltrene bidra til nedgangen i forekomst av nitrifiserende bakterier.



Figur 8. Heterotrof mikrobiell aktivitet (k-verdi) i biofilmen på biolegemene. HTSS i røde søyler, LTSS i blå søyler. Hentet fra Fiksdal, masteroppgave, 2023.

Selv om målingene av TAN, nitritt og nitrat viste god nitrifikasjon i alle RAS var det en gjennomgående forskjell mellom HTSS og LTSS (Tabell 2). HTSS hadde signifikant høyere TAN-konsentrasjon og lavere nitratkonsentrasjon, sammenliknet med LTSS. Vi fant at det var høyere forekomst og aktivitet av heterotrofe bakterier og redusert forekomst av nitrifiserende bakterier i HTSS biofiltrene. Den reduserte nitrifiseringskapasiteten i HTSS skyldes derfor sannsynligvis økt konkurranse fra heterotrofe bakterier om oksygen og plass på biomedie-overflater, noe som er foreslått i andre studier (Guerdat m.fl. 2011, Michaud m.fl. 2006, 2014).



Figur 9. Sammenlikning av biofilm-mikrobiota innen (oransje) og mellom (grønn) de eksperimentelle gruppene (LTSS og HTSS) ved ulike prøvedager (D0 til D120). Hvert punkt representerer en sammenlikning mellom to biofilmprøver (målt som Bray-Curtis-ulikhet). Biofilter-mikrobiota var ikke forskjellig mellom HTSS og LTSS RAS i ferskvannsfasen, men divergerte tydelig fra starten av brakkvannsfasen (fra dag 72). Dette er synlig her ved at prøver fra samme partikkelbelastning er likere hverandre enn de er prøver fra den andre gruppen.

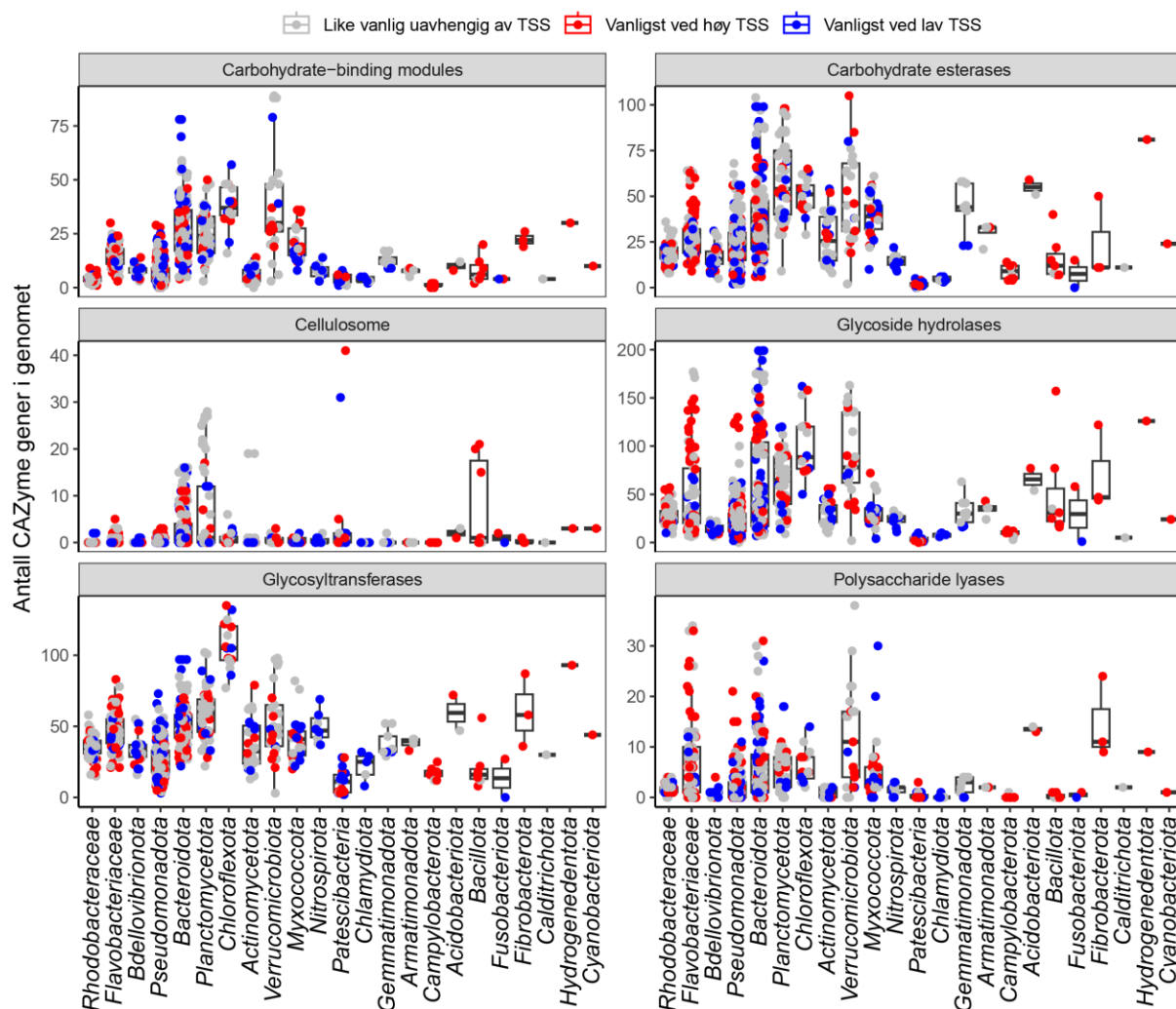
Videre brukte vi metagenomikk-sekvensering til å kartlegge de funksjonelle genene i biofilm- og vann-mikrobiota. Vi genererte 878 metagenome-assembled genomes (MAGs). Deres taksonomi og forekomst korresponderte i stor grad med resultatene fra analysen av amplitikon-sekvenseringsdata (basert på 16S rRNA-genet). Genomene inneholdt gener som koder for et stort antall primære og sekundære metabolitter, for eksempel karotenoider og bakteriociner (antibiotika) som vil sirkulere i vannet og som derfor potensielt kan påvirke fisken. Metabolittene geosmin og hydrogensulfid var av særlig interesse, men vi kunne ikke se forskjeller i forekomst av gener relatert til disse i vårt datasett. Likevel kunne det tenkes at slike gener ble uttrykt i ulik grad i HTSS- og LTSS-systemene. Metatranskriptomikk ville vært bedre egnet til å adressere dette, men dette er mer utfordrende analyser for bakterier, fordi RNA-transkriptene for kodende gener (mRNA) er svært ustabile hos bakterier.

For å undersøke hvilke næringsstoffer de ulike bakteriegruppene potensielt kunne utnytte, og om dette eventuelt kunne knyttes til partikkelbelastning, analyserte vi innholdet av gener som koder for karbohydrat-aktive enzymer (CAZymes) i genomene. Vi forventer at bakterier som kan utnytte partikulært organisk materiale har et større repertoar av enzymer for nedbrytning av komplekse organiske forbindelser. Det var stor variasjon i innholdet av CAZymes innen og mellom forskjellige bakteriegrupper (Figur 10). Selv om sammensetningen av mikrobiota var signifikant forskjellig mellom vann- og biofilterprøver, og flere bakteriegrupper hadde ulike forekomst mellom disse prøvetypene, var det ingen klar forskjell i hvilke næringsstoffer de potensielt kunne utnytte. Noen familier, som f.eks. *Saprospiraceae*, *Pirellulaceae* og *Paenibacillaceae*, hadde genomer med et høyt antall ulike typer karbohydrat-aktive enzymer, men forekomsten av disse bakteriegruppene var relativt like mellom HTSS- og LTSS-prøver. For bakteriegruppene som hadde høyest forekomst, både generelt og i HTSS spesielt, slik som *Rhodobacteraceae* og *Flavobacteriaceae*, viste imidlertid metagenomdataene at de hadde lite genetisk potensial for utnyttelse av komplekse karbohydrater. Disse bakteriene, som er vanlige i næringsrikt vann, for eksempel under høy partikkelbelastning, er trolig de som best utnytter enkle og lett nedbrytbare

organiske substrater, slik som fettsyrer eller stivelse ved hjelp av amylase enzymer. Dermed har de ikke behov for stor diversitet av enzymer som bryter ned komplekse og næringsfattige forbindelser. Dette er en typisk egenskap for generalistiske, hurtigvoksende bakterier, og samsvarer med tidligere studier som har vist at opportunistiske bakterier favoriseres når tilgangen til lett nedbrytbare organiske forbindelser øker (Vadstein m.fl. 2018). Når RAS drives mer intensivt og partikkelbelastningen øker, vil også mengden lett omsettelige organiske substrater øke. Dette vil øke systemets bæreevne og kan medføre en økning i forekomsten av heterotrofe bakterier som vinner konkurransen om lett omsettelige energikilder.

Komplekse karbohydrater slik som cellulose, lignin og beta-glukan er trolig tilgjengelige i relativt høy konsentrasjon i RAS-vann. Disse stoffene blir lite utnyttet i fiskens tarm og de er heller ikke lett tilgjengelige for de fleste bakterier. Siden de fleste bakteriene i RAS sitter på små partikler omgitt av vann er det trolig fordelaktig for heterotrofe bakterier å produsere fastsittende cellulose-komplekser istedenfor enkeltzymer som raskt vil diffundere bort. Kun 28 % av genomene fra MikroRAS hadde minst ett gen CAZyme i klassen «cellulosome», mens kun 7 % hadde minst 5 gener i denne klassen. De fleste av disse genomene var også relativt sjeldne, med unntak av noen *Saprospiraceae* og *Chitinophagaceae* ved slutten av ferskvann og brakkvannsfasen. En uke etter overgang til brakkvann var det imidlertid lite av disse genomene og dominans av *Rhodobacteraceae* og *Flavobacteriaceae*. Dette tyder på at det tok tid før bakterier med kompleks metabolisme kunne re-etablere seg etter destabiliseringen av mikrobiota ved salinitetsøkningen, og at tungt nedbrytbare stoffer trolig hopet seg opp i vannet i denne perioden.

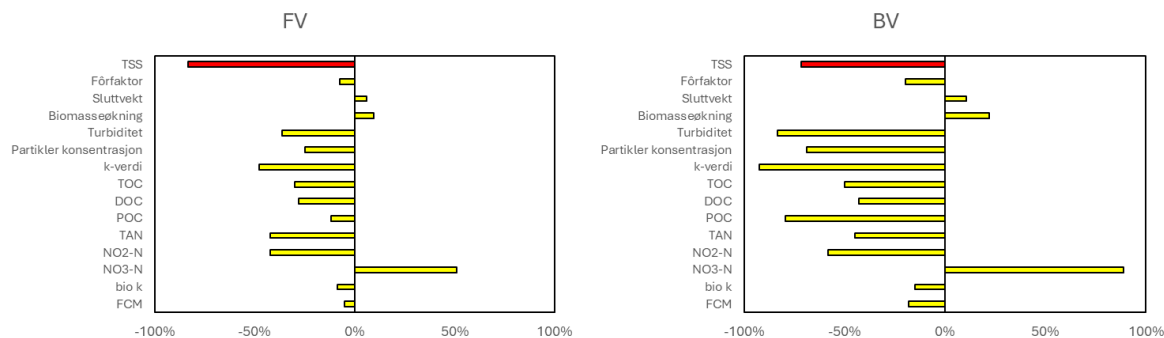
Metagenomikkdata for biofilterprøvene gir også en unik mulighet til å kvantifisere tilstedeværelse av ulike nitrifiserende bakterier. Ammoniumoksidering kan utføres av arker (AOA), bakterier (AOB), eller en spesialisert bakteriegruppe som utfører både ammonium- og nitritt-oksidering i samme celle (comammox *Nitrospira*). Standard 16S rRNA-baserte data kan ikke skille mellom disse hovedgruppene av ammoniumoksidierende mikrober, og derfor finnes det lite kunnskap om hvilke mikrobegrupper som er viktige for ammonium-oksidering i biofiltere i RAS. Dette kan imidlertid undersøkes ved å hente ut data for *amoA*-genet, som koder for et nøkkelenzym i ammonium-oksidering, fra metagenomikkdata. Vi fant begrenset diversitet av ammonium-oksidierende bakterier i alle prøvene fra MikroRAS. I ferskvannsfasen dominerte *Nitrosospira* sammen med lavere forekomster av *Nitrosomonas*. De nye biolegemene i brakkvannsfasen inneholdt i all hovedsak *Nitrosomonas* og noe *Nitrosospira* i lavere forekomster. Vi fant verken comammox eller AOA. Dette gjaldt for både biofilter-biofilm og vannprøver. Selv om AOA er observert både i ferskvanns- og sjøvanns-biofiltere i RAS tidligere (Bartemele m.fl. 2017, Huang m.fl. 2018), er det ikke nødvendigvis slik at tilstedeværelse av AOA er nødvendig i et velfungerende nitrifiserende biofilter. Videre forskning er nødvendig for å forstå hvilke faktorer som selekterer for de ulike hovedgruppene av ammoniumoksidierende mikrober.



Figur 10. Antallet karbohydrat-aktive enzymer i hvert genom (generert av metagenomer fra både biofilter og vann) varierte mye mellom forskjellige taksa. Her vises antallet karbohydrat-aktive enzymer av hver genklasse for hvert fylum, med de særlig HTSS-assosierte familiene Rhodobacteraceae og Flavobacteriaceae vist separat på venstre side. Hvert genom er farget etter om det har høyest forekomst i HTSS (rødt) eller LTSS (blått) RAS.

Effekter av lav TSS

Resultatene viser at en reduksjon i TSS fra 7 til 1 mg/l i ferskvannsfasen og fra 7 til 2 mg/l i brakkvannsfasen førte til bedre fiskevekst, forbedret vannets klarhet med hhv. 38 % i ferskvannsfasen og 84 % i brakkvannsfasen, reduserte partikkelkonsentrasjonen med hhv. 25 % og 69 %, reduserte bakteriemengden med hhv. 6 % og 18 %, og forbedret nitrifikasjonen med hhv. 42 % og 45 % lavere TAN og 44 % og 45 % lavere nitritt (Figur 11). Reduksjonen i TSS førte også til redusert heterotrof mikrobiell aktivitet i vannet med hhv. 48 % og 93 %, og i biofiltrene med hhv. 9 % og 15 % i ferskvannsfasen og brakkvannsfasen (Figur 11). Dette indikerer at næringen kan forbedre produksjonen i RAS. Selv vanlige TSS-nivåer som 7 mg/l påvirker fiskens vekst negativt og kan påvirke nitrifikasjonen og oksygenforbruket negativt. I tillegg kan slik forhøyet partikkelbelastning redusere effekten av ulike vannbehandlingsprosesser som utlufting av CO₂ (Barrut m.fl. 2013) og føre til ugunstig mikrobiell vannkvalitet og mulig produksjon av uønskede forbindelser som H₂S (en av de viktigste årsakene til massedødelighet i RAS de siste årene) (Fernandes m.fl. 2024, Rojas-Tirado m.fl. 2021) og geosmin (som gir muddersmak) (Lukassen m.fl. 2002, Zarnyadi m.fl. 2015), hvis ikke det organiske materialet som sedimenterer fjernes.

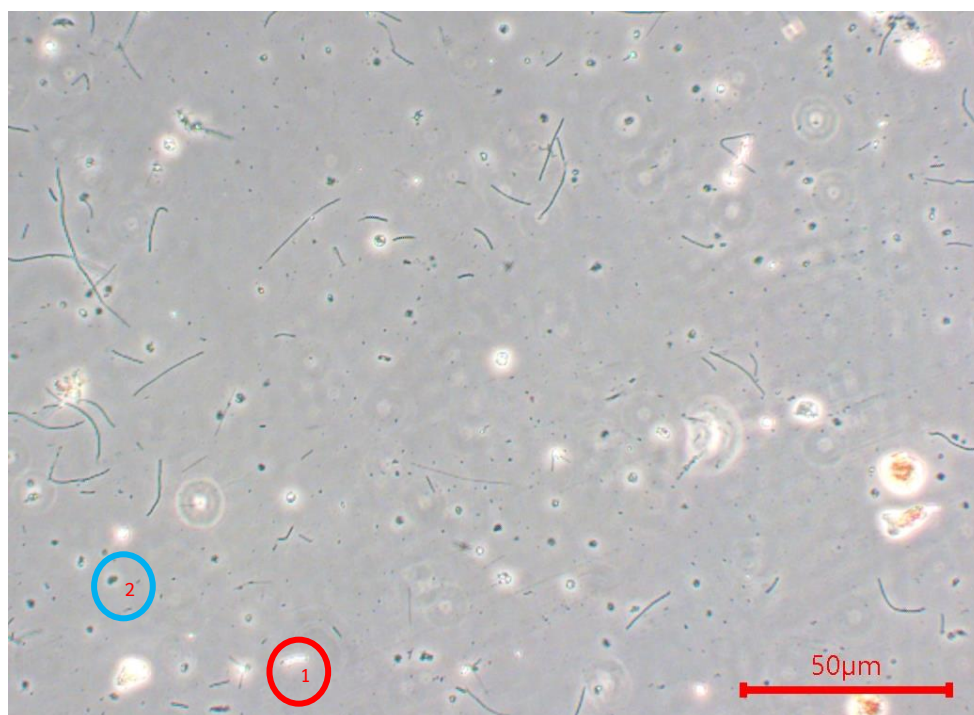


Figur 11. Effekt av redusert TSS fra 7 til 1 mg/l i ferskvannsfasen (figur til venstre) og fra 7 til 2 mg/l i brakkvannsfasen (figur til høyre) på forskjellige vannkvalitetsparametere i RAS.

4.1.3. Undersøke i hvilken grad salinitet og fiskestørrelsen påvirker partikkelegenskapene og antall og aktivitet av partikkelassosierte bakterier

Som nevnt fantes det en høyere andel av partikler større enn 8 μm i HTSS enn i LTSS (Figur 7). Det ble ikke funnet at salinitet påvirket partikkelegenskapene eller aktivitet av partikkelassosierte bakterier.

En ny metode basert på Becke m.fl. (2020) ble utviklet og testet i prosjektet. Vannprøver ble fiksert med Lugol (4 % v/v) og sedimentert over-natt (tilsvarende som forbehandling av mikroalgeprøver). Partiklene ble forsøkt identifisert, målt og kategorisert iht. organisk eller uorganisk innhold. Partiklene ble bestemt som uorganiske hvis de reflekterte lys og organiske hvis de ikke reflekterte lys (Figur 12). Analysene ble utført med et lysmikroskop (LEICA DM6000 B), koblet til et digitalkamera (GXCAM-U3-5). Størrelsen og hovedbestanddelen (organisk/uorganisk) ble analysert med bildebehandlings- og analyseprogrammet GXCapture-T. Et minimum av 100 partikler per prøve ble identifisert og analysert.



Figur 12: Mikroskopbilde av en vannprøve (150x forstørrelse). Partiklene ble bestemt som uorganiske hvis de reflekterte lys (nr. 1 rød sirkel) og organiske hvis de ikke reflekterte lys (nr. 2 blå sirkel). Bestemmelse og størrelsesmåling skjedde ved 750x forstørrelse.

Ingen tydelige forskjeller ble funnet i antall eller størrelse av organiske partikler mellom HTSS og LTSS ved bruk av denne metoden. Det er mulig at det begrensede volumet som kunne analyseres påvirket resultatet og metoden bør derfor utvikles videre. Automatisering av analysene vil kunne bøte på problemet med mengden partikler som kan analyseres og muligens føre til en mer representativ kvantifisering.

4.2 Laksens velferd og helse før, under og etter smoltifisering ved lav og høy partikkelbelastning i RAS (AP 2)

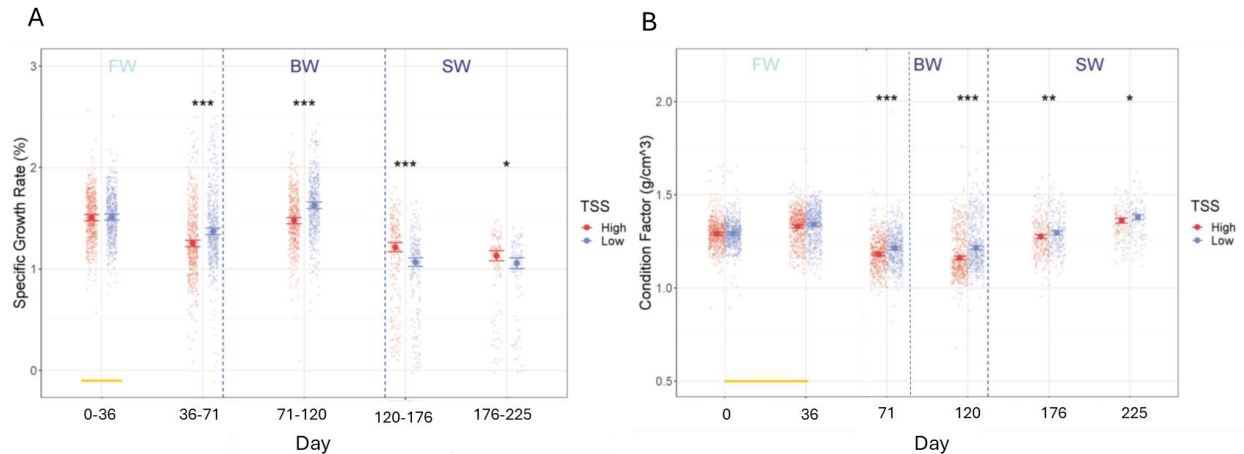
Dette arbeidet har hatt som mål å svare ut delmål nummer 2: Karakterisere hvordan partikkelbelastning i RAS før, under og etter smoltifisering påvirker laksens mikrobiomer, mukosale helse, velferd og prestasjon også etter den første tiden i sjøen.

Potensielt kan akkumulerte partikler i RAS påvirke fiskehelse og velferd negativt både indirekte og direkte. Noen av de indirekte effektene (bl.a. økt tilgang på substrat for mikroorganismer) er beskrevet i foregående kapittel. I tillegg kan en forhøyet mengde partikulært organisk materiale (POM) føre til økt absorpsjon og spredning av lys i vann. Dette kan redusere synligheten av føret og føre til økt konkurranse om føret, siden Atlantisk laks er en visuell predator. Det er videre funnet at særlig små partikler (5-10 μm) kan skade gjellevev (Au m.fl. 2004, Humborstad m.fl. 2006, Bilotta and Brazier 2008, Wong m.fl. 2013), inducere stressresponser og lede til atferdsendringer hos flere fiskearter (Sutherland m.fl. 2008, Awata m.fl. 2001, Robertson m.fl. 2007). Likevel finnes det lite kunnskap om hvordan partikler i RAS påvirker atlantisk laks over lengre tid og i ulike livsstadier. I tillegg er det etter vår kjentskap ikke tidligere undersøkt om partikkelnivå i RAS påvirker smoltifiseringsprosessen. I det følgende presenteres og diskuteres overordnede funn. Flere detaljer om effekter av TSS på smoltifisering finnes i masteroppgaven til Leif Refsnes Bø ([Bø, L.R. 2023](#)) og samtlige resultater fra arbeidspakken vil etter hvert publiseres i en vitenskapelig artikkel.

4.2.1. Kartlegge effekter av høy organisk-/partikkelbelastning i RAS; før, under og etter smoltifisering på fiskehelse, velferd og prestasjon, også etter sjø utsett

Ved forsøksstart (dag 0) hadde forsøksfisken en gjennomsnittsvekt på $\sim 39,5$ g (Tabell 1). Etter ca. 5 uker, ved overgang fra vintersignal til 24 timers lys, ble alle fiskenes lengde og vekt målt. Ved dette tidspunktet (dag 37) viste målingene ingen signifikant forskjell verken i kroppsvekt, spesifikk vekstrate eller kondisjonsfaktor mellom lav TSS (LTSS) og høy TSS (HTSS) (Figur 13). Før overføring til brakkvann (dag 72) var det ingen signifikant forskjell i kondisjonsfaktor mellom LTSS og HTSS, men sammenliknet med dag 37 var den lavere i begge gruppene (Figur 13). Den observerte nedgangen i kondisjonsfaktor er typisk ved smoltifisering, ettersom laksens kroppsform endres fra en kompakt parr til en slankere, mer strømlinjeformet smolt. I siste delen av FV fasen (fra dag 37 til dag 71) hadde fisk fra HTSS signifikant lavere SGR enn fisk fra LTSS, og ved sluttet av brakkvanns- og RAS-fasen (dag 120) hadde fisk fra HTSS både redusert SGR, kondisjonsfaktor og vekt (Tabell 1). Ved overføring til sjø var gjennomsnittsvekt av fisk fra LTSS $247,5 \pm 50,9$ g, mens fisk fra HTSS veide $223,8 \pm 49,2$. For å sette dette i kontekst så ville det tatt 10 ekstra dager i RAS for HTSS fisk at oppnå samme vekt som LTSS fisken. I både ferskvanns- og brakkvannsfasen var fôrintaket likt mellom gruppene, men den reduserte veksten hos fisk i HTSS førte til numerisk (men ikke statistisk signifikant) høyere fôrfaktor hos den gruppen, sammenliknet med LTSS (Tabell 1). Dette indikerer at forhøyet TSS over tid har en metabolsk kostnad, muligens forårsaket av økt aktivitet og/eller konkurranse for å finne fôr, eller en intern metabolsk kostnad for å opprettholde fysiologiske kompensasjonsmekanismer, som går ut over fôrfordøyelse og vekst. Sannsynligvis er det en kombinasjon av disse faktorene som fører til at fisk som utsettes for svingninger i eller forhøyet TSS-nivåer over tid, har en lavere prestasjon i forhold til fôrintak. Under suboptimale forhold kan ofte spredningen i fiskestørrelsen øke (Rosengren m.fl. 2017), men dette ble ikke observert i forsøket

(appendiks tabell A1). Etter RAS-fasen ble fisken fra begge behandlingene overført og blandet i tre større kar med gjennomstrømmende sjøvann for å simulere forhold i sjøanlegg. I sjøvannsfasen ble det observert en kompensatorisk vekst hos fisk fra HTSS som hadde en signifikant høyere SGR i hele fasen (Figur 13), og etter 3 måneder i sjø var det ikke lenger signifikante forskjeller i gjennomsnittlig vekt mellom fiskene som kom fra LTSS RAS og HTSS RAS.

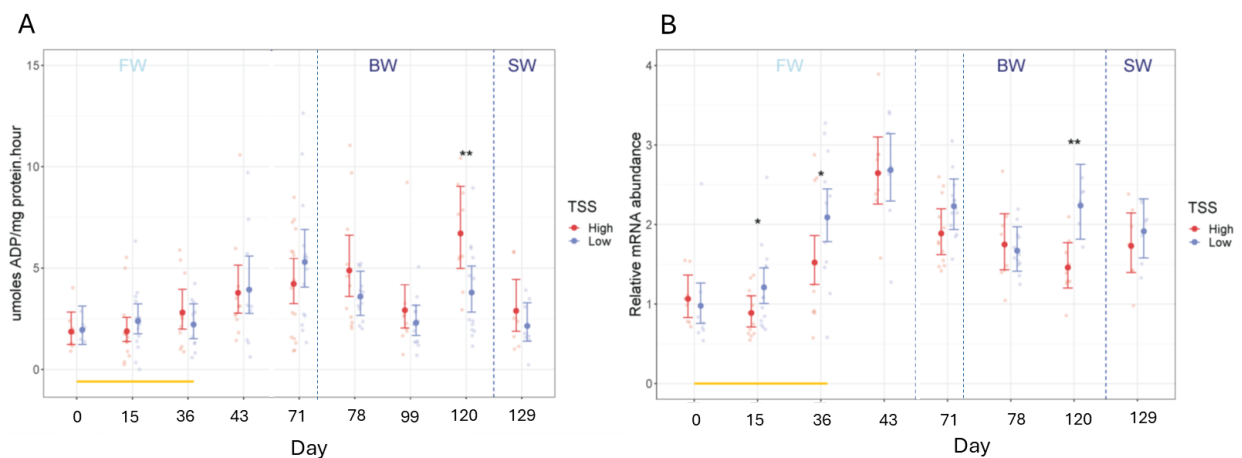


Figur 13: A) Spesifikk vekst rate (% daglig vekst) og B) kondisjonsfaktor hos Atlantisk laks eksponert for lav TSS (LTSS) (blå farge) og høy TSS (HTSS) (rød farge) i RAS, i ferskvannsfase (FW) og brakkvannsfase BW, stiplet linje markerer endring i salinitet. Fra dag 129 til dag 225 var fisk fra begge gruppene blandet i sjøvannskar med gjennomstrømming. Gul linje viser vintersignal med en fotoperiode på L12:D12. Data fra hver prøvetakingsdag er presentert som gjennomsnitt $\pm$ 95 % konfidensintervall. Stjerner indikerer signifikante forskjeller mellom behandlingsgruppene; *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. Figur fra Refsnes Bø, masteroppgave 2023.

I RAS er forekomst av kjønnsmodne postsmolt-hanner en økende bekymring. Det er flere eksterne faktorer som leder til tidlig kjønnsmodning, men forhøyet vanntemperatur og lange fotoperioder er fremhevet som viktige bidragende faktorer (Ytrestøyl m.fl. 2023). Blant andre negative effekter er tidlig modning assosiert med redusert vekst og osmoregulatorisk kapasitet i sjøvann (Martinez m.fl. 2023). En gonadosomatisk indeks (GSI) over 0,06 % er en indikasjon på at hannene er pubertale og vil ende opp som kjønnsmodne postsmolt (Schultz m.fl. 2006). Pubertale hanner er vanligvis større enn umodne hanner og har også lavere gjelle Na^+/K^+ -ATPase (NKA) enzymaktivitet ved slutten av smoltvinduet (Fraser m.fl. 2006). I MikroRAS forsøket ble pubertale hanner observert fra dag 0 og påfølgende prøveuttak (appendiks tabell A2). Blant alle prøvetatte fisk i RAS fasen var prosentandelen av hanner som var pubertale relativt lik mellom LTSS og HTSS, henholdsvis 57 % og 56 %, og ingen korrelasjon mellom TSS-behandling og GSI ble funnet (appendiks tabell A2). Ytelsesparametrene (SGR, kondisjonsfaktor og FCR) er basert på individmålinger av levende fisk ved forskjellige tidspunkt og GSI kunne derfor ikke bestemmes. Siden prosentvist antall pubertale fisk var lik i begge TSS-gruppene, antas dette å ha gitt likt utslag på vekst i begge gruppene. For parametre relatert til smoltifisering (NKA-aktivitet og genuttrykk) og osmoregulatorisk kapasitet (plasma-natrium og -klorid) ble det besluttet å fjerne resultat fra modne hanner fra analysen for å unngå variasjon som var relatert til kjønnsmodning (mer i Bø Refsnes 2023).

Under smoltifiseringen endres laksens gjeller som en forberedelse til et liv i sjøvann og gjellene går fra et organ som tar opp salter til et som skiller ut salter. Ionetransport-pumpen Na^+/K^+ -ATPase (NKA) er viktig for slikt opptak og utskillelse av ioner. Under smoltifiseringen øker denne aktiviteten, og i tillegg skifter den hovedisoform fra NKA- $\alpha 1a$ isoformen, som driver opptak av ioner i ferskvann, til NKA- $\alpha 1b$ isoformen som skiller ut ioner i sjøvann (Nilsen m.fl. 2007). Det er også sett at genuttrykk av $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ co-transporter (NKCC) øker samtidig som NKA- $\alpha 1b$. Samlet sett er endringene i NKA-aktivitet, genuttrykket

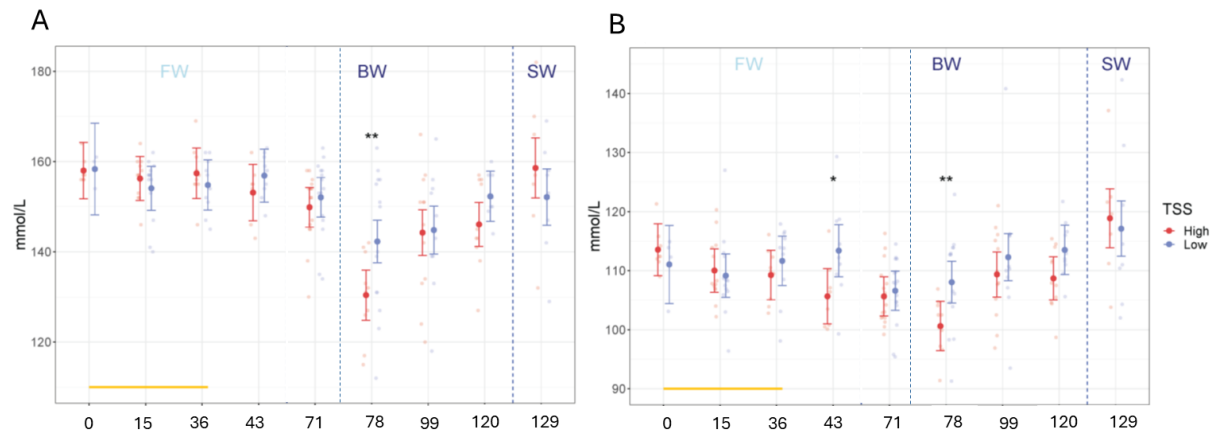
av begge NKA α isoformene og NKCC-1a vanlige biomarkører for å følge smoltutviklingen (Pino Martinez m.fl. 2021). I forsøket var utvikling av NKA-aktivitet i gjellene under smoltifisering som forventet i forhold til tidligere studier (Handeland m.fl. 2003; Pino Martinez m.fl. 2021; Stefansson m.fl. 2011). Før og under smoltifiseringen, var det ingen signifikant forskjell i NKA-aktivitet mellom TSS-gruppene, men fisk i LTSS nådde toppaktivitet ved dag 71 (5,1 mol ADP/mg protein/t), mens toppaktiviteten for HTSS fisk inntraff først ved dag 78 (4,9 mol ADP/mg protein/t). Genuttrykket av nka1a-, nka1b- og nkcc1a-isoformene fulgte stort sett forventede uttrykksmønstre under smoltifiseringen (Pino Martinez m.fl. 2021). Imidlertid var genuttrykket av sjøvannsformen (NKA- α 1b) i gjellene signifikant lavere både på dag 15 og dag 36 hos fisk fra HTSS sammenliknet med LTSS, som indikerer en forsinket respons. Samlet sett indikerer resultatene at økt TSS belastning ikke påvirket sjøvannstoleransen eller fullføring av smoltifiseringen, men påvirket tidslinjen for smoltifisering. For øvrig var NKA-aktiviteten (Figur 14) høyere i gjellene hos fisk i HTSS sammenliknet med fisk i LTSS ved slutten av RAS-fasen (dag 120), og denne økningen sammenfaller med en topp i TSS (Figur 5). En oppregulering av ionepumpens kapasitet kan være en kortsiktig kompenserende mekanisme for osmoregulatoriske utfordringer forårsaket av økt partikkelmengde.



*Figur 14: A) Gjelle-Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) aktivitet og B) relativt genuttrykk av NKA- α 1b hos Atlantisk laks eksponert for lav TSS (LTSS) (blå farge) og høy TSS (HTSS) (rød farge) i RAS, i ferskvannsfasen (FW) og brakkvannsfasen (BW). Gul linje viser vintersignal med en fotoperiode på L12:D12. Data fra hver prøvetakingsdag er presentert som gjennomsnitt $\pm$ 95 % konfidensintervallet. Den stiplede linjen indikerer endring fra ferskvann (FW) RAS til brakkvann (BW) RAS. Stjerner indikerer signifikante forskjeller mellom behandlingsgruppene; *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. Figur fra Refsnes Bø, masteroppgave 2023.*

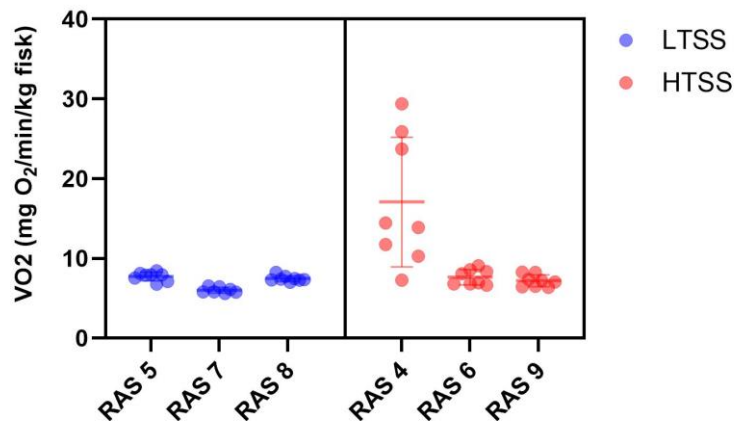
Eksterne morfologiske velferdsindikatorer ble undersøkt ved hvert uttak, i henhold til LAKSVEL skåringssystem, og generelt var det få og milde avvik som ble avdekket. De vanligste skadene var finneskader, skjelltap og katarakt. Forekomsten av disse skadene endret seg med tid i forsøket, f.eks. var skader på finner mer vanlig i parr-fasen, mens katarakt kun ble observert i sjøvannsfasen. Vi fant ingen signifikant effekt av TSS på målte eksterne velferdsindikatorer, med unntak av katarakt. Det var en økt hyppighet av katarakt etter transport og i hele sjøfasen hos fisk fra HTSS, men nivået var kun signifikant høyere ved forsøksslutt (dag 225, resultat ikke vist). I RAS-fasen var det kun noen små forskjeller i plasmaverdier av natrium og klorid mellom LTSS og HTSS, men alle målinger var innenfor normale verdier og ingen vedvarende trender ble registrert (Figur 15). Vi så heller ingen effekt av TSS på hematokrit, plasma kortisol eller kortisol utskilt til vannet i løpet av RAS-fasen (resultat ikke vist). Måling av oksygenforbruket (VO_2) var kun mulig å måle i en begrenset tid da dette krevde stengt vannsirkulasjonen i RAS karene. Derfor ble dette utført en gang i timen i tiden fisken ble føret (7 timer) i løpet av en dag mot

sluttet av RAS-fasen, da biomassen var som høyest. Det var ingen tydelig variasjon i VO_2 med tid på dagen i noen av RAS karene.



Figur 15: A) Plasma natrium (mmol/l) og B) plasma klorid (mmol/l) hos Atlantisk laks eksponert for lav TSS (LTSS) (blå farge) og høy TSS (HTSS) (rød farge) i RAS, i ferskvannsfasen (FW) og brakkvannsfasen (BW). Gul linje viser vintersignal med en fotoperiode på L12:D12. Data fra hver prøvetakingsdag er presentert som gjennomsnitt $\pm$ 95 % konfidensintervallet. Den stiplede linjen indikerer endring fra ferskvann (FW) RAS til brakkvann (BW) RAS. Stjerner indikerer signifikante forskjeller mellom behandlingsgruppene; *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. Figur fra Refsnes Bø, masteroppgave 2023.

Sammenlagt så var det gjennomsnittlige oksygenforbruket (VO_2) høyere (men ikke statistisk signifikant) i HTSS karene ($10,7 \pm 6,5$ mg O_2 /min/kg) sammenlignet med LTSS karene ($7,1 \pm 0,9$ mg O_2 /min/kg), men i hovedsak det var særlig et HTSS kar som hadde stor variasjon i VO_2 den målte dagen (Figur 16). Hvis målingene kunne vært gjort over lengre tid uten å forstyrre karmiljøet, ville vi sannsynligvis observert en økt VO_2 som er knyttet til høyere energiforbruk.



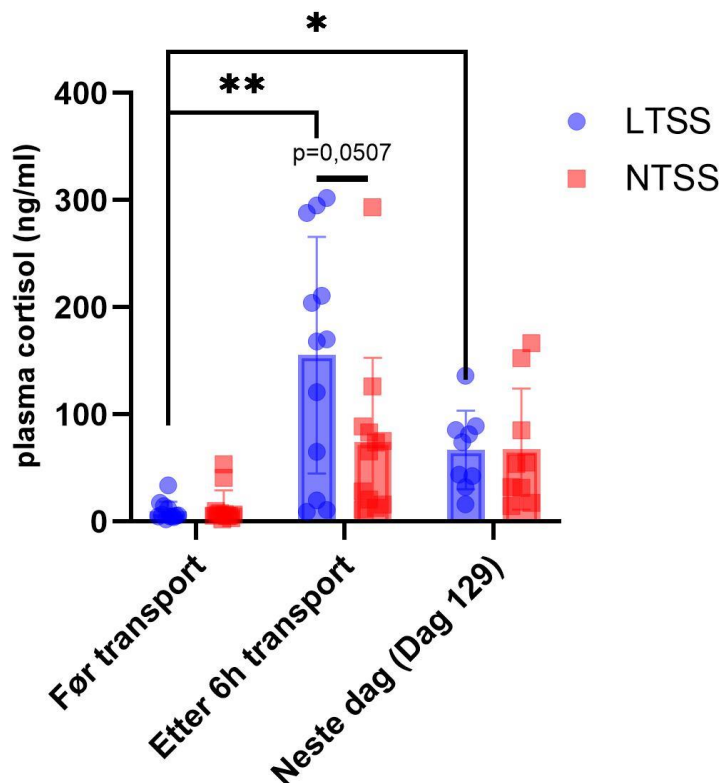
Figur 16. Beregnet oksygenforbruk (VO_2) i RAS ved lav TSS (LTSS) (blå farge) og høy TSS (HTSS) (rød farge) målt hver time under fôringsperioden (7 timer) den 5.des 2022 (slutten av postsmoltfasen i RAS). Data er gitt som gjennomsnitt $\pm$ SD.

Simulert transport og utsett i sjø

I forbindelse med overføring av fisken fra RAS til gjennomstrømskar med sjøvann (simulert utsett til sjøanlegg) ble det gjennomført en simulert sjøvannstransport på 6 timer. Dette ble gjort ved å overføre all fisk fra de tre RAS med LTSS til to lukkede 600 liters kar med sjøvann og utluftning, og tilsvarende for HTSS. Før den simulerte sjøvannstransporten var det ingen signifikant forskjell i blodparametere mellom

LTSS og HTSS, og disse var innenfor normalverdier. Direkte etter transporten hadde fisk fra LTSS høyere verdier av plasmakortisol, natrium og klorid, sammenliknet med før transporten. En signifikant økning i disse parameterne, som er en normal del av stressresponsen, ble ikke observert hos HTSS-fisken (Figur 17). I tillegg var det en trend til økt utskillelsesrate av kortisol og CO₂ til vannet hos fisk fra LTSS, sammenliknet med HTSS (resultat ikke vist). Øvrige vannkvalitetsparametere var for øvrig tilnærmet like i LTSS og HTSS (resultat ikke vist). Neste dag (dag 129), var det en tydelig (men ikke-signifikant) nedgang i plasmakortisol hos de fleste fiskene i LTSS, som indikerer restitusjon, mens hos HTSS fisken var det ingen merkbar forskjell sammenlikne med direkte etter, og selv etter 12 timer (Figur 17). Imidlertid var dette første dagen i fullt sjøvann og nye kar, og foruten plasmakortisol var natrium, klorid og hematokrit verdiene forhøyede hos mesteparten av fisken i begge behandlingene (Figur 17).

Totalt sett viste LTSS-gruppen høyere stressrespons, men også en bedre restitusjon etter den simulerte transporten, noe som anses som adaptivt for akutte stressituasjoner. Den lavere stressresponsen, større variasjon i kortisolnivået målt før og rett etter transport i HTSS-fisken og manglende nedgang i kortisol til neste dag (dag 129), indikerer begrensede ressurser til å oppregulere og opprettholde normale fysiologiske stressmestringsmekanismer og en allostatisk overbelastning (Höglund m.fl. 2023). I dette tilfellet var overlevelsen god også hos HTSS-fisken og det ble observert kompenserende vekst i sjøfasen. Hvis transporten hadde vært mer stressende eller hvis fisken hadde opplevd ekstra stressfaktorer den første perioden i sjø (f.eks. algeoppblomstring), ville de kanskje ikke ha prestert like bra. Imidlertid, må det tas i betraktning at det var noe høyere fisketetthet pga. høyer gjennomsnittsvekt i LTSS-transporten (94 kg/m³), sammenliknet med HTSS-transporten (86 kg/m³). Det kan derfor ikke utelukkes at LTSS-fisken opplevde den simulerte transporten som mer stressende.



Figur 17. Postsmolt som har gått i RAS i 128 dager under lav TSS (LTSS) (blå søyler) eller høy TSS (HTSS) (røde søyler) ble utsatt for en simulert lukket sjøvannstransport. Plasma kortisol nivåer (ng/ml) ble analysert før, rett etter og dagen etter transporten. Data er gitt som gjennomsnitt ± SD og stjerner indikerer signifikante forskjeller mellom behandlingsgruppene eller tidspunkt; ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Konklusjon: Partikkelnivåer som er vanlig å finne i kommersielle RAS har en negativ effekt på fiskens prestasjon, og det ville tatt fisken i HTSS 10 ekstra dager i RAS for at oppnå samme sluttvekt som fisk i LTSS. Samlet sett oppnådde fisken sjøvannstoleranse i begge TSS-gruppene og hadde en normal smoltutvikling, men det var en forsinkelse hos NTSS fisk. Redusert førfaktor og fysiologisk respons til transportstress, kan indikere at høy TSS over tid koster fisken energi, men kompensatorisk vekst i sjøfasen, indikerer at nivåene/forholdene som ble testet, er innenfor fiskens rom for tilpasning. Imidlertid er det uklart hvordan fisk i høy TSS hadde håndtert suboptimale forhold den første tiden etter utsett i sjø, og evt. ytterligere utfordringer slik som f.eks. algeoppblomstringer, dette trenger videre utredning.

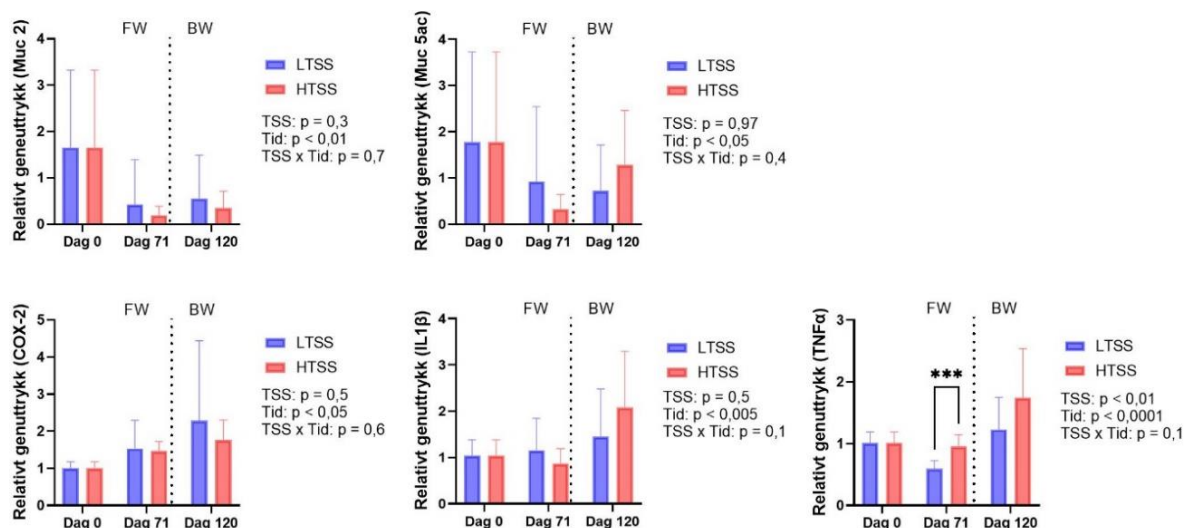
4.2.2. Kartlegge effekter av høy organisk-/partikkelbelastning i RAS- på det mukosale epitelet av gjeller og skinn

Tidligere studier har vist at under produksjon i RAS er det en økning i gjellebetennelse over tid, og det antydtes at dette kan skyldes en økning i organisk belastning og/eller økte bakteriell aktivitet (Otnes 2020). Patologiene observert i Otnes (2020) var milde, men uttalte. Dette er i motsetning til tidligere arbeid med regnbueørret der en høy partikkelbelastning ikke hadde en merkbar effekt på gjellehelsen (Becke m.fl. 2017). Derfor var et av delmålet i MikroRAS å få en dypere forståelse av hvordan TSS, organisk belastning og bakteriell aktivitet påvirker gjelle- og hudhelsen til atlantisk laks i RAS. Dette ble utført gjennom histopatologiske undersøkelser (Otnes 2020) og qPCR-analyse av genmarkører (mucin-lignende 2 og -5ac, Cox-2, IL1 β , TNF α) for stress og inflammatorisk responser i epitelvev hos fisk (Otnes 2020, Svenn m.fl. 2016, Lu m.fl. 2018). Dette ble evaluert både under ferskvanns- og brakkvannsfasene i RAS. Histopatologi ble også vurdert i sjøfasen, for å se om effekter observert i RAS-fasen ble opprettholdt etter overføring til sjø (seineffekter).

Gjeller

Vurdering av gjellehistologi i ferskvanns- og brakkvannsfasen i RAS viste generelt lav forekomst av de fleste lesjonstyper. Den observerte utviklingen av lesjoner (lammellfortykning, inflammasjon og sammenvoksing/adhesjon av lamellspissene) over tid i RAS var i samsvar med tidligere studier (Otnes 2020 og Parker 2022). Multicellularitet av lamellene var en ny observasjon som bare var tydelig på slutten av brakkvannsfasen (dag 120), dette var også den eneste lesjonstypen som var signifikant høyere hos fisk eksponert for HTSS i RAS (resultat ikke vist). Etter 3 måneder i sjøvann, beskrives de analyserte gjellene fra begge TSS-gruppene som friske med smale lameller uten betennelse i epitelet.

Sammenlignet med fisk fra kontrollgruppen (dag 0) før ulik partikkelbelastning ble innført, var det en reduksjon i relativt genuttrykk av mucin-lignende gener (*Muc 2* og *Muc 5ac*) på slutten av ferskvannsfasen (dag 120), men det var ingen effekt av ulik partikkelbelastning (Figur 18). Ved slutten av ferskvannsfasen var smoltifiseringen stort sett gjennomført (se kapittel 4.2.1). Det er kjent at antall slimceller minsker under smoltifisering (O'Byrne-Ring m.fl. 2003), og det er mulig at dette er koblet til en reduksjon i hormonet prolaktin som induserer mukuscelleproliferasjon (Prunet m.fl. 1989). Dette kan forklare det reduserte uttrykket av disse genene i gjellene hos smolt (dag 71) og postsmolt (dag 120), sammenlignet med parr som ble prøvetatt på dag 0. I tråd med resultater fra de histologiske undersøkelsene økte genuttrykket involvert i inflammatoriske responser (COX-2, ILB og TNF α) i gjellene med produksjonstid i RAS, i både LTSS og HTSS (Figur 18). Det var en tendens til økt uttrykk av både TNF α og IL1 β i HTSS, sammenlignet med LTSS både på dag 71 og 120, men bare signifikante forskjeller mellom LTSS og HTSS ble bare observert for TNFa på dag 71 (Figur 18).

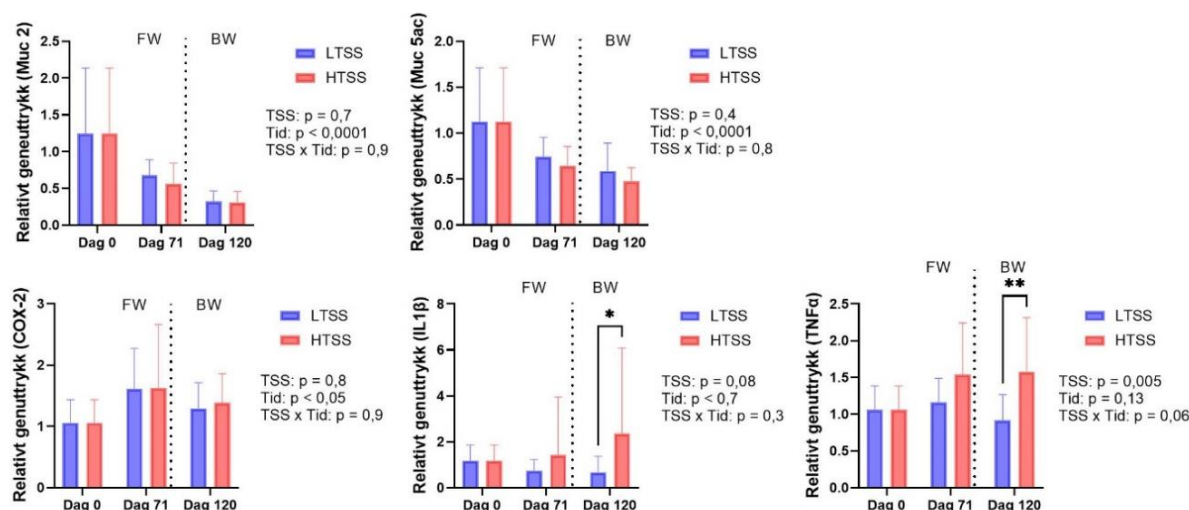


Figur 18. Relativt (til kontrollgruppen dag 0) genuttrykk i gjellene av *Muc 2*, *Muc 5ac*, *COX-2*, *IL1β* og *TNF1α* i til atlantisk laks eksponert for lav (LTSS) (blå søyler) og høy TSS (HTSS) (røde søyler) etter 71 og 120 dager i RAS. Relativt uttrykk hver prøvetakingsdag er presenter som estimert gjennomsnitt $\pm$ SD. Den stiplede linjen indikerer endring fra ferskvann (FW) RAS til brakkevann (BW). Stjerner indikerer signifikante forskjeller mellom behandlingsgruppene; *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Skin

For å forstå hvordan partikkelbelastning i RAS påvirker den epiteliale overflaten av huden, ble prøver samlet inn på dag 0 (før behandling) og etter 36, 71, 120 dager i RAS, samt 197 dager etter overføring til sjøvann. Skinnbiopsier ble kvalitativt vurdert med hensyn til epitelets integritet og tilstedeværelse, utseende og struktur av skjellommer, slimceller og basalceller (resultat ikke vist). I tillegg ble en kvantitativ vurdering av tykkelsen på de ytterste epiteliale lagene av huden og den relative mengden av slimceller (celler per μm av epitel) utført på dag 0 og dag 120 i RAS, for å se på mulige langtidsvirkninger av partikkelbelastningen. Det ble ikke observert kvalitative forskjeller med hensyn til utseendet på hudepitelet mellom fisk oppdrettet i LTSS eller HTSS. Enkelte synlige forskjeller, som økningen i antall slimceller på dag 36 sammenlignet med andre tidspunkter, kunne tilskrives livsstadiet (start av smoltifisering) eller den fysiologiske tilstanden til fisken snarere enn partikkelbelastningen. Det var ingen indikasjoner på økte inflammatoriske responser, cellenekroser eller -apoptose mellom LTSS og HTSS.

Data fra qPCR analysene viser at det relative genuttrykket (i forhold til kontrollgruppen) av mucin-lignende gener, *muc 2* og *muc 5ac*, reduseres over tid i RAS, men det var ingen forskjell mellom LTSS og HTSS (Figur 19). Dette samsvarer med responsen i gjellene, og som forklart for gjellene er reduksjonen i mucin-gener i skinnen på dag 120 sannsynligvis relatert til en nedgang i prolaktin under smoltifiseringen. Den fortsatte reduksjonen i genuttrykk under postsmoltstadiet (dag 120) kan reflektere den økte saliniteten, siden det er kjent at mengden slimceller i epiteloverflater hos fisk reduseres med økt salinitet (Shephard 1994). I motsetning til de histologiske observasjonene, ble inflammatoriske responser i skinnen detektert gjennom økt relativt uttrykk av både *IL1β* og *TNF1α*, hos fisk i HTSS sammenlignet med LTSS ved slutten av RAS-fasen (dag 120, Figur 19). Denne trenden var også tydelig ved slutten av ferskvannsfasen (dag 71), men ikke signifikant. Derfor spekuleres det at genuttrykket av inflammatoriske gener kan være et tidlig varsel, og dersom produksjonstiden i RAS hadde vært lengre, ville dette trolig resultert i betennelse og patologier hos fisk eksponert for en høy TSS.



Figur 19. Relativt (til kontrollgruppen dag 0) genuttrykk av Muc 2, Muc 5ac, COX-2, IL1β og TNF1α i skinn hos atlantisk laks eksponert for lav (LTSS) (blå søyler) og høy TSS (HTSS) (røde søyler) i 71 og 120 dager i RAS. Relativt uttrykk hver prøvetakingsdag er presentert som estimert gjennomsnitt $\pm$ SD. Den stiplede linjen indikerer endring fra ferskvann (FW) til brakkvann (BW) RAS. Stjerner indikerer signifikante forskjeller mellom behandlingsgruppene; *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Konklusjon: Histologiske undersøkelser av gjeller og skinn avslørte få forskjeller relatert til partikkelbelastning, og endringer i gjellepatologier hos fisk fra LTSS og NTSS over tid i RAS, er i samsvar med andre studier (Otnes 2020, Parker 2022). Imidlertid indikerer genuttryksdata en økning i inflammatoriske responser i både gjeller og skinn ved forhøyet TSS, og sammen med den økte multicellulariteten i gjellene kan dette være et tidlig varsel på en forverring av helsestatus. Basert på dette spekuleres det at dersom produksjonstiden i RAS hadde vært lengre i forsøket, hadde negative effekter på hud- og gjellehelse hos HTSS gruppen blitt mer fremtredende. Funnen trenger videre utforskning og vil publiseres vitenskapelige.

4.3 Effekt av smoltifisering og økende salinitet på laksens tarm-, skinn-, og gjellemikrobiomer ved lav og høy partikkelbelastning (AP 1)

Dette arbeidet har hatt som mål å svare ut delmål nummer 1: Karakterisere effekten av smoltifisering og økende salinitet på laksens feces-, skinn- og gjellemikrobiomer ved høy og lav partikkelbelastning.

Vi karakteriserte sammensetningen av laksens tarm-, skinn- og gjelle-mikrobiomer på dag 15, 71, 78, 120 fra RAS, samt dag 176 og 225 etter overgang til gjennomstrømmende sjøvann. Vi valgte ut to individer fra hvert RAS-kar ved hvert prøvetidspunkt, og analyserte alle de tre prøvetypene (tarm, skinn og gjeller). Til tross for at amplifiseringen av markørgenet 16S rRNA så ut til å være vellykket for mange av prøvene, var det dessverre variabel kvalitet på de resulterende sekvenseringsdataene. De inneholdt en høy andel PCR-chimera sekvenser som måtte filtreres bort, og etter prosessering og kvalitetsfiltrering, inneholdt det endelige datasettet lite sekvenseringsdata og få forskjellige sekvensvarianter for hver av prøvene. Det var dermed klart at våre data ikke reflekterte det reelle tarmmikrobiomet. Dette gjaldt generelt for alle prøvetypene, men for skinnprøvene i ferskvannsfasen og (enkelte tarmprøver) var det noe bedre kvalitet på dataene. Vi antar at mye vev fra fisken skapte problemer i DNA ekstraksjonen og den etterfølgende PCR

amplifikasjonen. Mange faktorer kan ha medvirket til problemene, men mye proteiner og fett i fiskevevet kan ha redusert kvaliteten på DNA-ekstraktene, og PCR-inhibitorer og mye verts-DNA kan ha medvirket til dårlig kvalitet på PCR-produktene.

Metagenomikk-sekvensering av tarmprøvene ga data som var dominert av fiskens DNA, noe som gjorde analyse av bakterienes genomer vanskelig. Dette har også vært et problem for andre forskningsgrupper som har arbeidet med metagenomikk på prøver fra laks, men var ennå ikke beskrevet da vi planla dette prosjektet. Tarmprøvene i MikroRAS ble samlet ved å presse ut innholdet i laksens baktarm, og selv om dette ble gjort relativt forsiktig, og prøvene ikke inneholdt synlig blod eller vev fra tarmen, kan mucus og epitelceller ha løsnet under prøvetagningen. Det er også mulig at tarminnhold fra laks generelt inneholder mye verts-DNA som stammer fra mucus som skilles ut i tarmen. Fremtidige studier bør undersøke andre metoder for prøvetakning eller fjerning av fiskens DNA før sekvensering i forbindelse med slike metagenomikk-analyser.

Begge disse sekvenseringsdatasettene fra fiskeprøvene ga dermed en dårlig representasjon av fiskens mikrobiomer og egnet seg dårlig til å svare på forskningsspørsmålene i AP 1. Vi gir likevel en oversikt over resultatene så godt det lar seg gjøre.

Ett av delmålene i AP 1 var å undersøke om økt partikkelbelastning påvirket fiskens mikrobiomer.

- Undersøke i hvilken grad partikkelbelastning i RAS medvirker til endringer i fiskens mikrobiomer gjennom disse fasene (sammensetning, diversitet og funksjonelt potensial)

De eneste prøvene som var av en slik kvalitet at dette spørsmålet lot seg undersøke, var skinnprøvene i ferskvannsfasen. Her fant vi ingen effekt av partikkelbelastning, verken når det gjelder diversitet eller sammensetning av samfunnene (PERMANOVA, $p = 0.13$). Dette samsvarer med de andre analysene i ferskvannsfasen: I denne perioden hadde partikkelbelastningen heller ingen virkning på mikrobiota i vann og biofilter (se pkt. 4.1). Videre viste også velferdsundersøkelsene liten effekt av økt partikkelbelastning på skinn- og gjellehelse i denne perioden (Kap. 4.2.1).

De to andre delmålene omhandlet endringer i fiskens mikrobiomer over tid, med fokus på potensielle effekter av økt salinitet, smoltifisering og overføring til sjø:

- Kartlegge endringer i sammensetning, diversitet og funksjonelt potensial som konsekvens av smoltifisering og økt salinitet i RAS
- Evaluere betydning av overførsel til sjø (sult, håndtering, økt salinitet) for fiskens mikrobiomer (sammensetning, diversitet og funksjonelt potensial)

Kvaliteten på sekvenseringsdataene gjør at det dessverre ikke var mulig å få pålitelige svar på disse forskningsspørsmålene. I fremtidige liknende studier bør det legges vekt på å sikre at prøvematerialet er egnet for denne typen analyser. Det vil spesielt innebære å minimere mengden fiskevev og maksimere mengde mukosalt overflatevev for skinn og gjelleprøver. For tarmprøver bør mengde prøvemateriale og homogeniseringsprotokoll optimaliseres. Vi presenterer derfor her sammensetningen av fiskemikrobiomene på et mer overordnet nivå (Figur 20). Disse resultatene viser at tarmmikrobiotaen skiller seg fra skinn- og gjellemikrobiota ved at den inneholder flere anaerobe bakteriegrupper fra slekten *Clostridium*. Det var også høyere forekomst av anaerobe melkesyrebakterier, fra slektene *Loigolactobacillus* og *Weissella*. Dette er forventet, siden det er anaerobe betingelser i tarmen, og det samsvarer med tidligere studier av laksens tarmmikrobiom. Skinnprøver, særlig i ferskvann og begynnelsen av brakkvannsfasen, hadde høy forekomst av *Pseudomonas*. Dette er noe som er observert tidligere (Giusi mfl. 2017). *Pseudomonas* er en slekt som inneholder flere sykdomsfremkallende bakterier, og høye forekomster av *Pseudomonas* antas ofte å være et uttrykk for suboptimale mikrobielle betingelser

(Godoy m.fl. 2024), men det trengs mer forskning for å fastslå om *Pseudomonas* også er en del av den naturlige skinnmikrobiotaen hos frisk laks. Gjellemikrobiota var mest variabel, men hadde særlig høy forekomst av slekten *Brevundimonas*. Denne bakterieslekta har stor utbredelse og forekommer i mange miljø (Liu m.fl. 2021), men har ikke vært spesielt forbundet med gjellemikrobiomer tidligere. Vi kan derfor ikke utelukke at denne observasjonen representerer støy i datasettet.

Skind						Gjeller						Tarm						
D15	D71	D78	D120	D176	D225	D15	D71	D78	D120	D176	D225	D15	D71	D78	D120	D176	D225	
88.87	88.84	83.18	4.26	7.02	55.26	21.47	19.48	23.02	6.39	40.71	31.93	5.89	6.98	2.85	3.92	5.65	15.07	<i>Gammaproteobacteria</i>
3.62	4	4.74	26.85	35.71	2.28	7.16	13.85	0	15.52	8.19	21.89	47.7	43.2	48.94	25.03	37.35	52.76	<i>Bacilli</i>
0.33	0.06	4.52	58.4	42.31	7.08	6.76	0.1	8.82	34.96	5.78	8.58	21.86	24.52	31.27	22.1	24.21	7.66	<i>Actinobacteria</i>
7.13	6.98	7.26	7	9.93	29.6	18.8	25.07	14.51	35.52	30.12	24.4	12.49	14.59	9.05	23.45	9.58	8.15	<i>Alphaproteobacteria</i>
0	0.01	0.01	0.3	0.46	1.45	39.31	32.92	53.66	7.42	15.21	3.43	0.64	0.08	0.7	1.37	3.86	0	<i>Bacteroidia</i>
0	0	0.26	3.16	1.76	0	0.3	0	0	0	0	0	11.42	4.57	7.19	21.59	18.73	12.92	<i>Clostridia</i>
0	0	0	0	0.81	0	0	0	0	0	0	2.37	0	2.71	0	0	0	2.88	<i>Nitrospiria</i>
0	0	0	0	0.49	0	0	0	0	0	0	7.31	0	0	0	0	0	0	<i>Polyangia</i>
0	0.07	0	0	0.01	0	4.65	0.46	0	0	0	0.07	0	0	0	0	0	0	<i>Verrucomicrobiae</i>
0	0.02	0	0	0.23	3.06	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.35	0	0	<i>Planctomycetes</i>
0	0	0	0	0	0	0.59	2.74	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<i>Fimbriimonadia</i>
0	0	0	0.03	0	0	0	2.35	0	0	0	0	0	0	0	0.19	0.48	0.12	<i>Bdellovibrionia</i>
0	0	0	0	0	0	0	1.27	0	0	0	0	0	0.32	0	0.79	0	0	<i>Anaerolineae</i>
0	0	0	0	0	0	0	0.86	0	0	0	0	0	1.41	0	0	0	0	<i>Acidobacteriae</i>
0	0	0	0	0.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0.71	0	1.2	0	0	<i>Acidimicrobiia</i>
0	0	0	0	0.18	0	0	0	0	0	0	0	0	0.92	0	0	0	0	<i>Gemmatimonadetes</i>
0	0	0	0	0	0	0.88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<i>Hydrogenedentia</i>
0	0	0	0	0	0	0	0.78	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<i>Blastocatellia</i>

Figur 20: Gjennomsnittlig forekomst av de vanligste bakterieklasse i skinn, gjelle og tarmprøver ved hver prøvetakning. Cellene er fargelagt etter prøvetype (skinn = blå, gjeller = rød, tarm = brun).

4.4 Integrere resultater fra AP 1, AP 2 og AP3 for å illustrere sammenhenger mellom laksens mikrobiota, velferd/helse, vannkvalitet, nitrifikasjon og partikkel-assosiert mikrobiota før, under og etter smoltifisering ved lav og høy partikkelbelastning i RAS (AP 4)

Dette arbeidet har hatt som mål å svare ut delmål nummer 4: Integrere resultatene fra delmål 1 – 3 for å kunne å illustrere sammenhenger og gi råd om hvordan kunnskapen kan bidra til produksjon av en mer robust fisk som presterer bedre i sjøfasen.

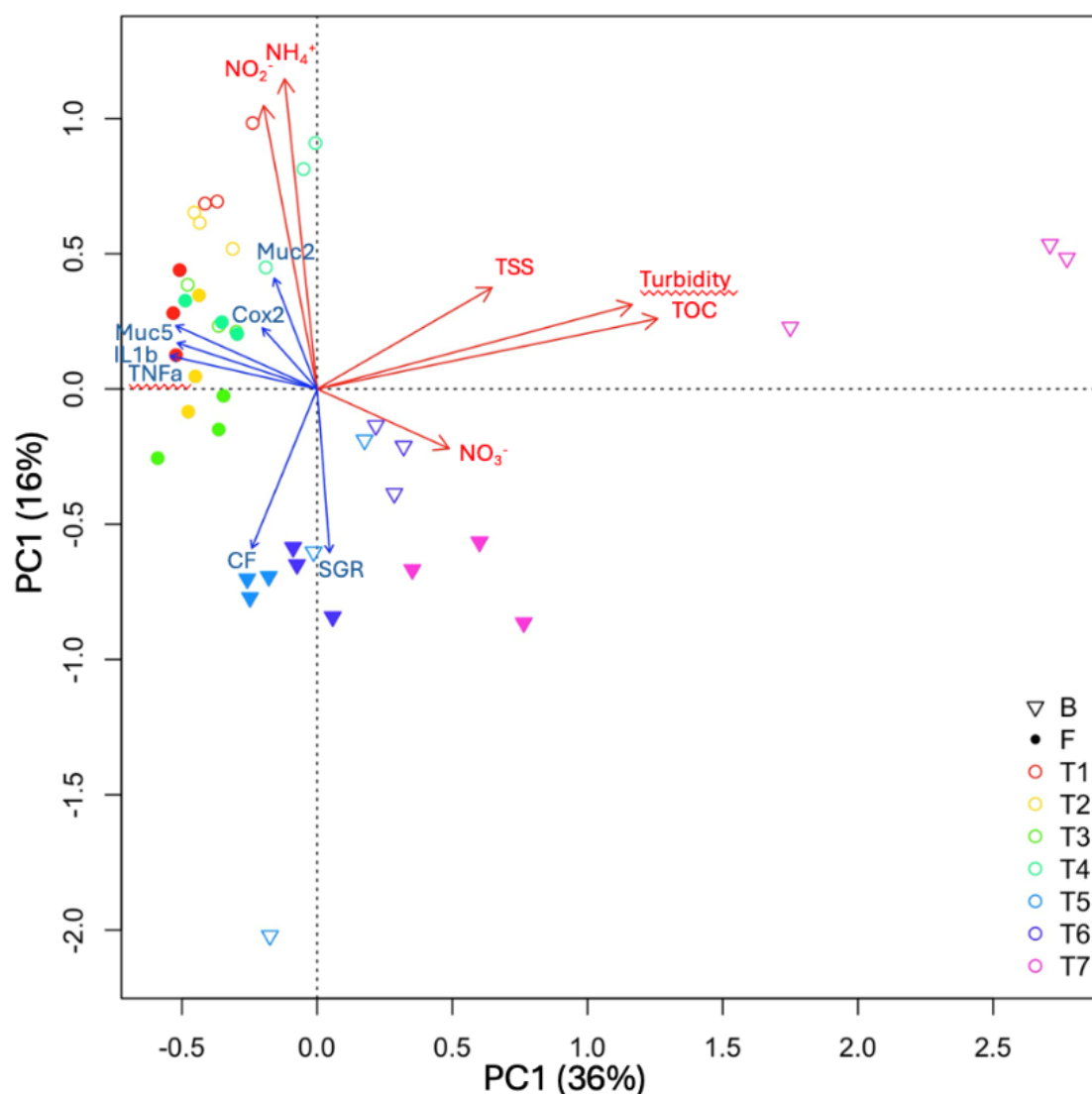
To av aktivitetene i AP4 omhandlet fiskemikrobiota-data fra AP 1:

- Undersøke mulige sammenhenger mellom endringer i skinn- og gjellemikrobiomer og skinn- og gjellehelse
- Analyser av utvikling av laksens mikrobiomer før smoltifisering, gjennom smoltifiseringen og etter smoltifiseringen

På grunn av kvaliteten på dette datasettet (se seksjon 4.3 om AP 1) var det ikke mulig å finne sikre svar på disse forskningsspørsmålene.

4.4.1. Kartlegge samspill mellom mikrobiomer i ulike RAS komponenter (biofilter-biofilm, suspenderte partikler, skinn/gjelle/tarm) gjennom ferskvanns-, smoltifiserings- og brakkvannsfasen

Sammenhenger mellom utvalgte vannparametere og fiskeparametere ble undersøkt ved hjelp av en hovedkomponentanalyse (Figur 21). Dette plottet illustrerer og bekrefter funn beskrevet over (Kap. 4.1 og Kap. 4.2.2). Vi observerte forhøyede verdier av TOC og turbiditet ved HTSS, sammenliknet med LTSS (Tabell 2). I begynnelsen av forsøket ble det observert forhøyede verdier av NH_4^+ og NO_2^- og ved slutten av forsøket ble det observert forhøyede verdier av NO_3^- (Tabell 2). Det var en gradvis endring i vannkjemi gjennom ferskvannsfasen og i brakkvannsfasen ble det observert til dels store variasjoner i vannkjemi mellom triplikate RAS i hver eksperimentell gruppe mot slutten av eksperimentet. Uttrykk av fem gener assosiert med stress- og immunresponser i gjellene ble undersøkt gjennom forsøket (Kap. 4.2.2). Uttrykkene av disse genene var høyere i brakkvannsfasen enn i ferskvannsfasen, uten at det var noen korrelasjoner til TSS (Figur 21). Kondisjonsfaktoren (CF) var omvendt korrelert med TSS. Disse og andre sammenhenger vil bli utforsket og beskrevet i mer detalj i kommende publikasjoner.



Figur 21: Hovedkomponentanalyse (PCA) basert på 35 vannkvalitetsparametere. Røde piler viser ladinger av utvalgte vannkvalitetsparametere. Blå piler viser projeksjoner av utvalgte faktorer til ordineringsplanen. Dette gjelder faktorer som omhandler fisken, men som ikke var en del av grunnlaget for hovedkomponentanalysen. Fylte sirkler: lav TSS / Ferskvann; Fylte trekanter: lav TSS / Ferskvann; Sirkler uten fyll: Høy TSS / Ferskvann; Trekanter uten fyll: Høy TSS / Brakkvann. Fargegradient er knyttet til tidspunkt for prøvetaking (T1 = dag 15, T2 = dag 36, T3 = dag 43, T4 = dag 71, T5 = dag 78, T6 = dag 99 og T7 = dag 120). TOC: Total organisk karbon; IL1b / Muc5 / Muc2 / TNFa / Cox2: Ct verdier av gener involvert i respons i inflammasjon i gjeller (lav Ct verdi korresponderer med høyt genuttrykk); CF: Fultons kondisjonsfaktor; SGR: Spesifikk vekstrate.

4.5 Bruk av resultatene i næringen

De fleste selskapene som produserer laks i RAS, opplever utfordringer med forhøyede partikkelnivå i vannet på tross av utstrakt filtrering. Slike partikler består i stor grad av organisk materiale som tilføres vannet via føret eller fra fiskens avføring. Fra tidligere studier og erfaringer er det kjent at slikt organisk materiale gir grobunn for økt vekst av bakterier (og andre mikroorganismer i biofiltrene eller i vann) og derigjennom produksjon av uheldige metabolitter (f.eks. H_2S og geosmin) som påvirker fisken. Forhøyet TSS og vekst av heterotrofe mikroorganismer i biofiltrene kan påvirke nitrifikasjonen negativt og føre til akkumulering av toksisk NH_3 og NO_2^- . Hvilke andre direkte og indirekte effekter slikt organisk materiale har på fisken er mer usikkert og diskuteres i næringen.

Resultatene fra MikroRAS indikerer at partikkelnivå som er vanlig å finne i kommersielle RAS påvirker fiskens prestasjon i RAS negativt, sannsynligvis gjennom metabolske effekter. Dette betyr konkret at under høy partikkelbelastning vil det ta lengre tid å oppnå ønsket postsmoltvekt, i dette tilfelle var det beregnet en 10 dagers forsinkelse sammenlignet med fisk i lav TSS. Da fisk ble satt ut i sjø med gode forhold, ble en kompensatorisk vekst hos fisk utsatt for høy TSS i RAS fasen observert, og det tok 3 måneder før forskjellene var utjevnet. Resultatene viser også at forhøyet TSS kan forsinke smoltifiseringen, og dermed er det særlig viktig å unngå økt belastning og svingninger i TSS i denne fase. I tillegg vil det økte energiforbruket til kompensatoriske mekanismer gjøre fisken mer sårbar for ytterligere stress.

Mulige tiltak

Denne kunnskapen kan motivere næringen til å redusere tilførselen av organisk materiale til vannet og forbedre partikkelfjerningen, både gjennom optimalisering av egen drift og bidra til metodiske nyvinninger, samt utvikling av utstyr som sikrer bedre partikkelfjerning.

4.6 Resultatenes bidrag til styrket bærekraft

Mer kunnskap om sammenhengen mellom mikrobiomer i laks og produksjonsmiljø, fiskehelse, biofilterfunksjon og vannkvalitet ved ulike partikkelbelastninger i RAS vil bidra til optimalisert drift av RAS, samt bedre fiskevelferd/-helse og overlevelse etter overførsel til sjø. Samlet vil økt kunnskap bidra til økt bærekraft i hele næringen, samt å redusere kostnader. Prosjektet støtter FNs bærekraftsmål 2, 9, 12 og spesielt 14. Delmål 2.4 omfatter bl.a. mål om "bærekraftige systemer for matproduksjon". Prosjektet vil øke bærekraften på produksjon av laks i RAS. Delmål 12.2 sier at Norge innen 2030 skal oppnå en bærekraftig forvaltning og effektiv bruk av naturressurser. Forventet effekt av prosjektet er bedre fiskevelferd og -vekst i RAS og dermed produksjon av en mer robust smolt som håndterer videre vekst i sjøanlegg bedre. Dette vil gi redusert råvareforbruk (fôr) og mer produsert biomasse per settefisk, som igjen betyr mer effektiv bruk av naturressurser. Økt kunnskap om hvordan forhold i RAS kan optimaliseres til å produsere en større og mer robust postsmolt for utsett i sjø, vil redusere risiko for rømning, minske produksjonstiden i sjø og dermed eksponeringstid for lus og antall behandlinger som trenges i løpet av sjøfasen. De samme forholdene vil bidra til å nå FNs bærekraftsmål 14 om livet i havet, spesielt med kunnskapsgenerering og formidling som har som mål å forbedre fiskevelferd og driftsforhold, og dermed gjøre akvakultur som bruker av havressursene mer bærekraftig. Dette berører spesielt delmål 14.7. Økt tilgang til fisk kan ikke lenger dekkes gjennom tradisjonell fangst, men denne muligheten finnes innenfor akvakultur. Akvakultur bidrar derfor til delmål 14.4 om å sikre bærekraftig forvaltning av fiskebestandene.

Hovedfunn

Resultatene fra MikroRAS viste flere utfordringer ved forhøyet partikkelbelastning, men også en rekke praktiske fordeler ved lav partikkelbelastning.

- Hovedfunn fra AP2 og aktivitetene 2.1 og 2.2. Partikkelnivåer som er vanlig å finne i kommersielle RAS kan medføre negative effekter på fiskens prestasjon og kan forsinke smoltifisering. Kompensatorisk vekst i sjøfasen, indikerer at nivåene/forholden som ble testet, er innenfor fiskens rom for tilpasning og kompensasjon, men dette koster energi. Histologiske undersøkelser viste ingen uttalte negative effekter på gjeller og skinnhelse. Imidlertid, økte genuttrykk av inflammasjonsmarkører hos fisk utsatt for høy partikkelbelastning både i gjelle og skinn, særlig i slutten av RAS fasen. Dette kan være et tidlig tegne på at mer inngående skadelige helseeffekter er under utvikling.
- Hovedfunn fra AP3 og aktivitetene 3.1, 3.2 og 3.3. Nivåer av suspendert stoff rundt 7 mg/l i RAS førte til betydelig redusert sikt i vannet og redusert nitrifikasjon. Det var økt forekomst av heterotrofe bakterier i vann og biofilter i overgangen til brakkvann, noe som både kan utkonkurrere de nitrifiserende bakteriene og ha negative effekter på fiskens helse.
- Hovedfunn fra AP1 og aktivitetene 1.1, 1.2 og 1.3. Fiskeprøvene resulterte i sekvenseringsdata av dårlig kvalitet, både når det gjelder amplikonsekvensering av markørgenet 16S rRNA (for karakterisering av sammensetning av samfunn) og metagenomsekvensering (for kartlegging av de funksjonelle genene). Dette skyldes antakelig en stor andel fiskevev i prøvene.
- Lav partikkelbelastning kan også medføre en rekke praktiske fordeler, som enklere rengjøring og lettere observasjon av fisken, samt bedre effekt av vannbehandlingen (utlufting av CO₂, desinfeksjon, nitrifikasjon m.m.) og redusert risiko for bakteriell produksjon av uønskede metabolitter (f.eks. H₂S og geosmin).

Utfyllende kommentarer og behov for videre forskning

MikroRAS-prosjektet ble designet for å undersøke vanlige utfordringer som finnes i majoriteten av RAS, uavhengig av hvilken teknologi som benyttes. RAS er komplekse system og det foregår en rekke prosesser som er avhengige av hverandre og påvirker både vannkvaliteten og fiskens vekst. Vår forståelse av dette komplekse systemet forbedres sakte, men sikkert, og det etableres stadig forbedrede prosedyrer og retningslinjer for best mulig drift og fiskeproduksjon. Likevel finnes det stor variasjon i hvordan RAS driftes og hvor vellykket fiskeproduksjonen er. Det å sikre felles forståelse av nøkkelfaktorer og identifisere premisser for driften gjennom videre forskning, er viktige brikker for å sikre best mulig fiskeproduksjon.

Når det gjelder mikrobiom-analyser for prøver fra laks, peker våre resultater på betydningen av gode protokoller for prøvetaking og høy kvalitet på DNA-ekstrakter for å oppnå gode sekvenseringsdata. I likhet med andre forskningsgrupper fant vi at metagenomikldata fra tarmprøver var svært dominert av laksens DNA. Denne utfordringen bør adresseres i framtidig forskning. Mulige løsninger kan ligge i utvikling av nye metoder for prøvetaking eller strategier for selektiv fjerning av verts-DNA før DNA-sekvensering.

Vi lyktes ikke med en detaljert kartlegging av fiskens mikrobiomer gjennom produksjonssyklusen. Dermed mangler det fremdeles kunnskap om hvilke faktorer som bestemmer sammensetningen av fiskemikrobiomene, og hvordan denne sammensetningen eventuelt påvirker fiskens helse.

Et annet tema som er svært relevant for produksjon av smolt i RAS, men som ennå ikke har vært undersøkt, er samspillet mellom partikler, bakterier, salinitet og barriereegenskapene til fiskens mukosale overflater.

Fra forskning på andre typer mukus er det kjent at partikler og salinitet har stor effekt på de viskoelastiske egenskapene til mukus, og dermed også på barriereegenskapene. Videre har tidligere studier på lakseyngel vist at tilstedeværelse av bakterier, og typen bakterier, virker inn på de viskoelastiske egenskapene til skinnmukus (Canny m.fl. 2023). Dette er et område som er lite utforsket, men som kan være svært viktig for å forstå hvordan robust smolt kan produseres i RAS.

MikroRAS har tydelig vist at det å leve i et miljø med høy TSS over tid har en energikostnad. Imidlertid er de viktigste driverne for denne energikostnaden ikke klare. Variasjon i fysiologiske parametere, inflammatoriske responser og en redusert stressrespons under transport viser at det er en metabolsk kostnad for fysiologiske kompensasjonsmekanismer. Men hvor mye energi som går til å finne og eventuelt konkurrere om fôr, i et miljø med begrenset sikt pga. forhøyet TSS er uklart. Derfor trengs mer dyptgående adferdsstudier knyttet til målinger av oksygenforbruk over tid, som kan kaste lys over effektene av TSS på fôrings-/svømmeatferd og energiforbruk. Dette kan igjen forbedre prosedyrer knyttet til fôring og optimalisering av karmiljøet.

Vi oppdaget at høy TSS-belastning forsinket smoltifiseringen, men mekanismene bak dette funnet er fortsatt ikke godt forstått. Var det gjennom en ujevn redusert lysfordeling i RAS karene med høy TSS? Eller har partikler en direkte forstyrrende effekt på membran, ionepumper og kanaler i kloridcellene? På grunn av den høye forekomsten av kjønnsmodne hanner er datasettet redusert og det var derfor heller ikke mulig å studere om det var en korrelasjon mellom fiskestørrelse og smoltifiseringsmarkører. Dvs. at forsinkelsen i smoltifiseringen er direkte forårsaket av at fisken i HTSS var mindre. At over 50 % av hannfisken i forsøket endte opp som kjønnsmoden postsmolt gjør ikke bare tolking av resultater vanskelig, men er også et bekymrende resultat for næringen. Det bør forskes videre på faktorer som bidrar til tidlig kjønnsmodning i RAS (bl.a. akkumulering av hormoner og andre stoffer) for å kunne iverksette og utvikle tiltak.

Som i tidligere studier, fant vi at gjellepatologier og uspesifikk inflammasjon øker over tid i RAS-produksjon, men dette var ikke klart knyttet til TSS-belastning. Dette må utforskes videre, det er sannsynlig at dette er multifaktorielt og knyttet til økt produksjonsintensitet, dvs. redusert produksjonstid, økt temperatur, forhøyede nivåer av CO₂, TSS, TOC og/eller andre faktorer.

5 Referanser

- Au, D.W.T., Pollino, C.A., Wu, R.S.S., Shin, P.K.S., Lau, S.T.F., Tang, J.Y.M. 2004. Chronic effects of suspended solids in gill structure, osmoregulation, growth, and triiodothyronine in juvenile green grouper *Epinephelus coioides*. *Mar Ecol Prog Ser* 266: 255-264.
- Awata, S., Tsuruta, T., Yada, T., Iguchi, K. 2011. Effects of suspended sediment on cortisol levels in wild and cultured strains of ayu *Plecoglossus altivelis*. *Aquaculture* 314, 115–121.
- Barrett, J.C., Grossman, G.D., Rosenfeld, J. 1992. Turbidity-induced changes in reactive distance of rainbow trout. *Trans. Am. Fish. Soc.* 121: 437-443.
- Barrut, B., Blancheton, J.P., Callier, M., Champagne, J.Y., Grasmick, A. 2013. Foam fractionation efficiency of a vacuum airlift-Application to particulate matter removal in recirculating systems. *Aquac. Eng.* 54, 16–21. doi: 10.1016/j.aquaeng.2012.10.003
- 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. *Front. Microbiol.* 8:101. doi: 10.3389/fmicb.2017.00101
- Becke, C., Steinhagen, D., Schumann, M., Brinker, A. 2017. Physiological consequences for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) of short-term exposure to increased suspended solid load. *Aquacultural Engineering* 78A: 63-74.
- Becke, C., Schumann, M., Steinhagen, D., Geist, J., Brinker, A. 2018. Physiological consequences of chronic exposure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to suspended solid load in recirculating aquaculture systems. *Aquaculture*. 484, 228–241. doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.11.030
- Becke, C., Schumann, M., Geist, J., Brinker, A. 2020. Shape characteristics of suspended solids and implications in different salmonid aquaculture production systems. *Aquaculture*. 516, 734631. doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.734631
- Bilotta, G.S. and Brazier, R.E. 2008. Understanding the influence of suspended solids on water quality and aquatic biota. *Water research*, 42(12), 2849-2861.
- Blancheton, J.P., Attramadal, K.J.K., Michaud, L., d'Orbcastel, E.R., Vadstein, O. 2013. Insight into bacterial population in aquaculture systems and its implication. *Aquac. Eng.* 53, 30–39. doi:10.1016/j.aquaeng.2012.11.009.
- Brinker, A., Rösch, R. 2005. Factors determining the size of suspended solids in a flow-through fish farm. *Aquacultural Engineering* 33(1): 1-19.
- Bugten, A.V., Attramadal, K.J.K., Fossmark, R., Vadstein, O., Rosten, T., Bakke, I. 2022. Changes in rearing water microbiota in RAS induced by membrane filtration alters the gut microbiota of Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Aquaculture* 548.
- Bullock, G.L., Herman, R., Heinen, J.M., Nobel, A., Weber, A., Hankins, J.A. 1994. Observations on the occurrence of bacterial gill disease and amoebae gill infestation in rainbow trout culture in a water recirculation system. *J. Aquat. Anim. Health* 6, 310–317.
- Cabillon, N.A.R., Lazado, C.C. 2019. Mucosal barrier functions of fish under changing environmental conditions. *Fishes*, 4(1), p.2.
- Chapman, P.M., Popham, J.D., Griffin, J., Leslie, D., Michaelson, J. 1987. Differentiation of physical from chemical toxicity in solid waste fish bioassays. *Water, Air Soil Pollut.* 33, 295–308.
- Chen, S., Timmons, M.B., Aneshansley, D.J., Bisogni Jr., J.J. 1993. Suspended solids characteristics from recirculating aquacultural systems and design implications. *Aquaculture* 112, 3–155.
- Dehler, C.E., Secomber, C.J., Martin, S.A.M. 2017. Environmental and physiological factors shape the gut microbiota of Atlantic salmon parr (*salmo salar* L.). *Aquaculture* 467: -157.
- De Robertis, A., Ryer, C.H., Veloza, A., Brodeus, R.D. 2003. Differential effects of turbidity on prey consumption of piscivorous and planktivorous fish. *Can. J., Fish. Aquat. Sci.* 60: 1517-1526.

- Fan, Y., Pedersen, O. 2021. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nat Rev Microbiol* 19, 55–71 (2021). doi:10.1038/s41579-020-0433-9d
- Fernandes, P., Pedersen, L.-F., Pedersen, P.B. 2015. Microscreen effects on water quality in replicated recirculating aquaculture systems. *Aquac. Eng.* 65, 17–26. doi: 10.1016/j.aquaeng.2014.10.007d
- Fernandes, P.M., Aalto, S.L., Åsnes, H.Ø., Rojas-Tirado, P., Åtland, Å., Letelier-Gordo, C.O. 2024. Sulphate removal by membrane filtration minimizes the risk of hydrogen sulphide formation in fixed bed biofilters. *Aquac. Eng.* 106, 102426. doi: 10.1016/j.aquaeng.2024.102426
- Fiksdal, L.W.F. 2023. Comparative assessment of water quality and biofilter performance in recirculating aquaculture systems (RAS) exposed to high and low particle loading. MSc thesis. Department of Biological Sciences, University of Bergen, Bergen, Norway. 104 p.
- Fossmark, R.O., Vadstein, O., Rosten, T.W., Bakke, I., Košeto, D., Bugten, A.V., Helberg, G.A., Nesje, J., Jørgensen, N.O.G., Raspati, G., Azrague, K., Østerhus, S.W., Attramadal, K.J.K. 2020. Effects of reduced organic matter loading through membrane filtration on microbial community dynamics in recirculating aquaculture systems (RAS) with Atlantic salmon parr (*Salmo salar*). *Aquaculture* 524: 735268.
- Fraser, T. W., Hansen, T. J., Norberg, B., Nilsen, T. O., Schulz, R. W., & Fjelldal, P. G. 2023. Atlantic salmon male post-smolt maturation can be reduced by using a 3-hour scotophase when inducing smoltification. *Aquaculture*, 562, 738772.
- Giusi M., Hagen Live Heldal , Porcellato Davide , Jørgensen Sven Martin , Pope Phillip B. , Vaaje-Kolstad Gustav. 2017. The Skin-Mucus Microbial Community of Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Frontiers in Microbiology*, vol. 8. DOI=10.3389/fmicb.2017.02043.
- Godoy, M., Coca, Y., Suárez, R., Montes de Oca, M., Bledsoe, J.W., Burbulis, I., Caro, D., Pontigo, J.P., Maracaja-Coutinho, V., Arias-Carrasco, R., Rodríguez-Córdova, L., Sáez-Navarrete, C. 2024. *Salmo salar* Skin and Gill Microbiome during *Piscirickettsia salmonis* Infection. *Animals* 14, no. 1: 97. doi: 10.3390/ani14010097.
- Gómez de la Torre Canny S, Nordgård C.T., Mathisen A.J.H., Degre Lorentsen E., Vadstein O. and Bakke I. 2023. A novel gnotobiotic experimental system for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) reveals a microbial influence on mucosal barrier function and adipose tissue accumulation during the yolk sac stage. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12:1068302. doi: 10.3389/fcimb.2022.1068302.
- Gregersen, K.J.J., Pedersen, P.B., Pedersen, L-F, Dalsgaard, J. 2019. Micro particles and microbial activity in Danish recirculating rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms. *Aquaculture Engineering* 84: 60-66.
- Guerdat, T.C., Losordo, T.M., Classen, J.J., Osborne, J.A., DeLong, D. 2011. Evaluating the effects of organic carbon on biological filtration performance in a large scale recirculating aquaculture system. *Aquac. Eng.* 44 (1), 10–18. doi: 10.1016/j.aquaeng.2010.10.002.
- Handeland, S. O., & Stefansson, S. O. 2001. Photoperiod control and influence of body size on off-season parr–smolt transformation and post-smolt growth. *Aquaculture*, 192(2-4), 291-307.
- Handeland, S. O., Björnsson, Arnesen, A.M., Stefansson, S.O., 2003. Seawater adaptation and growth of post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) of wild and farmed strains. *Aquaculture* 220, 367–384.
- Hess-Erga, O-K., Fernandes, P.M., Calabrese, S., Fredriksen, S., Dahle, H., Powell, M., Roalkvam, I., Andrews, M., Rojas-Tirado, P., Steigum, E., Fiksdal, L.W.F., Bø, L.R., Stenhaug, S.R. og Bakke, I. (2023). Er lav partikkelbelastning i RAS fordelaktig? *Norsk Fiskeoppdrett* nr. 12.
- Huang et al 2018. Ammonia-oxidizing bacteria and archaea within biofilters of a commercial recirculating marine aquaculture system. *AMB Express*. 2018 Feb 10;8:17. doi: 10.1186/s13568-018-0551-1.
- Höglund, E., Folkedal, O., Aerts, J., Hvas, M., Øverli, Ø., Jensen, A. M., Kristiansen, T. 2023. Welfare effects of environmental hypercapnia quantified by indicators based on morphology and allostatic load in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 572, 739512.
- Jarungsriapisit, J., Moore, L.J., Taranger, G.L., Nilsen, T.O., Morton, H.C., Fiksdal, I.U., Stefansson, S., Fjelldal, P.G., Evensen, Ø. and Patel, S. 2016. Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) post-smolts challenged

- two or nine weeks after seawater-transfer show differences in their susceptibility to salmonid alphavirus subtype 3 (SAV3). *Virology Journal* 13(1): 66.
- Johnson, P.W., Sieburth, J.M., Sastry, A., Arnold, C.R., Doty, M.S. 1971. *Leuocothrix mucos* infestation of benthic crustacea, fish eggs and tropical algae. *Limnology and Oceanography*. Volume 16, Issue 6 doi:10.4319/lo.1971.16.6.0962
- Lake, R.G., Hinch, S.G., 1999. Acute effects of suspended sediment angularity on juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 56, 862–867. doi:10.1139/f99-024.
- Letelier-Gordo, C.O., Aalto, S.L., Suurnäkki, S., Pedersen, P.B. 2020. Increased sulfate availability in saline waters promotes hydrogen sulfide production in fish organic waste. *Aquacultural Engineering* 89: 102062.
- Liu L, Feng Y, Wei L, Zong Z. 2021. Genome-Based Taxonomy of *Brevundimonas* with Reporting *Brevundimonas huaxiensis* sp. nov. *Microbiol Spectr.* Sep 3;9(1). doi: 0.1128/Spectrum.00111-21.
- Martinez, E. P., Balseiro, P., Fleming, M. S., Stefansson, S. O., Norberg, B., Imsland, A. K. D., & Handeland, S. O. 2023. Interaction of temperature and photoperiod on male postsmolt maturation of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 568, 739325.
- McCormick, S.D., Shrimpton, J.M., Carey, J.B., O'Dea, M.F., Sloan, K.E., Moriyama, S., Bjornsson, B.T. 1998. Repeated acute stress reduces growth rate of Atlantic salmon parr and alters plasma levels of growth hormone, insulin-like growth factor I and cortisol. *Aquaculture*. 168, 221–235.
- Michaud, L., Blancheton, J.P., Bruni, V., Piedrahita, R. 2006. Effect of particulate organic carbon on heterotrophic bacterial populations and nitrification efficiency in biological filters. *Aquac. Eng.* 34, 224–233. doi: 10.1016/j.aquaeng.2005.07.005
- Michaud, L., Lo Giudice, A., Interdonato, F., Triplet, S., Ying, L., Blancheton, J.P. 2014. C/N ratio-induced structural shift of bacterial communities inside lab-scale aquaculture biofilters. *Aquac. Eng.* 58, 77–87 (2014). doi: 10.1016/j.aquaeng.2013.11.002
- O'Byrne-Ring, N., Dowling, K., Cotter, D., Whelan, K., & MacEvilly, U. 2003. Changes in mucus cell numbers in the epidermis of the Atlantic salmon at the onset of smoltification. *Journal of fish biology*, 63(6), 1625-1630.
- Pedersen, L.-F., Rojas-Tirado, P., Arvin, E., Pedersen, P.B. 2019. Assessment of microbial activity in water based on hydrogen peroxide decomposition rates. *Aquacultural Engineering* 85: 9-14.
- Olsen, R.E., Sundell, K., Mayhew, T.M., Myklebust, R., Ringø, E.: Acute stress alters intestinal function of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture*. 250, 480–495 (2005). doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.03.014
- Otnes, I. 2020. Histological investigation of gill health responses to recirculating aquaculture system (RAS) water quality in apparently healthy Atlantic salmon (*Salmo salar*). Unpublished master thesis, Univ. of Bergen 61pp.
- Pedersen, P.B., von Ahnen, M., Fernandes, P., Naas, C.; Pedersen, L-F., Dalsgaard, J. 2017. Particle surface area and bacterial activity in recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering* 78: 18-23.
- Pino Martinez, E., Balseiro, P., Pedrosa, C., Haugen, T.S., Fleming, M.S., Handeland, S.O., 2021. The effect of photoperiod manipulation on Atlantic salmon growth, smoltification and sexual maturation: A case study of a commercial RAS. *Aquaculture research* 52, 2593–2608.
- Prunet, P., Boeuf, G., Bolton, P. & Young, G. 1989. Smoltification and sea water adaptation in Atlantic salmon (*Salmo salar*): plasma prolactin, growth hormone, and thyroid hormone. *General and Comparative Endocrinology* 74, 335–346.
- Remen, M., Bloch-Hansen, K., Sørflaten, J., Skjåvik, H., Hårstad, H., Robertsen, C. 2020. Er postsmolt fra RAS en hardhaus? TEKSET konferansen 2020, Clarion Hotel & Congress, Trondheim 12.02.20.
- Rojas-Tirado, P., Pedersen, P.B., Vadstein, O., Pedersen, L-F. 2018. Changes in microbial water quality in RAS following altered feed loading. *Aquaculture Engineering* 81: 80-88.
- Rojas-Tirado, P., Pedersen, P.B., Pedersen, L-F. 2019. Microbial dynamics in RAS water: Effects of adding acetate as a biodegradable carbon-source. *Aquaculture Engineering* 84: 106-116.

- Rojas-Tirado, P., Aalto, S.L., Åtland, Å., Letelier-Gordo, C. 2021. Biofilters are potential hotspots for H₂S production in brackish and marine water RAS. *Aquaculture*. 536, 736490. doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.736490
- Rosengren, M., Kvingedal, E., Naslund, J., Johnson, J.I., Sundell, K. 2017. Born to be wild: effects of rearing density and environmental enrichment on stress, welfare, and smolt migration in hatchery-reared Atlantic salmon. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 74.3: 396-405.
- Schulz, R.W., E. Andersson, G.L. Taranger. 2006. Photoperiod manipulation can stimulate or inhibit pubertal testis maturation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) *Anim. Reprod.*, 3 pp. 121-126
- Schumann, M., Brinker, A. 2020. Understanding and managing suspended solids in intensive salmonid aquaculture: a review. *Rev. Aquac.* 12, 2109–2139. doi: 10.1111/raq.12425
- Skov, P.V., Pedersen, L.F., Pedersen, P.B. 2013. Nutrient digestibility and growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) are impaired by short term exposure to moderate supersaturation in total gas pressure. *Aquaculture*. 416–417, 179–184. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.09.007.
- Tørud, B., Jensen, B.B., Gåsnes, S., Grønbech, S., Gismervik, K. 2019. Dyrevelferd i settefiskproduksjonen – SMÅFISKVEL. Veterinærinstituttet, Rapport 14-2019.
- Vadstein O, Attramadal KJK, Bakke I et al. 2018. K-Selection as microbial community management Strategy: A method for improved viability of larvae in aquaculture. *Frontiers in Microbiology* 2018; 9:2730.
- Vestrum, R.I., Attramadal, K.J.K., Vadstein, O., Gundersen, M.S. Bakke, I. 2020. Bacterial community assembly in Atlantic cod larvae (*Gadus morhua*): contributions of ecological processes and metacommunity structure. *FEMS Microbiology Ecology*, Volume 96, Issue 9, September 2020. doi: 10.1093/femsec/fiaa163.
- Ytrestøyl, T., Hjelle, E., Kolarevic, J., Takle, H., Rebl, A., Afanasyev, S., Terjesen, B. F. 2023. Photoperiod in recirculation aquaculture systems and timing of seawater transfer affect seawater growth performance of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of the World Aquaculture Society*, 54(1), 73-95.
- Ytrestøyl, T., Bæverfjord, G., Kolarevic J., Solheim, M., Hjelle, E., Mørkøre, T., Brunsvik, P. 2018. Hva betyr produksjonsstrategier for ytelse, helse og velferd i sjøfasen (BENCHMARK). Rapport 38/2018.
- Zhang, Li, Xu, Tang, and Li. 2019. Microbiome of Co-cultured Fish Exhibits Host Selection and Niche Differentiation at the Organ Scale *Front. Microbiol.*, 08 November. doi:10.3389/fmicb.2019.025768.

6 Leveranser

Dato	Leveranse
05.11.21	Referat fra oppstartsmøte med prosjektgruppe og referansegruppe
31.12.21	Referat fra statusmøter med referansegruppe og prosjektgruppe
31.12.21	Statusrapport FHF
30.06.22	Referat fra statusmøter med referansegruppe og prosjektgruppe
30.06.22	Statusrapport FHF
31.12.22	<i>Referat fra statusmøter med referansegruppe og prosjektgruppe</i>
31.12.22	<i>Statusrapport FHF</i>
30.06.23	Statusrapport FHF
31.08.23	Abstrakt til presentasjon på AquaNor 2023. Tittel: Effekt av partikkelbelastning på produksjonsmiljø, biofilter funksjon og fiskevelferd i RAS (fikk ikke presentere).
31.08.23	Abstrakt til presentasjon på Nordic RAS 2023. Tittel: The impact of particle load on the water and biofilm microbiota in Atlantic salmon RAS (fikk ikke presentere). Tittel: Particle load effect on RAS water quality and salmon welfare and performance.
06.09.23	Presentasjon på The fourth International Fish Microbiota workshop in Wageningen. Tittel: Salmon microbiota development across RAS and saltwater phases under high and low particle load, ved Simen Fredriksen.
03.10.23	Presentasjon på Nordic RAS 2023 i Tromsø. Tittel: Particle load effects on water quality, microbiota and salmon welfare and performance during smoltification in RAS, ved Paulo M. Fernandes
31.10.23	Populærvitenskapelig artikkel og artikkel til partnernes nettsider Hess-Erga, O-K., Fernandes, P.M., Calabrese, S., Fredriksen, S., Dahle, H., Powell, M., Roalkvam, I., Andrews, M., Rojas-Tirado, P., Steigum, E., Fiksdal, L.W.F., Bø, L.R., Stenhaug, S.R. og Bakke, I. (2023). Er lav partikkelbelastning i RAS fordelaktig? Norsk Fiskeoppdrett nr. 12.
31.12.23	Referat fra statusmøter med referansegruppe og prosjektgruppe
31.12.23	Statusrapport FHF

30.06.24	Referat fra statusmøter med referansegruppe og prosjektgruppe
30.06.24	Statusrapport FHF
27.08.24	Presentasjon på AQUA 2024 i København. Tittel: <i>Salmon microbiota development under high and low RAS particle loads</i> , ved Simen Fredriksen.
17.10.24	Presentasjon på Fremtidens smoltproduksjon 2024 i Sunndalsøra. Tittel: <i>Particle load effects on water quality, water chemistry, and microbiota in RAS</i> , ved Paulo M. Fernandes.
22.10.24	Presentasjon på Havbruk 2024 i Tromsø. Tittel: <i>Effekt av partikkelbelastning på vannkvalitet og mikrobiota i RAS</i> , ved Simen Fredriksen.
31.12.24	Statusrapport FHF
10.02.25	Avslutningsmøte med prosjekt- og ref. gruppen med gjennomgang av utkast til sluttrapport
19.02.25	Presentasjon på NCE Aquaculture Settefiskforum 2025 i Bodø. Tittel: Effekt av partikkelbelastning i RAS på mikrobiota, vannkvalitet og smolt, ved Simen Fredriksen.
12.03.25	Referat fra avslutningsmøte med prosjektgruppe og referansegruppen
12.03.25	Populærvitenskapelig artikkel og artikkel til partnernes nettsider. Foreløpig tittel: Hess-Erga, O-K., Fernandes, P.M., Calabrese, S., Fredriksen, S., Dahle, H., Powell, M., Andrews, M. og Bakke, I. (2025). Lav partikkelbelastning i RAS er bra for både laksen og driften. Norsk Fiskeoppdrett nr. .
12.03.25	Manuskript til 3 vitenskapelige artikler vedr. partikkelbelastning og vannkvalitet. Manus 1: Foreløpig tittel: Effects of increased suspended solids loading on water quality and microbiota in fresh- and brackish water recirculating aquaculture systems Manus 2: Foreløpig tittel: Effects of particle load in recirculating aquaculture systems on Atlantic salmon health, welfare and performance Manus 3: Foreløpig tittel: Metagenomics analysis reveals the functional potential of the RAS microbiome
12.03.25	Faglig sluttrapport i tråd med FHF's retningslinjer
12.05.25	Administrativ sluttrapport i tråd med FHF's retningslinjer

7 Appendiks

Tabell A1. Spredning i vekt hos atlantisk laks eksponert for lav TSS (LTSS) og høy TSS (HTSS) i 128 dager i RAS. Etter RAS er fisk fra begge behandlingene blandet i kar med fullt sjøvann (for å simulere utsett i sjøanlegg).

	RAS fase								SW fase			
	Dag 0		Dag 37		Dag 72		Dag 121		Dag 176		Dag 225	
	LTSS	NTSS	LTSS	NTSS	LTSS	NTSS	LTSS	NTSS	LTSS	NTSS	LTSS	NTSS
antall målte individer	594	595	563	561	413	405	382	371	224	225	95	92
vekt gj. snitt (g)	39,4	39,5	70,19	70,32	117,1	110,4	247,5	223,8	428,1	415,3	691,6	684,1
vekt (standardavvik)	4,5	4,2	10,27	9,74	22,7	17,9	50,9	49,2	75,9	90,1	190,8	163,2
min. vekt (g)	13,4	28,8	44	47,4	71,8	60,6	155,6	116,2	211,2	199,2	268,8	263,8
maks vekt (g)	54	53,4	103,8	100,8	207,6	173,2	444,2	393,6	675,0	654,2	1144,0	1120,0

Tabell A2. Kjønnssfordeling og gonadosomatisk indeks (GSI) hos prøvetatt hannfisk i RAS perioden (120 dager).

Prøveuttaks- dag (RAS fasen)	D0	D15		D36		D43		D71		D78		D99		D120		Gj. snitt	Gj. snitt
Behandling		LTSS	NTSS	LTSS	NTSS	LTSS	NTSS	LTSS	NTSS	LTSS	NTSS	LTSS	NTSS	LTSS	NTSS	LTSS	NTSS
Hunnfisk (F)	6	12	11	11	6	6	7	8	9	8	7	9	12	4	8		
Hannfisk (M)	12	6	7	7	12	12	11	10	9	10	11	9	6	14	10		
Pubertale haner (GSI>0,06)	1	3	2	7	8	8	7	2	2	4	7	6	6	8	5		
Gj. snitt GSI hannfisk	0,04	0,11	0,08	0,10	0,11	0,07	0,09	0,10	0,11	0,25	0,21	0,34	0,82	2,45	1,84	0,49	0,47
% kjønnsmoden hannfisk	8	50	29	100	67	67	64	20	22	40	64	67	100	57	50	57	56



Norges ledende kompetansesenter på vannmiljø

Norsk institutt for vannforskning (NIVA) er Norges viktigste miljøforskningsinstitutt for vannfaglige spørsmål, og vi arbeider innenfor et bredt spekter av miljø, klima- og ressurs spørsmål. Vår forskerkompetanse kjennetegnes av en solid faglig bredde, og spisskompetanse innen mange viktige områder. Vi kombinerer forskning, overvåkning, utredning, problemløsning og rådgivning, og arbeider på tvers av fagområder.