

Grondsmaak in kweekvis deel 2

door Edward Schram (IMARES Wageningen UR), Miriam van Eekert en Els Schuman (beiden Lettinga Associates Foundation - LeAF) en William Swinkels (Nijvis bv)

Grondsmaak is wereldwijd een van de belangrijkste beperkende factoren voor de afzet van kweekvis afkomstig uit vijvers en recirculatiesystemen. Dit wordt vooral veroorzaakt door de lage waardering van consumenten voor kweekvis met grondsmaak. Marktprijs en marktvolume komen daardoor onder druk te staan. Daarnaast brengt de bestrijding van grondsmaak extra kosten met zich mee voor de producent. Ook in Nederlandse kweekvis komt grondsmaak voor. In Nederland wordt op verschillende fronten gewerkt aan het voorkomen en bestrijden van grondsmaak. In het eerste deel van deze serie over grondsmaak (Aquacultuur 2011, nr. 2) werd vooral ingegaan op de achtergronden en gevolgen van grondsmaak. In dit tweede deel wordt dieper ingaan op de diverse aspecten van het bestrijden van grondsmaak in kweekvis.

Drie fronten waarop grondsmaak bestreden kan worden

Zoals besproken in deel 1 van deze serie over grondsmaak, wordt grondsmaak veroorzaakt door de aanwezigheid van geosmine of 2-methylisoborneol (MIB) in het visvlees. Deze stoffen worden geproduceerd door diverse microbiota die leven in viskweeksystemen. Zodra geosmine en MIB vrijkomen uit de microbiota en in het kweekwater terecht komen, worden ze heel snel via de kieuwen opgenomen door de vissen en via de bloedsomloop door het hele lichaam verspreid (bio-accumulatie). Deze aaneenschakeling van gebeurtenissen die uiteindelijk leidt tot grondsmaak in kweekvis, laat zien dat voor de bestrijding van grondsmaak de aandacht op drie onderdelen van het viskweekstelsel gericht kan worden: de microbiota die geosmine en MIB produceren, het kweekwater dat deze stoffen naar de vis transporteert en de vis die de stoffen opneemt (Fig. 1).

In theorie kan grondsmaak dus op drie fronten bestreden worden. Grondsmaak kan voorkomen worden door het probleem bij de bron aan te pakken en te voorkomen dat microbiota geosmine en MIB produceren. De tweede manier om iets aan grondsmaak te doen is door de geosmine en MIB uit het kweekwater te verwijderen. Tot slot kan grondsmaak in het eindproduct voorkomen worden door de opname van geosmine en MIB uit het water door de vis te belemmeren of de uitscheiding te verbeteren. In dit tweede deel van deze serie over grondsmaak wordt op alle drie deze mogelijkheden dieper in gegaan.

Front 1. Voorkomen van productie van MIB en geosmine

Het is niet bekend welke biologische functies geosmine en MIB vervullen in microbiota. We weten niet waarom microbiota deze stoffen maken en onder welke omstandigheden dat gebeurt. We hebben dus

nauwelijks aanknopingspunten als het gaat om het bestrijden van grondsmak door het voorkomen van de productie van geosmine en MIB. Wel is bekend dat geosmine en MIB secundaire metabolieten zijn die door een grote groep microbiota geproduceerd kunnen worden, waaronder actinomyceten en cyanobacteriën. Over het algemeen zijn cyanobacteriën verantwoordelijk voor geosmine en MIB productie in vijversystemen. Cyanobacteriën hebben licht nodig en spelen daarom waarschijnlijk geen belangrijke rol in recirculatiesystemen. In recirculatie systemen werden tot voor kort vooral actinomyceten verantwoordelijk gehouden voor grondsmak. Recent hebben Deense onderzoekers van de Universiteit van Aalborg echter aangetoond dat in een recirculatiesysteem actinomyceten maar een kleine fractie zijn van de totale groep van geosmine producerende microbiota. Het grootste deel van de aanwezige producenten bestond uit verschillende groepen microbiota die we niet eens kennen. Dit maakt het bestrijden van grondsmak zo mogelijk nog lastiger: we weten niet welke microbiota grondsmak produceren en ook niet waarom. Fundamenteel microbiologisch onderzoek is noodzakelijk om de aanpak van grondsmak bij de bron in de toekomst mogelijk te maken.

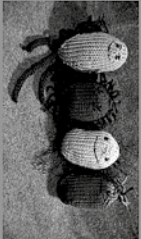
Trickling filter belangrijkste bron

Gelukkig zijn er ook lichtpuntjes. Inmiddels weten we vrij zeker dat het trickling filter de belangrijkste bron is van geosmine en MIB binnen recirculatiesystemen. Dit is gebleken uit geosmine en MIB concentratie metingen op palingkwekerijen uitgevoerd door Nijvis, LeAF en IMARES binnen het VIP project "Grondsmak in kweekvis". Biofilms uit trickling filters blijken hoge concentraties geosmine en MIB te bevatten en bovendien zit in het trickling filter verreweg de grootste microbiële biomassa binnen een recirculatiesysteem. In het trickling filter lijkt

zich een grote voorraad geosmine en MIB op te bouwen, welke vroeg of laat in het water terecht komt en vervolgens in de vis. Hoe de grondsmak veroorzakende stoffen vanuit de biofilm in het kweekwater komen is niet helemaal duidelijk. Op een kwekerij lijken de concentraties in de biofilm van het trickling filter en in het kweekwater niet aan elkaar gerelateerd te zijn. Dat maakt het minder waarschijnlijk dat er sprake is van passieve diffusie vanuit de biofilm naar het water. Dan verwacht je namelijk een vaste verhouding tussen biofilm- en waterconcentraties. Actieve uitscheiding van geosmine of MIB door microbiota zou te maken moeten hebben met biologische functies van deze stoffen buiten de bacteriellen. Aangezien we deze niet kennen, kunnen we niets zeggen over de rol van actieve uitscheiding bij het vrijkomen van geosmine en MIB. De belangrijkste manier waarop deze stoffen uiteindelijk vanuit de biofilm in het kweekwater terecht komen is waarschijnlijk het openbarsten van cellen na afsterven van microbiota. Dit kan gebeuren in het trickling filter zelf of elders in het systeem als het voorafgegaan wordt door loslaten en wegspoelen van biofilm uit het trickling filter. Praktijkervaring leert dat het vrijkomen van biofilm uit het trickling filter vaak varieert in de tijd; een tijdlang komt er weinig biofilm los en dan plotseling weer heel veel. De dynamiek van netto opbouw of afbraak van biofilm kan allerlei oorzaken hebben zoals bijvoorbeeld verandering van hydraulische belastingen, ander voer of een andere voergift. Het is aannemelijk dat het vrijkomen van geosmine en MIB de dynamiek van de biofilm volgt. Biofilm-management zou daarom bij kunnen dragen aan meer controle over grondsmak. Een mogelijkheid hiertoe is het gebruik van zogenaamde moving bed filters in plaats van trickling filters. Door het continue botsen van de bioringen in moving bed filters blijft de biofilm veel

1. Voorkomen
van microbiele
geosmine en MIB
productie

Microbiota
produceren geosmine en
MIB..



en geven het af aan...

Waarom en onder welke
omstandigheden worden
geosmine en MIB
geproduceerd? Kunnen
deze omstandigheden
vermeden worden in
viskweeksystemen?

2. Verwijderen
van geosmine en MIB
uit het water

..het **Water**
In water opgelost
geosmine en MIB
worden....



Hoe kunnen zeer kleine
hoeveelheden geosmine
en MIB selectief
verwijderd worden uit
een complexe matrix
van organische stoffen?

3. Voorkomen opname
en **Verbeteren**
uitscheiding van geosmine en
MIB door de vis

... door de **Vis**
opgenomen via de
kieuwen en ...
... accumuleren in
lichaamsvetter



Welke fysiologische
mechanismen liggen ten
grondslag aan opname,
verspreiding,
metabolisme en
verwijdering van
geosmine en MIB in vis?

dunner en vindt er minder opbouw van een geosmine en MIB voorraad plaats in het filter. Het verschil tussen moving bed en trickling filters in grondsmaak productie wordt dit najaar getest als onderdeel van het bovengenoemde VIP project.

Lichtpunt

Een ander lichtpunt is dat dezelfde onderzoekers van de universiteit van Aalborg in Denemarken recent een moleculaire techniek ontwikkeld hebben waarmee de hoeveelheid geosmine producerende microbiota in bijvoorbeeld een biofilm gemeten kan worden. Dit maakt het mogelijk om het effect van veranderingen binnen recirculatiesystemen op het aantal geosmine producenten te meten. Naar verwachting is deze techniek binnenkort ook beschikbaar voor MIB producenten. Om deze technieken te kunnen benutten voor het grondsmaakonderzoek binnen Nederland is IMARES samenwerking met deze Deense onderzoekers aangegaan. Dit jaar wordt een aantal monsters afkomstig van Nederlandse kwekerijen door de Denen geanalyseerd. Hierdoor verwachten we meer inzicht te krijgen in achtergronden van de verschillen in grondsmaakproblemen tussen kwekerijen.

Organische stof

Een mogelijk belangrijke factor voor de hoeveelheid geosmine en MIB die wordt geproduceerd in een kweekstelsel is de hoeveelheid organische stof in het kweekwater en de daarmee samenhangende organische belasting van het biologische filter. Een hoge organische belasting bevordert de groei van heterotrofe microbiota; microbiota die afhankelijk zijn van organische stoffen als koolstofbron. Dit kan leiden tot een grotere microbiële biomassa in het systeem; een dikkere biofilm en daarmee in potentie ook een grotere hoeveelheid geosmine en MIB producerende micro-

biota. Onderzoek zal uit moeten wijzen welke invloed de organische belasting van biologische filters, ook in relatie tot de stikstofbelasting, op de productie van grondsmaak.

Front 2. Verwijdering uit het kweekwater

Zoals beschreven in deel 1 uit deze serie over grondsmaak, veroorzaken geosmine en MIB al bij zeer lage concentraties in het water grondsmaak in de vis. Dit komt doordat deze stoffen zich in de vis ophopen. Op kwekerijen liggen de concentraties van beide stoffen tussen de 1 en 100 ng/l, terwijl boven de 10 a 15 ng/l al problemen met grondsmaak ontstaan. Dit maakt meteen duidelijk dat het verwijderen van geosmine en MIB uit het kweekwater een enorme technologische uitdaging is: een heel kleine hoeveelheid moet teruggebracht worden naar een nog veel kleinere hoeveelheid. Daar komt bij dat geosmine en MIB zeker niet de enige organische verbindingen in het viskweekwater zijn. In tegendeel, viskweekwater is een soep van allerlei organische stoffen en geosmine en MIB maken daar maar een heel klein deel van uit. Organische stof concentraties in viskweekwater worden meestal gemeten in chemisch zuurstof verbruik (CZV), oftewel de hoeveelheid zuurstof die nodig is om de organische verbindingen te oxideren tot water en kooldioxide. Als de CZV concentratie bijvoorbeeld 80 mg/l is dan maakt een geosmine concentratie van 50 ng/l slechts 0,0002% uit van de totale hoeveelheid organische stof in het kweekwater (1 ng geosmine komt overeen met 2,99 ng CZV); een grasspriet in een hooiberg. Technieken om geosmine en MIB te verwijderen uit het kweekwater moeten zich daarom specifiek op deze stoffen richten om succesvol te kunnen zijn.

Ozon

Ozon kan worden gebruikt om organische

stoffen door middel van oxidatie af te breken. Ook geosmine en MIB kunnen met behulp van ozon worden geoxideerd. De laboratoriumtesten waarin dit werd aangetoond maakten echter gebruik van schoon water met daarin geosmine of MIB en verder niets. Omdat in viskweekwater nog heel wat andere organische stoffen zitten naast geosmine en MIB, is het nog maar de vraag hoe effectief ozon kan zijn. Het is niet zo dat ozon geheel willekeurig met organische stoffen reageert, maar specifiek gericht op geosmine of MIB is het zeker ook niet. Er moet waarschijnlijk heel wat organische stof weg geoxideerd worden voordat geosmine en MIB aan de beurt zijn. Het is goed mogelijk dat de benodigde ozondosering zo hoog is dat de vissen daar last van krijgen.

Praktijktesten met ozon op een viskwekerij in het kader van het bovengenoemde VIP project lieten een stijging van de geosmine en MIB concentratie zien nadat de ozonbehandeling van het kweekwater werd ingeschakeld. Mogelijk dat ozon terecht kwam in het trickling filter en daar biofilm afbrak, waardoor geosmine en MIB vrij konden komen. Het is ook mogelijk dat ozon organische stoffen die slecht te benutten waren voor microbiota afbrak tot beter beschikbare stoffen waardoor de organische belasting van het trickling filter verhoogd werd. Ozon is dus waarschijnlijk niet geschikt om gericht geosmine en MIB te verwijderen. Het kan wel gebruikt worden om de organische belasting van het biologische filter laag te houden. Als uit onderzoek blijkt dat een lage organische belasting leidt tot minder grondsmak, dan kan ozon wel degelijk gebruikt worden om indirect grondsmak te bestrijden.

Filters

Uit diverse studies is gebleken dat geosmine en MIB uit water verwijderd kunnen worden door adsorptie aan actieve kool.

Actieve koolfilters zijn echter snel verzadigd waardoor ze maar kort mee gaan, zeker wanneer ze gebruikt worden om water met een hoog gehalte aan organische stoffen, zoals recirculatiewater, te behandelen. Snelle verstopping zal een dergelijk filter waarschijnlijk ook parten spelen. Toepassing van een actieve koolfilter in een recirculatie systeem lijkt daarom vooralsnog geen reële optie om grondsmak te bestrijden.

Andere adsorptie en absorptie materialen, zoals synthetische en natuurlijke polymeren zoals cyclodextrin en natuurlijk rubber zijn ook getest op verwijdering van geosmine en MIB uit water, met goede resultaten. In viskweeksystemen zijn eerste testen gedaan met polystyreen en paraffine, eveneens met veelbelovende resultaten. Echter voor al deze technieken geldt dat er nog geen systemen zijn voor grootschalige toepassing op viskwekerijen.

Anaerobe reactoren

In Israël wordt onderzoek gedaan naar het verwijderen van geosmine en MIB met behulp van anaerobe (UASB) reactoren. De resultaten laten zien dat naast fysisch-chemische adsorptie aan het slib, ook een aanzienlijk deel van de geosmine en MIB verwijdering plaatsvindt door afbraak van deze stoffen. Inmiddels zijn uit deze en andere reactoren bacteriën geïsoleerd die inderdaad in staat zijn tot afbraak van geosmine en MIB. Naar verwachting kan op basis hiervan op termijn een anaerobe reactor ontwikkeld worden waarmee geosmine en MIB uit viskweekwater verwijderd kunnen worden.

Front 3. Opname en uitscheiding door vissen

Voor allerlei organische stoffen die chemisch verwant zijn aan geosmine en MIB, dat wil zeggen ongeveer in dezelfde mate vetoplosbaar (lipofiel) zijn, is bio-

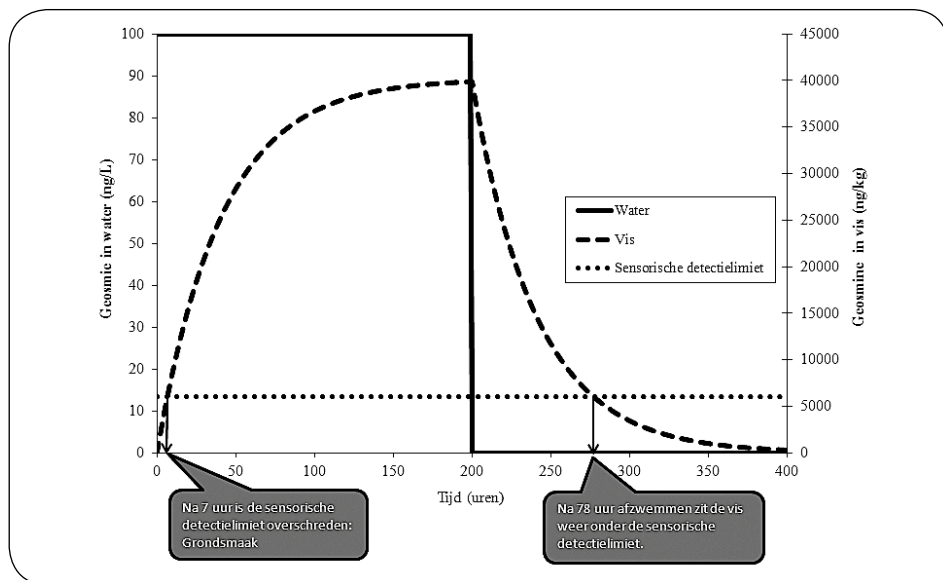
accumulatie in vis goed gedocumenteerd door milieuchemici en ecotoxicologen. In het algemeen is opname van organische stoffen door de vis een passief proces dat plaatsvindt via de kieuwen, de darm en de huid. Het relatieve belang van elk van deze routes is afhankelijk van de vetoplosbaarheid van de stof. In het geval van geosmine en MIB is opname via de kieuwen verreweg het belangrijkste. Alleen als vissen eten van biofilms of algen waarin geosmine of MIB zit, kan opname via de darm een rol spelen. Wanneer vis wordt blootgesteld aan geosmine of MIB worden deze stoffen dus opgenomen. Deze opname van geosmine en MIB uit het water door een vis gaat net zolang door totdat de concentraties in het water en in het vet van de vis met elkaar in evenwicht zijn. In de evenwichtssituatie zit er veel meer geosmine of MIB in de vis dan in het water. Dit komt doordat deze stoffen vrij slecht in water en goed in vet oplossen. Daarnaast is er in de evenwichtstoestand een vaste verhouding tussen de concentratie in het water en de concentratie in de vis. Deze verhouding, de bio-concentratiefactor (BCF), is onder andere afhankelijk van de stof, de grote van de vis, de vissoort, de temperatuur en het vetgehalte van de vis. Voor een forel van 200 g, een vetgehalte van 10% is de BCF van geosmine bij 15°C berekend op ongeveer 400. Dit wil zeggen dat in de evenwichtstoestand de concentratie geosmine in de vis 400x hoger is dan de concentratie in het water. Stel dat er 50 ng/l geosmine in het water zit, dan zit er in de evenwichtstoestand in de forel uit het voorbeeld $400 \times 50 = 20.000$ ng/kg (20 µg/kg). Met behulp van deze BCF en de sensorische detectielimiet (zie deel 1) is het mogelijk om te schatten hoeveel geosmine of MIB er maximaal in het water mag zitten om geen grondsmaak te hebben. Als we voor forel een sensorische detectielimiet voor geosmine van 6 µg/kg aannemen, dan is duidelijk dat de forel in het bovenstaande

rekenvoorbeeld zeker grondsmaak zal hebben. Ook kan vastgesteld worden dat de geosmine concentratie in water niet hoger mag worden dan 15 ng/l (6 µg/kg / 400) om grondsmaak te voorkomen. Een dergelijke grenswaarde is natuurlijk van belang voor maatregelen die gericht zijn op het verlagen van de geosmine en MIB concentratie in het kweekwater.

Bio-accumulatie van geosmine en MIB is het netto resultaat van opname en uitscheiding. Beide processen vinden gelijktijdig plaats. Het evenwicht tussen de concentratie geosmine in de vis en in het water is daardoor dynamisch. Dat wil zeggen dat wanneer één van beide concentraties verandert, de andere concentratie mee verandert. Wanneer de waterconcentratie stijgt van 50 naar 60 ng/l, dan stijgt de concentratie in de forel van 20.000 naar 24.000 ng/kg. Omgekeerd werkt het net zo: wordt de forel met daarin 20.000 ng/kg geosmine in water geplaatst waarin 5 ng/l geosmine zit, dan daalt de concentratie in de vis naar $400 \times 5 = 2000$ ng/kg. Opgemerkt moet worden dat er in deze voorbeelden gemakshalve vanuit wordt gegaan dat de geosmine concentratie in het water constant is en niet wordt beïnvloed door opname of uitscheiding van geosmine door de forel. Deze aanname is redelijk zolang het watervolume heel groot is in verhouding tot de hoeveelheid vis.

Modellen

Hoe de concentraties in water en vis zich ontwikkelen in de tijd en wat de evenwichtconcentraties zijn, is te voorspellen met behulp van modelmatige berekeningen. Een hiervoor geschikt theoretisch model is ontwikkeld voor regenboogforel op basis van kennis van bio-accumulatie van verwante organische stoffen. Dit model kan gebruikt worden om te voorspellen hoe snel forellen grondsmaak krijgen of weer kwijt raken bij bepaalde geosmine of MIB



Figuur 2. Ontwikkeling in de tijd van de geosmine concentratie in regenboogforel (200 gr, 10% vet, 15°C)

concentraties in het water. Een voorbeeld berekening wordt weergegeven in figuur 2. Hierin is te zien hoe snel een forel van 200g geosmine opneemt en weer uitscheidt. De geosmine concentratie in het water (ononderbroken lijn, linker y-as) is constant 100 ng/l, hetgeen een vrij hoge maar wel realistische concentratie is op viskwekerijen. De geosmine concentratie in de vis wordt beschreven door de onderbroken lijn (rechter y-as). Het is duidelijk te zien dat de geosmine concentratie snel stijgt in de vis. Al na 7 uur wordt de sensorische detectielimiet (stippel lijn, 6000 ng/kg, rechter y-as) overschreden. Na 200 uur zijn water en vis min of meer in evenwicht; de concentratie in de vis neemt niet meer toe. De evenwichtsconcentratie in de vis is circa 40.000 ng/kg, hetgeen overeenkomt met de waterconcentratie maal de BCF. Na 200 uur wordt de vis in dit voorbeeld overgezet in water zonder geosmine (geosmine concentratie in het water is nul, ononderbroken lijn).

De geosmine concentratie in de vis neemt eerst snel en daarna steeds langzamer af. Na 78 uur in water zonder geosmine duikt de concentratie in de vis weer onder de sensorische detectielimiet en zou grondsmaak niet meer waarneembaar moeten zijn. Uit deze figuur wordt duidelijk dat vissen heel snel grondsmaak krijgen zodra ze worden blootgesteld aan geosmine (of MIB) en dat het vervolgens een stuk langer duurt voordat de grondsmaak weer weg is. Ook is goed te zien dat de grondsmaak steeds langzamer verdwijnt. Dit verklaart waarom vissen die heel veel geosmine of MIB hebben opgenomen heel erg lang moeten afzwemmen.

Hoe snel geosmine en MIB opgenomen en uitgescheiden worden door vis is afhankelijk van vele factoren zoals bijvoorbeeld vissoort, grootte van de vis, vetgehalte en temperatuur. Opname en uitscheiding gaan sneller in warmer water en langzamer

naarmate vissen groter worden.

Zoals gezegd gaan deze berekeningen er vanuit dat de geosmine of MIB concentraties stabiel zijn en niet worden beïnvloed door opname of uitscheiding door de vis. Op een viskwekerij is de situatie anders, daar zit relatief veel vis in relatief weinig water waardoor opname van geosmine door de vis kan leiden tot een daling van de concentratie in het water, afhankelijk van de geosmine aanvoer vanuit biofilms naar het water. Het omgekeerde kan gelden voor een afzwemtank. Daarin kan de geosmine concentratie in het water stijgen doordat de vis geosmine uitscheidt. Hoeveel de waterconcentratie stijgt, is naast de verhouding water-vis, afhankelijk van het verversingsdebiet van de afzwemtank. Als dit debiet te laag is, zal de waterconcentratie van geosmine en MIB niet nul blijven. Het gevolg is dat de vis deze stoffen ook weer op gaat nemen. De netto uitscheidingsnelheid (uitscheiding – opname) wordt daardoor vertraagd; het duurt dus langer voordat de vis grondsmak vrij is. Het goed managen van de afzwemtank is daarom erg belang-

rijk. Ook wanneer er sprake is van een dergelijke interactie tussen concentraties van geosmine of MIB in water en vis is de ontwikkeling van de concentraties in de tijd in beide fracties goed te voorspellen met modelmatige berekeningen.

Onderzoek

De komende drie jaar wordt door IMARES binnen het AquaVlan project en in nauwe samenwerking met de leerstoelgroepen Aquacultuur & Visserij en Toxicologie van Wageningen Universiteit onderzoek gedaan naar de fysiologische achtergronden van opname, distributie, metabolisme en uitscheiding van geosmine en MIB in vis. Onderzocht wordt onder andere in hoeverre modelmatige berekeningen de werkelijke opname en uitscheiding van geosmine en MIB goed beschrijven en of deze toepasbaar zijn voor andere vissoorten. De theoretische kennis die dit onderzoek zal opleveren, biedt naar verwachting onder andere veel aanknopingspunten voor het slim aanpakken en daarmee verbeteren van het afzwemprocedé.



Regenboogforellen