

ONDERZOEK & ONDERWIJS

Beheer van microbiële gemeenschappen en visgezondheid in recirculatiesystemen

Door Eugene Rurangwa (IMARES), Edward Schram (IMARES), Hauke Smidt (WUR – Microbiologie) & Marc Verdegem (WUR – AFI)

In dit artikel wordt de rol van de microbiële gemeenschap in de darm van vissen beschreven en wordt een overzicht gegeven van de belangrijkste huidige kennis en inzichten. Ook wordt een korte beschrijving gegeven van het via het ministerie van E,L&I (voormalig LNV) gefinancierde project “Visgezondheid in RAS”, en wordt kort aangestipt wat we verwachten te leren van dit project.

In Nederland wordt bijna alle vis in recirculatiesystemen gekweekt. Het strikte milieubeleid in Nederland, maar ook in Europa, stimuleert kwekers te experimenteren met innovatieve en milieuvriendelijke kweeksystemen. Recirculatie teelt maakt spaarzaam en efficiënt gebruik van ruimte, water en energie en werkt toe naar zero-emissie. Daarmee speelt de sector in op de vraag naar duurzame productie. De verwachting is dan ook dat het belang van recirculatie teelt in de aquacultuur wereldwijd zal groeien. In recirculatiesystemen zijn micro-organismen in hogere concentraties aanwezig dan in de natuur, wat enerzijds zou kunnen leiden tot ziekte (meer ziekteverwekkers aanwezig) maar anderzijds tot verhoogde productie en betere gezondheid (probiotica – denk aan Yakult). Inzicht krijgen in rol van microbiële gemeenschappen in recirculatiesystemen is daarom belangrijk voor de sector. Immers, zou het niet prachtig zijn indien we via het aansturen van microbiële gemeenschappen in recirculatiesystemen invloed kunnen uitoefenen op de groei, gezondheid en

kwaliteit van onze kweekvis?

Microbiële gemeenschappen in recirculatiesystemen

Vissen in recirculatiesystemen worden vaak in hoge dichtheid gehouden wat leidt tot hoge concentraties van afvalstoffen in het kweekwater. Deze afvalstoffen zijn een goede voedingsbodem voor micro-organismen zoals bacteriën, protozoa, schimmels en allerlei microscopische ontwikkelingsstadia van wormpjes, kreeftjes en insecten. Deze microbiële gemeenschappen huisvesten gezondheid bevorderende, neutrale en ziekteverwekkende micro-organismen. Ze verwerken de afvalproducten van de vis teelt en dragen bij aan het leefbaar houden van de kweekomgeving. Er is dus sprake van wederzijdse afhankelijkheid. Bij slecht beheer kunnen micro-organismen echter biofilters laten dichtslippen, te veel van het beschikbare zuurstof gebruiken of ziekten veroorzaken. Grondsmak en groeivertraging zijn ook veel voorkomende problemen in recirculatie teelt waarbij als mogelijke

oorzaak micro-organismen genoemd worden. Echter, harde bewijzen heeft men nog niet gevonden. Recent werd bij tandbaars (grouper) aangetoond dat verschillen in concentraties van de bacteriegeslachten *Vibrio*, *Bacillus* en *Psychrobacter* spp. in de darm gecorreleerd zijn met verschillen in groei.

Historisch ging bij het bestuderen van micro-organismen de aandacht bijna uitsluitend uit naar het opsporen en voorkomen van ziekten. Deze benadering leidde soms tot overmatig gebruik van antibiotica en de daaraan gekoppelde kans dat bacteriën resistentie ontwikkelen. Anderzijds ontsmetten sommige kwekers het recirculatie water met ozon en ultraviolet licht. Daarbij worden ook potentieel voordelige micro-organismen gedood, wat jammer is. Het verwijderen van ziekteverwekkers zou niet mogen leiden tot het vernietigen van micro-organismen die bijdragen aan de waterzuivering en het in stand houden van een goede leefomgeving in recirculatiesystemen.

De rol van de darm microbiota in vis

De grote meerderheid van gastheer-microbe interacties leiden niet tot ziekte. Gastheer-microbe interacties gebeuren vooral in de visdarm waar zich een complexe en uiterst dynamische microbiële gemeenschap (darm microbiota) huisvest. Bacteriën zijn de belangrijkste micro-organismen in de darm bij vissen, maar bij sommige vissoorten zijn ook schimmels aanwezig. De bacteriën in de darm beïnvloeden belangrijke processen in relatie tot voeding en immuniteit. Sommige belangrijke bouwstenen zoals essentiële vetzuren, aminozuren, vitaminen, mineralen en verteringsenzymen worden door bacteriën gemaakt en beschikbaar gesteld aan de vis. Naast voeding dragen bacteriën in de darm bij aan de ontwikkeling van de darmwand en bepaalde vormen van immuniteit. Ziekteverwekkers zijn altijd aanwezig

in de darm, zij het vaak tijdelijk, in kleine aantallen of in een niet virulente vorm. Wordt het evenwicht in de darm verstoord, dan ontwikkelen zich sommige ziekteverwekkers explosief of worden virulent, met ziekte tot gevolg.

If you cannot beat them, join them

In 1993 introduceerden een groep van Noorse onderzoekers het concept van "microbieel gerijpt water" bij het kweken van mariene vislarven. De groei, overleving en levendigheid van larven gekweekt in microbieel gerijpt water was aanzienlijk beter dan van soortgenoten gekweekt in zuiver (bacterie-arm) water. In de microbiële ecologie wordt een onderscheid gemaakt tussen snel groeiende 'opportunisten (r-strategists)' en 'niet-opportunisten (k-strategists)'. In een overvolle omgeving met een beperkt voedselaanbod vindt men in de regel een mix van niet-opportunistische soorten, die elkaar min of meer in evenwicht houden en samen verhinderen dat opportunisten de bovenhand krijgen. Tijdens de prille ontwikkeling van vislarven beïnvloeden bacteriën in het water en voedsel in belangrijke mate de kolonisatie en ontwikkeling van de microbiële darm microbiota. De niet-opportunisten in microbieel gerijpt water beschermen de larve voor kolonisatie en proliferatie met opportunistische bacteriesoorten.

Als vissen gehouden worden in hoge dichtheid dan is het praktisch onmogelijk het kweekstelsel vrij te houden van opportunistische ziekteverwekkers. Het feit dat de vissen niet ziek worden kan er op wijzen dat bacteriën in een niet virulente vorm aanwezig zijn of dat de dieren fysiologisch gezond zijn en voldoende afweer hebben. Het kweekwater in een goed beheerd recirculatiesysteem kan een soort 'beschermende werking' hebben, dank zij de aanwezigheid van gezondheidbevorderende bacteriën of via productie van bacteriedodende of

bacteriostatische stoffen die een explosieve ontwikkeling van opportunisten verhinderen. Ook de samenstelling en hoeveelheid van de organische stoffen aanwezig in het kweekwater is belangrijk. Zo ontwikkelden zich ziekteverwekkende *Vibrio*'s sterker in marine recirculatiesystemen met een hoge C:N verhouding in het kweekwater. De vraag is of het in de toekomst mogelijk zal zijn de samenstelling van microbiële gemeenschappen in recirculatiesystemen te onderhouden of bij te sturen. Tot voor kort leek dit niet mogelijk, maar dank zij een voortschrijdend inzicht in de microbiële ecologie van recirculatiesystemen en de recente beschikbaarheid over moleculaire technieken om veranderingen in microbiële gemeenschappen te monitoren, is een dergelijke benadering op voorhand niet kansloos.

Beheer van microbiële gemeenschappen in recirculatiesystemen: huidige inzichten

Oorspronkelijk probeerde men potentiële probiotica te identificeren en te isoleren, om langs deze weg de groei en gezondheid van kweekvis te verbeteren. Later kwam in

Probiotica: *Levende micro-organismen die een gezondheid bevorderend effect hebben op hun gastheer. In de aquacultuur kunnen probiotica via het voer of kweekwater in contact komen met de vis.*

Prebiotica: *Een niet verteerbare stof die de gezondheid van de gastheer bevordert door de ontwikkeling te stimuleren van gezondheid bevorderende micro-organismen (probiotica) in de darm. Via het kweekwater of de voeding kunnen prebiotica opgenomen worden door de vis.*

de humane en dierlijke voeding het accent te liggen op het gebruik van prebiotica en functioneel voedsel. Met uitzondering van enkele kleine successen in de garnalenteelt was deze benadering in de aquacultuur niet succesvol. In de aquacultuur weten we nog onvoldoende hoe de aanwezige microbiële gemeenschappen beïnvloed kunnen worden. Onderzoekers keken steeds naar één onderdeel van het systeem, zoals de vis, het kweekwater, de biofilter of het voer. Echter, van het zoeken naar verbanden tussen microbiële gemeenschappen verspreid tussen de verschillende onderdelen was geen sprake. Men keek vooral naar de rol van autotrofe, aerobe en anaerobe heterotrofe micro-organismen bij het in stand houden van de waterkwaliteit, en de afbraak van organische stof. Het accent lag op de microbiële processen nitrificatie, denitrificatie en fosfaat verwijdering.

Huidige ontwikkelingen rond het beheer van microbiële gemeenschappen in recirculatiesystemen

In het voorjaar van 2009 startten onderzoekers bij 'Wageningen University and Research Centre', in samenwerking met Europese universiteiten en onderzoeksinstellingen onderzoek naar de rol van microbiële gemeenschappen in de aquacultuur. Het doel is inzicht te krijgen in de complexe interacties tussen verschillende microbiële gemeenschappen in kweeksystemen van vis en deze kennis aan te wenden om de weerbaarheid en stabiliteit van zowel dieren als kweeksystemen te verhogen. Een beschrijving van het EU project 'Microbes as positive actors for a more sustainable aquaculture (Promicrobe)' werd gegeven in AquaCultuur 2, 2009. Promicrobe richt zich op tilapia, kabeljauw en zeebaars, soorten met sterk verschillend voedsel en omgevingseisen. Parallel ging er in september 2009 een door E,L&I gefinancierd project van start dat de relatie tussen wa-



Experimentele recirculatiesystemen gebruikt voor onderzoek aan de microbiële gemeenschap in relatie tot visgezondheid bij IMARES.

terkwaliteit, microbiële gemeenschappen en visgezondheid in recirculatiesystemen voor tarbot onderzoek. Partners in dit project zijn IMARES (afdeling aquacultuur) en Wageningen Universiteit (leerstoelgroepen microbiologie, cel biologie & immunologie, en aquacultuur & visserij). De microbiële gemeenschap in tarbotkwekerijen op verschillende plaatsen in het kweekstelsel en in de vis wordt gevolgd in de tijd. Verschillende onderzoekstechnieken worden toegepast: opkweken van bacteriën in agar media, het bepalen van aanwezigheid van snel groeiende bacteriesoorten (opportunisten) in het kweekwater, het bepalen van de samenstelling en diversiteit in microbiële gemeenschappen in darm, kweekwater,

filters en voer via moleculaire technieken (PCR-DGGE, pyrosequencing van het 16S ribosomaal RNA gen). Daarnaast wordt de expressie van 10 verschillende genen in de kieuwen en achterdarm (colon) gemeten en gerelateerd aan de samenstelling van de microbiota in de darm, dit voor verschillende kweeksystemen en tijdstippen.

Het project "Visgezondheid in recirculatiesystemen"

De onderzoeksvragen zijn:

1. Heeft de opzet en het beheer van het recirculatiesysteem invloed op de samenstelling van microbiële gemeenschappen in kweekwater, filters en vis? Zo ja, welke zijn de belangrijkste

PCR-DGGE: Combinatie van twee technieken PCR, gevolgd door DGGE. PCR = 'polymerase chain reaction' is een moleculaire techniek om één of enkele kopieën van een stukje DNA exponentieel te vermenigvuldigen. DGGE = 'denaturing gradient gel electrophoresis' maakt gebruik van het feit dat een DNA molecuul negatief geladen is en in een elektrisch veld migreert naar de positieve pool. Stukjes DNA van gelijke lengte hebben een vergelijkbare lading en migreren even ver in een elektrisch veld. Deze stukjes DNA zijn echter van verschillende micro-organismen afkomstig, en verschillen in samenstelling. Afhankelijk van de samenstelling vouwen deze stukjes DNA in meer of mindere mate open onder toevoeging van een denaturerende stof. Hoe meer een DNA stukje is opgevouwen hoe moeilijker het zich zal verplaatsen in een elektrisch veld. Denk daarbij aan twee personen in een volle zaal die beiden door de massa bewegen. Eén persoon houdt de armen dicht op het lichaam, de andere houdt de armen gestrekt open. Hoe verder de armen gespreid zijn, hoe langzamer men vooruit komt. Door PCR en DGGE te combineren kan men stukjes DNA van gelijke lengte met verschillende samenstelling (afkomstig van verschillende micro-organismen) scheiden, en kan men inzicht krijgen in de diversiteit van de microbiota.

Pyrosequencing: is een techniek waarbij de volgorde van de verschillende basen in DNA bepaald wordt door één helft te gebruiken als template om de andere helft base voor base te synthetiseren. Pyrosequencing is een pas recent ontwikkelde techniek, waardoor tegelijkertijd de volgorde van de bouwstenen (basen) in op dit moment één miljoen DNA moleculen veel sneller en efficiënter dan met tot nu toe gangbare technieken opgehelderd kan worden.

factoren die een invloed hebben op de microbiële gemeenschappen?

2. Welke invloed heeft het vervangen van vismeel en -olie door plantaardige ingrediënten op de samenstelling van microbiële gemeenschappen in kweekwater, filters en vis?

Deze vragen worden aangepakt via het uitvoeren van de volgende taken:

Taak 1: De soortdiversiteit van de microbiële gemeenschappen in recirculatiesystemen voor tarbot en de gezondheidsstatus van de vis

Op twee bedrijven wordt de microbiële gemeenschappen aanwezig op verschillende plaatsen in het systeem en vissen bemonsterd en gevolgd in de tijd. Ook wordt de waterkwaliteit en de gezondheidstoestand van de vis bijgehouden. Het ene bedrijf vertrouwt op biofiltratie voor het in stand houden van de waterkwaliteit. Het andere bedrijf gebruikt ozon, waardoor het kweekwater helderder, maar tevens minder organische stof en bacteriën bevat.

Taak 2: De relatie tussen organische stof concentratie en de microbiële gemeenschap in recirculatiesystemen

De invloed van verschillende concentraties aan organische stof in het kweekwater op de samenstelling en evolutie in de tijd van de microbiële gemeenschap in water en darm wordt onderzocht. Indien de concentratie organische stof belangrijk is kan daarmee rekening gehouden worden bij het ontwerpen van recirculatiesystemen.

Taak 3: De relatie tussen de microbiële gemeenschap in het kweekwater, de darm microbiota en de visgezondheid

De microbiële gemeenschap in het kweekwater beïnvloedt de vis rechtstreeks, maar we kunnen moeilijk schatten in welke mate. Uiteindelijk wensen we inzicht te krijgen in

hoe dit op termijn de gezondheid van de vis beïnvloedt.

Taak 4: *Het effect van de vervanging van vismeel en –olie in het voer op waterkwaliteit, organische stof concentratie en de microbiële gemeenschappen in recirculatiesystemen*

Het vervangen van vismeel en –olie met plantaardige ingrediënten in het voer beïnvloedt de voerbenutting en vertering en dus ook de samenstelling van en hoeveelheid organische stof die vrij komt in het systeem. Dit beïnvloedt de werking van de biofilters en de samenstelling van de microbiële gemeenschap in het kweekwater. Kweekwater en voer samen beïnvloeden de microbiota in de darm. Deze verbanden worden onderzocht.

Nawoord

De microbiële ecologie in recirculatiesystemen is een interessant en boeiend onderzoeksgebied maar op zich slechts een klein onderdeel van de relatie tussen voeding, waterkwaliteit en dier. Vanaf zijn prille ontwikkeling wordt de larve blootgesteld aan omgevingsfactoren die een invloed hebben op zijn later functioneren en weerbaarheid tegen veranderingen in zijn omgeving, inclusief opduikende potentiële ziekteverwekkers. Onze kennis van recirculatie groeit. De uitdaging is recirculatiesystemen te ontwerpen die het dier een optimale leefomgeving bieden. Het verdiepen van onze kennis van de microbiële ecologie in recirculatiesystemen zal op termijn bijdragen aan het ontwerpen en beheren van robuuste en bedrijfszekere systemen.



Filters van de recirculatiesystemen van IMARES in Yerseke