

# Kuldioksid-akkumulering i fuldt recirkulerede anlæg og betydning af vands hårdhed: effekter på tilvækst, foderudnyttelse, nephrocalcinose, fiskesundhed og afgangseffektivitet

Peter Vilhelm Skov (red.)

DTU Aqua-rapport nr. 466-2024





# Kuldioksid-akkumulering i fuldt recirkulerede anlæg og betydning af vands hårdhed: effekter på tilvækst, foderudnyttelse, nephrocalcinose, fiske-sundhed og afgangseffektivitet

Peter Vilhelm Skov (red).<sup>1</sup>, Tilo Pfalzgraff<sup>1</sup>, Malthe Kristensen<sup>1</sup>, Niccolo Vendramin<sup>2</sup>, Tine Iburg<sup>2</sup>, Lone Madsen<sup>2</sup>, Alejandra Alonso<sup>2</sup> og Argelia Cuenca<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Danmarks Tekniske Universitet, Institut for Akvatiske Ressourcer (DTU Aqua), Sektion for Akvakultur

<sup>2</sup> Danmarks Tekniske Universitet, Institut for Akvatiske Ressourcer (DTU Aqua), Sektion for Fiske- og Skaldyrssygdomme

DTU Aqua-rapport nr. 466-2024

## Kolofon

Titel:	Kuldioksid-akkumulering i fuldt recirkulerede anlæg og betydning af vands hårdhed: effekter på tilvækst, foderudnyttelse, nephrocalcinose, fiskesundhed og afgangseffektivitet
Forfattere:	Peter Vilhelm Skov <sup>1</sup> , Tilo Pfalzgraff <sup>1</sup> , Malthe Kristensen <sup>1</sup> , Niccolo Vendramin <sup>2</sup> , Tine Iburg <sup>2</sup> , Lone Madsen <sup>2</sup> , Alejandra Alonso <sup>2</sup> , og Argelia Cuenca <sup>2</sup>  <sup>1</sup> Danmarks Tekniske Universitet, Institut for Akvatiske Ressourcer (DTU Aqua), Sektion for Akvakultur <sup>2</sup> Danmarks Tekniske Universitet, Institut for Akvatiske Ressourcer (DTU Aqua), Sektion for Fiske- og Skaldyrssygdomme
DTU Aqua-rapport nr.:	466-2024
År:	Det videnskabelige arbejde er afsluttet december 2023. Rapporten er udgivet september 2024
Reference:	Skov, P.V., Pfalzgraff, T., Kristensen, M., Vendramin, N., Iburg, T., Madsen, L., Alonso, A. & Cuenca, A. (2024). Kuldioksid-akkumulering i fuldt recirkulerede anlæg og betydning af vands hårdhed: effekter på tilvækst, foderudnyttelse, nephrocalcinose, fiskesundhed og afgangseffektivitet. DTU Aqua. DTU Aqua-rapport nr. 466-2024. <a href="https://doi.org/10.11581/DTU.00000355">https://doi.org/10.11581/DTU.00000355</a>
Forsidefoto:	Afgasningsinstallation på kommercielt lakseopdræt. Foto: Peter Vilhelm Skov
Udgivet af:	Institut for Akvatiske Ressourcer, Danmarks Tekniske Universitet, Henrik Dams Allé, 2800 Kgs. Lyngby
Download:	<a href="http://www.aqua.dtu.dk/publikationer">www.aqua.dtu.dk/publikationer</a>
ISSN:	1395-8216
ISBN:	978-87-7481-406-1

**DTU Aqua-rapporter** er afrapportering fra forskningsprojekter, oversigtsrapporter over faglige emner, redegørelser til myndigheder o.l. Medmindre det fremgår af kolofonen, er rapporterne ikke fagfællebedømt (peer reviewed), hvilket betyder, at indholdet ikke er gennemgået af forskere uden for projektgruppen.

# Forord

Denne DTU Aqua rapport opsummeres resultaterne fra projektet "Kuldioksid-akkumulering i fuldt recirkulerede anlæg og betydning af vands hårdhed: effekter på tilvækst, foderudnyttelse, nephrocalcinose, fiskesundhed og afgasningseffektivitet (KAFREA)". Projektet er finansieret af Den Europæiske Hav- og Fiskerifond og Fiskeristyrelsen, bevillingsnummer 33111-I-21-075.

Gennem samarbejde mellem DTU Aqua og danske erhvervsdeltagere har projektet bidraget med ny viden om, hvordan regnbueørred påvirkes af og håndterer forhøjede CO<sub>2</sub>-koncentrationer i opdrætssystemer, betydningen for vækst, sundhed og sygdom, CO<sub>2</sub>'s betydning for forekomsten af mineralaflejringer i nyren og samspillet med andre vandkvalitetsparametre og foderkemi. Endelig har projektet belyst betydningen af driftsparametre på effektiviteten af afgasningsforanstaltninger i recirkulerede opdrætssystemer.

Projektet er gennemført i perioden 02-03-2021 til 30-09-2023 under ledelse af lektor Peter Vilhelm Skov.

I tillæg til de navngivne forfattere på rapporten har følgende personer bidraget med indsamling af vandprøver, biologisk materiale og data og deltaget i diskussioner af projektets resultater og problemstillinger, for hvilket de skal have tak

- Torsten Snogdal Boutrup, Dyrlæge, M.Sc., Ph.D., AquaPri A/S
- Brian Thomsen, Dansk Akvakultur Producentorganisation
- Thomas Clausen, Dyrlæge, M.Sc. TC FishVet.

Valg af metoder og konklusioner er alene forfatterens ansvar.

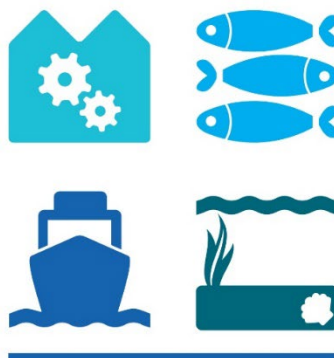
Hirtshals, september 2024

Peter Vilhelm Skov  
Lektor



**Den Europæiske Union**  
**Den Europæiske Hav- og Fiskerifond**

## HAV & FISK



# Indholdsfortegnelse

Forord.....	3
Indholdsfortegnelse.....	4
Resumé.....	5
Abstract.....	6
Baggrund og rationale.....	7
Formål.....	9
Effekter af opløst CO <sub>2</sub> og vands hårdhed på vækst og foderudnyttelse.....	10
Metoder og resultater.....	10
Vækstforsøg.....	10
Appetit.....	12
Appetitregulerende hormoner.....	13
Histologi og mineralaflejringer.....	15
Sygdomspatologi.....	18
Metoder og resultater.....	18
Dødelighed og smitte.....	19
Histologi.....	21
Monitering og prøvetagning fra opdræt.....	22
Metoder og resultater.....	22
Forekomst af nephrocalcinose.....	22
Geografisk variation i vands hårdhed.....	22
CO <sub>2</sub> -målinger.....	24
Afgasning af CO <sub>2</sub> og potentiale for automatisering.....	27
Metoder og resultater.....	27
Afgasningskapacitet og effektivitet.....	27
Diskussion og konklusion.....	32
Referencer.....	34

# Resumé

Til trods for afgasning af CO<sub>2</sub> i recirkulerede opdrætssystemer til akvakultur oplever fisk i produktionen væsentligt forhøjede CO<sub>2</sub>-niveauer, der påvirker deres fysiologi, foderindtag, sygdomsresistens og tilvækst. Denne rapport giver en opsummering af resultater opnået i projektet KAFREA, der havde til formål at belyse effekter af CO<sub>2</sub> på produktionsparametre i regnbueørred, samt i hvilket omfang CO<sub>2</sub> og vands hårdhed er korreleret med forekomsten af nephrocalcinose, en patologisk tilstand, hvor fosfor, calcium og magnesium mineraliseres og udfældes som nyresten.

Resultater fra opdrætsforsøg i ferskvand og saltvand ved 10 og 25 mg opløst CO<sub>2</sub> /l, samt hvor CO<sub>2</sub> indhold fluktuerede mellem 10 og 25 mg / L på døgnbasis, havde en negativ effekt på vækst, foderudnyttelse og kvælstofudskillelse. For ferskvand var der dog først signifikante effekter ved 25 mg CO<sub>2</sub> / L, men i saltvand var der effekter ved alle CO<sub>2</sub>-koncentrationer, med op til 43 % reduktion i vækstrater, og 29 % forringelse af foderudnyttelse og proteinretention. Der kan derfor være store besparelser at hente på foderudnyttelse og miljøpåvirkning ved at begrænse mængden af opløst CO<sub>2</sub> i produktionen.

Opdræt i saltvand og opdræt med fosforberiget foder resulterede i begyndende mineralisering i nyrevævet påvist ved signifikant forhøjede vævsindhold af både fosfor, calcium og magnesium. Histologiske undersøgelser viste ligeledes begyndende tegn på nephrocalcinose. Disse observationer var korreleret med CO<sub>2</sub>-indhold i vandet. Det konkluderes derfor, at disse tre parametre spiller en rolle i forekomsten af nephrocalcinose.

Forsøg med samtidig CO<sub>2</sub>-eksponering og smitte med *Renibacterium salmoninarum*, der forårsager bakteriel nyresyge (BKD), viste ingen interagerende effekt, idet der ikke blev observeret ændringer i dødelighed eller forekomst af nephrocalcinose imellem behandlingerne. Observationen af begyndende nephrocalcinose i overlevende fisk kunne dog indikere, at tidligere smitte med BKD kan være en faktor i forekomsten.

Opdrætsanlæg til regnbueørred er karakteriseret ved at have store regionale forskelle i vandets kemiske sammensætning. Koncentrationen af calcium varierede fra ca. 40 til 130 mg/l, mens koncentrationen af magnesium varierede fra 3 til 24 mg/l. Den beregnede hårdhed varierede fra 7 til 22 dH, hvor det blødeste vand forekom i det vestjyske, og det hårdeste vand i det nordjyske. Da nephrocalcinose ikke blev observeret i fisk opdrættet i hårdt ferskvand, medmindre foderet var fosforberiget, vurderes vands hårdhed alene ikke at udgøre en risikofaktor.

Målinger og modellering af opløste CO<sub>2</sub>-koncentrationer viser, at biomasse tæthed, hydraulisk retentionsstid og udskillelsesraten af CO<sub>2</sub> fra fisk er de mest afgørende parametre for, hvilke CO<sub>2</sub>-koncentrationer fisk oplever i produktionen. Der bør være fokus på fortsat effektivisering af afgasningseffektivitet, og det bør overvejes, om decentraliseret afgasning kan være et virkemiddel for at reducere CO<sub>2</sub>-niveauet i produktionsenheder med henblik på at kunne reducere pumpebehovet til vandudskift.

# Abstract

Despite CO<sub>2</sub> degassing efforts in recirculating aquaculture rearing systems, fish in production experience significantly elevated CO<sub>2</sub> levels that affect their physiology, feed intake, disease resistance and growth. This report summarizes results obtained in the KAFREA project that aimed to elucidate the effects of CO<sub>2</sub> on production parameters in rainbow trout, and to what extent CO<sub>2</sub> and water hardness are correlated with the occurrence of nephrocalcinosis, a pathological condition where phosphorus, calcium and magnesium are mineralized and precipitated as kidney stones.

Results from rearing trials in freshwater and saltwater at 10 and 25 mg dissolved CO<sub>2</sub> /l, and where CO<sub>2</sub> content fluctuated between 10 and 25 mg/l on a daily basis, had a negative effect on growth, feed utilization, and nitrogen excretion. For freshwater, however, there were only significant effects at 25 mg CO<sub>2</sub> /l, but in saltwater there were effects at all CO<sub>2</sub> concentrations, with up to 43% reduction in growth rates, and a 29% loss in feed utilization efficiency and protein retention. Therefore, there may be significant savings in feed utilization and environmental impact by limiting the amount of dissolved CO<sub>2</sub> in production.

Rearing in salt water and rearing with phosphorus-enriched feed resulted in the onset of mineralization in the kidney tissue, demonstrated by significantly elevated tissue levels of phosphorus, calcium and magnesium. Histological examinations also showed early signs of nephrocalcinosis. These observations were correlated with CO<sub>2</sub> content in the water. It is therefore concluded that these 3 parameters play a role in the occurrence of nephrocalcinosis.

Experiments with simultaneous CO<sub>2</sub> exposure and infection with *Renibacterium salmoninarum*, which causes bacterial kidney disease (BKD), showed no interacting effect, as no changes in mortality or incidence of nephrocalcinosis were observed between treatments. However, the observation of incipient nephrocalcinosis in surviving fish could indicate that previous infection with BKD may be a factor.

Rainbow trout farms are characterized by large regional differences in the chemical composition of the water. Calcium concentrations ranged from approximately 40 to 130 mg/l, while magnesium concentrations ranged from 3 to 24 mg/l. The calculated hardness varied from 7 to 22 dH, with the softest water occurring in western Jutland and the hardest water in northern Jutland. As nephrocalcinosis was not observed in fish farmed in hard freshwater unless the feed was phosphorus-enriched, water hardness alone is not considered a risk factor.

Measurements and modelling of dissolved CO<sub>2</sub> concentrations show that biomass density, hydraulic retention time, and the rate of CO<sub>2</sub> excretion from fish are the most crucial parameters for the CO<sub>2</sub> concentrations experienced by fish in production. Focus on continuing to improve degassing efficiency is crucial, and it should be considered whether de-centralized degassing can be a means of reducing CO<sub>2</sub> levels in production units in order to reduce the need for pumps for water replacement.



# Baggrund og rationale

Udviklingen af teknologi til recirkulerede opdrætsanlæg har været under vækst i Danmark og udlandet i flere årtier. I Danmark startede recirkulationskonceptet med åleopdræt i begyndelsen af 1980'erne, og konceptet blev i de kommende årtier modificeret til implementering i de såkaldte modeldambrug, først type 1 og siden type 3. I det seneste årti har man mere eller mindre forladt videreudviklingen af modeldambrugstypen, til dels fordi man i stigende grad fokuserer på udviklingen af de fuldt recirkulerede anlæg (FREA). En fællesnævner for hele udviklingsprocessen har været et ønske om at nedbringe afhængigheden af vandindtag ved at øge recirkuleringsgraden (Martins et al., 2010). Dette har efterfølgende drevet en udvikling af renseforanstaltninger, primært fjernelsen af opløste og partikulære næringsstoffer i anlægget, samt slutrensning (Dalsgaard et al., 2013). I takt med at recirkuleringsgraden stiger, stiger også akkumuleringen af opløst kuldioksid (CO<sub>2</sub>), et respiratorisk affaldsprodukt fra nedbrydning af protein, fedt og kulhydrat.

Når der er balance mellem atmosfæren og vandet vil mængden af opløst CO<sub>2</sub> ligge mellem 0,5 og 0,9 mg per liter afhængigt af temperatur og eventuel salinitet. Da CO<sub>2</sub> har en højere masse end ilt udskiller fisk typisk ca. 1,4 gange så meget CO<sub>2</sub>, som de forbruger ilt. I et anlæg med regnbueørred, og hvor fiskene har et gennemsnitligt iltforbrug på 150 mg O<sub>2</sub>/kg/time, vil det daglige iltforbrug være 3,6 kg O<sub>2</sub>/ton/dag, og den mængde CO<sub>2</sub>, der udskilles fra fiskene, vil derfor være ca. 5 kg CO<sub>2</sub> per ton fisk per døgn. Hvis fisk går ved en tæthed på 50 kg/m<sup>3</sup>, svarer dette til at der tilføres 18 mg CO<sub>2</sub> per liter vand i døgnnet i tillæg til bidrag fra andre iltforbrugende processer i anlægget, som f.eks. biofilter og nedbrydning af organisk materiale i vandet. Uden eller med utilstrækkelig afgasning resulterer dette i en akkumulering af opløst CO<sub>2</sub> over tid. Typisk vil værdier for opløst CO<sub>2</sub> ligge omkring 10 mg/l kort efter indsættelse af sættefisk, og dette kan stige til over 25 mg/l i takt med, at biomassen i anlægget vokser.

Det er velkendt, at laks er stærkt følsomme overfor forhøjede CO<sub>2</sub>-koncentrationer i vandet, bl.a. ved at de allerede ved 10 mg CO<sub>2</sub>/l udviser forringet foderkonvertering (Khan et al., 2018). Litteraturen for regnbueørred er stærkt varierende. Visse studier indikerer, at regnbueørred nærmest er upåvirkelige af CO<sub>2</sub> ved høje koncentrationer (25 mg/l) (Good et al., 2010; Smart et al., 1979), mens andre forsøg viser en markant forringelse af foderkonvertering også ved lave koncentrationer, i tillæg til tab af appetit (Danley et al., 2005). Pilotforsøg udført ved DTU Aqua på regnbueørred viser, at under korttids-eksponering forværres foderkonverteringen med op til 20 % ved 25 mg CO<sub>2</sub>/l (Skov, 2019). Reduceret foderkonvertering er en væsentlig merudgift for opdrættere og bidrager desuden med en øget kvælstofudledning, der er proportionel med det øgede foderforbrug.

Den fysiologiske årsag til, at forhøjede CO<sub>2</sub>-koncentrationer resulterer i øget foderforbrug, er formentlig flersidig. Den første umiddelbare konsekvens af forhøjede CO<sub>2</sub>-koncentrationer i opdrætsvand er en forsuring af blodet, med reduceret ilttransportkapacitet som følge. Over tid vil fisken være i stand til, at regulere blodets pH, men ikke kunne undgå at skulle bruge øget energi på at ventilere, som ultimativt koster på foderkonverteringen.

Der er generelt en mangel på resultater fra langtidsforsøg til at give en tilstrækkelig vurdering, og det er sandsynligt, at der er flere faktorer i spil end blot CO<sub>2</sub>. Opdræt af regnbueørred ved forhøjede CO<sub>2</sub>-niveauer medfører en øget risiko for forekomsten af nyresten (nephrocalcinose). Nyresten i fisk består af krystalliseret calcium med indlejret magnesium og fosfor (Klykken et al., 2022; Smart et al., 1979). Det er uklart, om det er en pH-induceret (forårsaget af høj ilt eller CO<sub>2</sub>) forsuring af blodet (Hosfeldt et al., 2008; Minarova et al., 2023), der driver denne proces, eller om processen i højere grad er drevet af de opløste mængder calcium, magnesium og fosfor i opdrætsvandet og i foderet. Forekomsten af nyresten resulterer i patologiske forandringer og en kronisk inflammatorisk tilstand i nyren, der,

afhængig af sværhedsgraden, vil påvirke nyrefunktion og resultere i begrænsninger i fiskens evne til at omsætte energi. Forekomsten af nyresten er reelt set ikke begrænset til nyrene, men kan også forekomme i skeletmuskulaturen over nyren og give punktblødninger i det omkringliggende væv og organer (blødningssyndrom). Dette reducerer kvaliteten og giver reduceret slagteudbytte. Forekomsten af nephrocalcinose lader til at have været stigende i de seneste år i opdræt af laksefisk, og formodes at være forbundet med recirkuleringsgraden i opdrætsanlæg.

Det er velkendt, at flere bakterier og vira udviser selektivitet for at opformere sig i nyrevævet, og at dette giver nedsat nyrefunktion. Den inflammatoriske tilstand i nyren forårsaget af nephrocalcinose kan potentielt kompromittere nyrens immunfunktion og vanskeliggøre fiskens evne til at bekæmpe infektion.

Mængden af opløst calcium og magnesium i vand er et udtryk for vandets hårdhed, som måles i hårdhedsgrader (dH). Hårdheden af grundvandet i Danmark varierer fra blødt (4-8 dH) til meget hårdt (24-30 dH) fra vest mod øst og resulterer i store variationer i hårdheden af det vand individuelle anlæg indtager fra borer og væld. Blødt vand forekommer hovedsageligt i den nordvestlige del af region Syddanmark og den sydvestlige del af region Midtjylland. Den jyske højderyg er karakteriseret ved middelhårdt vand (8-12 dH), og den jyske østkyst og Limfjordens opland har primært hårdt vand (12-18 dH). Om end det ikke er tidligere undersøgt, vurderes det som sandsynligt, at vandets hårdhed spiller en rolle i, hvor stor sandsynligheden er for udviklingen af nephrocalcinose.

Effektiv fjernelse af CO<sub>2</sub> fra opdrætsvandet kræver dedikerede afgasningsinstallationer. Disse er energimæssigt omkostningstunge, fordi de kræver flytning af store mængder vand og tilførsel af store mængder luft. I anlæg til lakseproduktion kan afgasning udgøre 15 % eller mere af de samlede energiodgifter. Det er derfor relevant at optimere disse processer i forhold til, hvornår det er nødvendigt at afgasse, hvordan afgasningsinstallationer konfigureres, og hvordan opdrætsvandets kemiske beskaffenhed påvirker afgasning. Sidstnævnte parameter har relevans, fordi opløst CO<sub>2</sub> kan veksle mellem gasform og opløst form (bikarbonat, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), der er betinget af vandets bufferkapacitet (alkalinitet) og pH.

Projektets overordnede formål er at opnå en forbedret forståelse af

- konsekvenserne af forhøjede mængder CO<sub>2</sub> i relation til foderudnyttelse og næringsstofudledning ved produktion af regnbueørred
- de afledte patologiske forandringer i nyrevævet, der måtte opstå
- opståede inflammatoriske tilstande i nyren og den afledte reduktion i sygdomsresistens
- betydningen af vandets hårdhed
- potentialet, effektiviteten og nødvendigheden af afgasningsinstallationer.

Denne viden kan direkte overføres til etablering af retningslinjer vedrørende CO<sub>2</sub> for regnbueørredopdræt i fuldt recirkulerede anlæg med henblik på optimering af foderudnyttelse og kvælstofretention. Sådanne retningslinjer vil i tillæg kunne have bredere anvendelse på andre typer anlæg samt give basis for anbefalinger omkring placering af fremtidige FREA-anlæg i relation til den kemiske sammensætning af vandkilder og en effektiv implementering af afgasningsforanstaltninger.

# Formål

De specifikke mål med dette projekt var at belyse følgende:

- Hvordan påvirkes vækst, foderudnyttelse og kvælstofudskillelse hos regnbueørred opdrættet i vand af forskellige hårdhedsgrader (blødt, mellemhårdt, hårdt og ekstremt hårdt) under kronisk eksponering for kuldioksid? Hvordan påvirkes vækst, foderudnyttelse og kvælstofudskillelse i regnbueørred opdrættet i vand med 2 forskellige hårdhedsgrader kombineret med 2 niveauer af kuldioksidkoncentrationer, der fluktuerer på døgnbasis?
- Hvordan påvirker vandets hårdhed, CO<sub>2</sub>-koncentrationer og eksponeringsform (konstant versus fluktuerende) forekomsten af nephrocalcinose, mineralaflejringernes kemiske sammensætning og forekomsten og sværhedsgraden af patologiske forandringer i nyren?
- Påvirker CO<sub>2</sub>-eksponering regnbueørreds overlevelse, immunstatus og nyrens infektionsstatus ved eksponering for et mikrobielt nyrepatogen?
- Hvilke hårdhedsgrader karakteriserer opdrætsanlæg fra forskellige geografiske områder i Danmark (Jylland)?
- Påvirkes opløseligheden af CO<sub>2</sub> og vandets karbonatkemi af hårdhed, og har det en betydning for afgangseffektivitet?
- Kan CO<sub>2</sub>-afgasning optimeres i forhold til nuværende praksis, og er der potentiale for energieffektivisering, f.eks. gennem automatisering af afgangningen?

# Effekter af opløst CO<sub>2</sub> og vands hårdhed på vækst og foderudnyttelse

Hensigten med dette afsnit er at påvise, hvordan opløst CO<sub>2</sub> påvirker produktion af regnbueørred, gennem en vurdering af effekter af forskellige koncentrationer opløst CO<sub>2</sub> og vandets hårdhed på vækst, foderudnyttelse samt proteinretention.

Der blev gennemført 3 opdrætsforsøg med 4 forskellige CO<sub>2</sub>-niveauer: en kontrolkoncentration, hvor CO<sub>2</sub> afgasses og holdes så lav som muligt, koncentrationer på 10 og 25 mg CO<sub>2</sub>/l (der holdes konstant) samt fluktuerende koncentrationer mellem 10 og 25 mg CO<sub>2</sub>/l i henholdsvis ferskvand og saltvand ved fodring med almindeligt kommercielt foder. CO<sub>2</sub> i individuelle kar blev kontrolleret ved hjælp af pH-prober med automatiseret tilførsel af ren CO<sub>2</sub>. Hver forsøgsrække blev gennemført i tripliket med en varighed af 2 måneder for at bestemme specifikke vækstrater (% vækst/dag), foderudnyttelse (FCR, kg foder/kg tilvækst) samt proteinretention (N-udskillelse/N-indtag) og til forskellige evalueringer af, hvorvidt der var forekomst af nephrocalcinose ved udtagelse af nyrevæv til kvantificering af mineralaflejringer og histopatologiske undersøgelser.

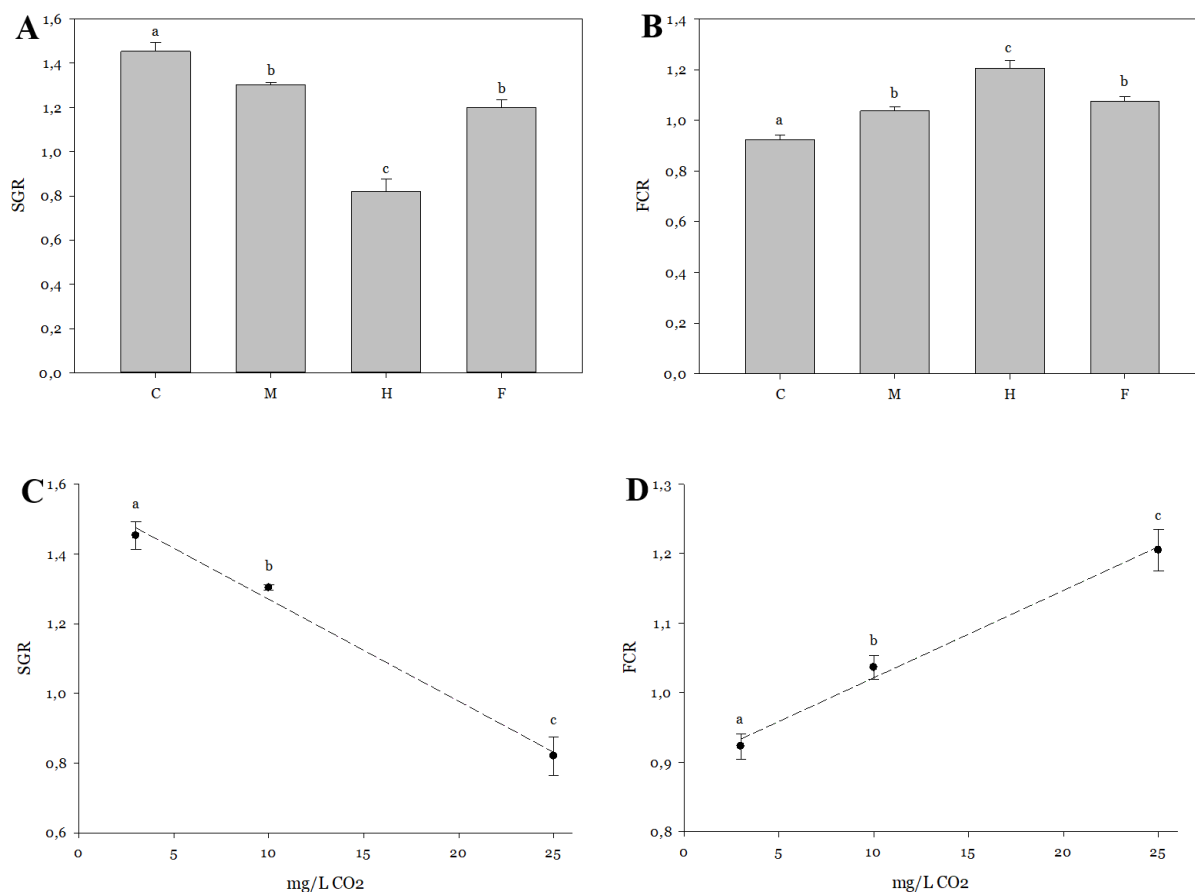
Rationalet for at anvende fluktuerende CO<sub>2</sub>-koncentrationer er dels, at fisk kan udvise en tilpasnings-evne til vandkvalitetsparametre, der holdes konstante, hvorimod det vil medføre en øget belastning for fisken at skulle tilpasse sig svingende niveauer. Fluktuerende CO<sub>2</sub>-koncentrationer forekommer i anlæg med utilstrækkelig afgasningskapacitet, fordi den største CO<sub>2</sub>-tilførsel til opdrætsvandet kommer, når fiskene har det højeste stofskifte, hvilket falder sammen med dagtimerne, hvor fiskene fodres.

## Metoder og resultater

Opdrætsforsøg med vand af varierende hårdheder blev gennemført med 2 faste CO<sub>2</sub>-koncentrationer på henholdsvis 10 og 25 mg CO<sub>2</sub>/l samt med fluktuerende CO<sub>2</sub>-koncentrationer, der steg fra 10 mg/l om morgenen til 25 mg/l sidst på eftermiddagen. Fisk blev fodret med en fast ration af kommercielt ørredfoder (EFICO Enviro 920, BioMar, 13 %/dag) ved brug af bælteautomater, således at foder blev leveret over en 8 timers periode fra kl. 8 – 16. Fisk blev indvejet ved forsøgets start, mellemvejet halvvejs igennem forsøget og slutvejet. Endvidere blev der gennemført et vækstforsøg med foder med forhøjet fosforindhold. Ved slutvejning blev der udtaget fisk til histologiske undersøgelser og til bestemmelse af mineralindhold i nyre, tarm og skeletmuskulatur. Hjerne, tarm og lever blev udtaget til bestemmelse af appetitregulerende hormoner. Efter slutvejning blev der gennemført et *ad libitum*-fodringsforsøg for at bestemme maksimalt foderindtag ved de forskellige CO<sub>2</sub>-behandlinger, og der blev udtaget blodprøver til bestemmelse af fiskenes syre-basestatus.

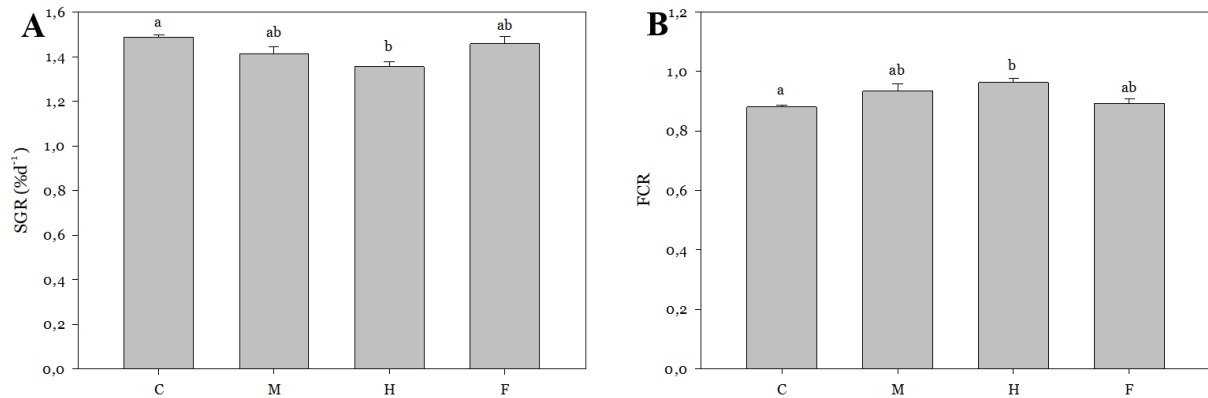
## Vækstforsøg

Under vækstforsøg i ekstremt hårdt vand var appetitten påvirket i så svær grad, at selv ved en begrænset daglig ration var der foderspild i den højeste CO<sub>2</sub>-behandling. Foderkonvertering (FCR, kg foder/kg vækst) var signifikant påvirket og steg fra 0,92 i kontrolgruppen til 1,21 for 25 mg CO<sub>2</sub>/l, medens FCR for 10 mg CO<sub>2</sub>/l-behandlingen var midt imellem (1,03). I gruppen med fluktuerende CO<sub>2</sub> var FCR ikke anderledes end for 10 mg/l-behandlingen (1,04) (Figur 1). Ligeledes faldt den specifikke vækstrate signifikant under alle CO<sub>2</sub>-regimer sammenlignet med kontrolgruppen.



**Figur 1. Specifik vækstrate (SGR, %/dag) (panel A) og foderkonvertering (FCR, kg foder/kg tilvækst) (panel B) for regnbueørred holdt ved enten 10 mg CO<sub>2</sub>/l (M), 25 mg CO<sub>2</sub>/l (H) eller fluktuerende mellem 10 og 25 mg/l (F) og under kontrol (C) i meget hårdt vand (fuldstyrke havvand). I panel C og D er den fluktuerende gruppe fjernet for at illustrere den lineære korrelation mellem opløst CO<sub>2</sub> og SGR ( $SGR \text{ %/dag} = -0,029 \times [CO_2] + 1,56$ ) og FCR ( $FCR \text{ (kg foder/kg tilvækst)} = -0,029 \times [CO_2] + 0,92$ ). Foderkonvertering steg mere end 30 % i grupperne eksponeret for det højeste CO<sub>2</sub>-niveau ved sammenligning med kontrol. En kombination af reduceret foderindtag og forringet foderkonvertering medførte, at den specifikke vækstrate (SGR) faldt fra 1,44 %/dag i kontrolgruppen til 0,81 %/dag i gruppen med 25 mg CO<sub>2</sub>/l – en relativ reduktion i vækstrate på 43 %, og et fald i N-retention på 25 %.**

Under forsøg med middelhårdt vand var effekten af opløst CO<sub>2</sub> mindre udtalt end ved ekstremt hårdt vand, og den negative effekt af CO<sub>2</sub> var kun signifikant ved den højeste testede koncentration på 25 mg/l. Her ændrede foderkonvertering og vækstrater sig kun marginalt (5-10 %) i forhold til kontrolgruppen, og fiskene spiste deres fulde foderration (Figur 2).

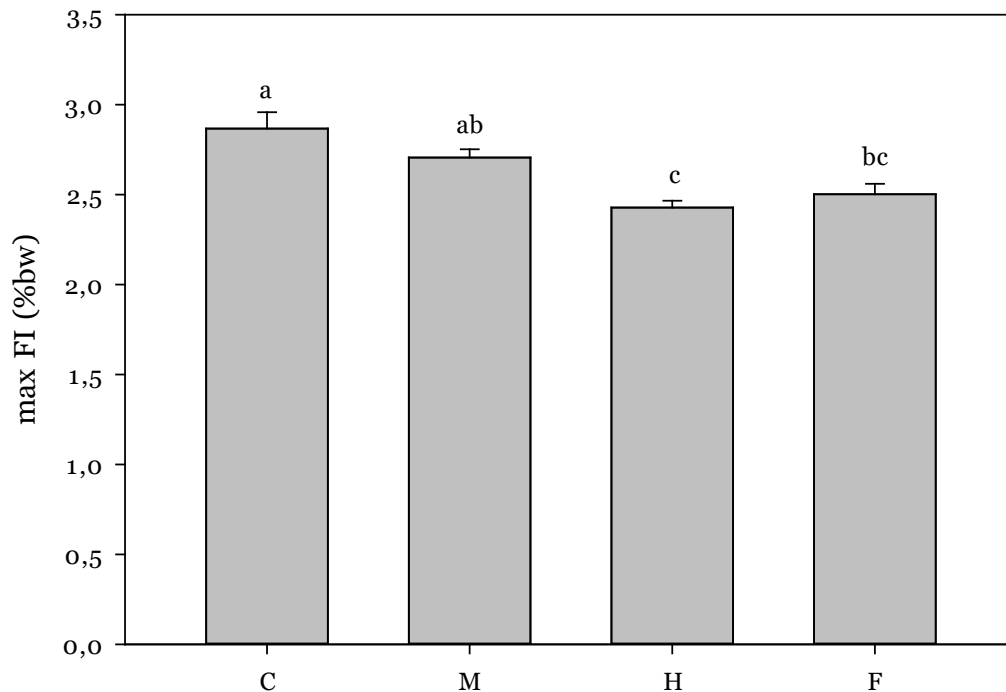


**Figur 2. Specifik vækstrate (SGR, %/dag) (panel A) og foderkonvertering (FCR, kg foder/kg tilvækst) (panel B) for regnbueørred holdt ved 10 mg CO<sub>2</sub>/l (M) og 25 mg CO<sub>2</sub>/l (H) eller fluktuerende mellem 10 og 25 mg CO<sub>2</sub>/l (F) og under kontrol (C) i hårdt ferskvand (dH 22). Ændringer i foderkonvertering var signifikante, men meget små (op til 10 % i forhold til kontrol). I kraft af at indtag af den daglige ration ikke var påvirket, var ændringer i den specifikke vækstrate (SGR) også marginale. N-retention var langt mindre påvirket end ved opdræt i meget hårdt vandt og faldt med mindre end 10 %.**

## Appetit

Maksimalt foderindtag blev evalueret ved afslutningen på vækstforsøget med middelhårdt vand. Her blev fiskene fodret ad libitum over 8 timer, og foderspild blev opsamlet og kvantificeret efter hver dags fodring. Dette blev gentaget 4 dage i træk for at udregne et gennemsnitligt foderindtag per kar, og efterfølgende per CO<sub>2</sub>-behandlingsgruppe.

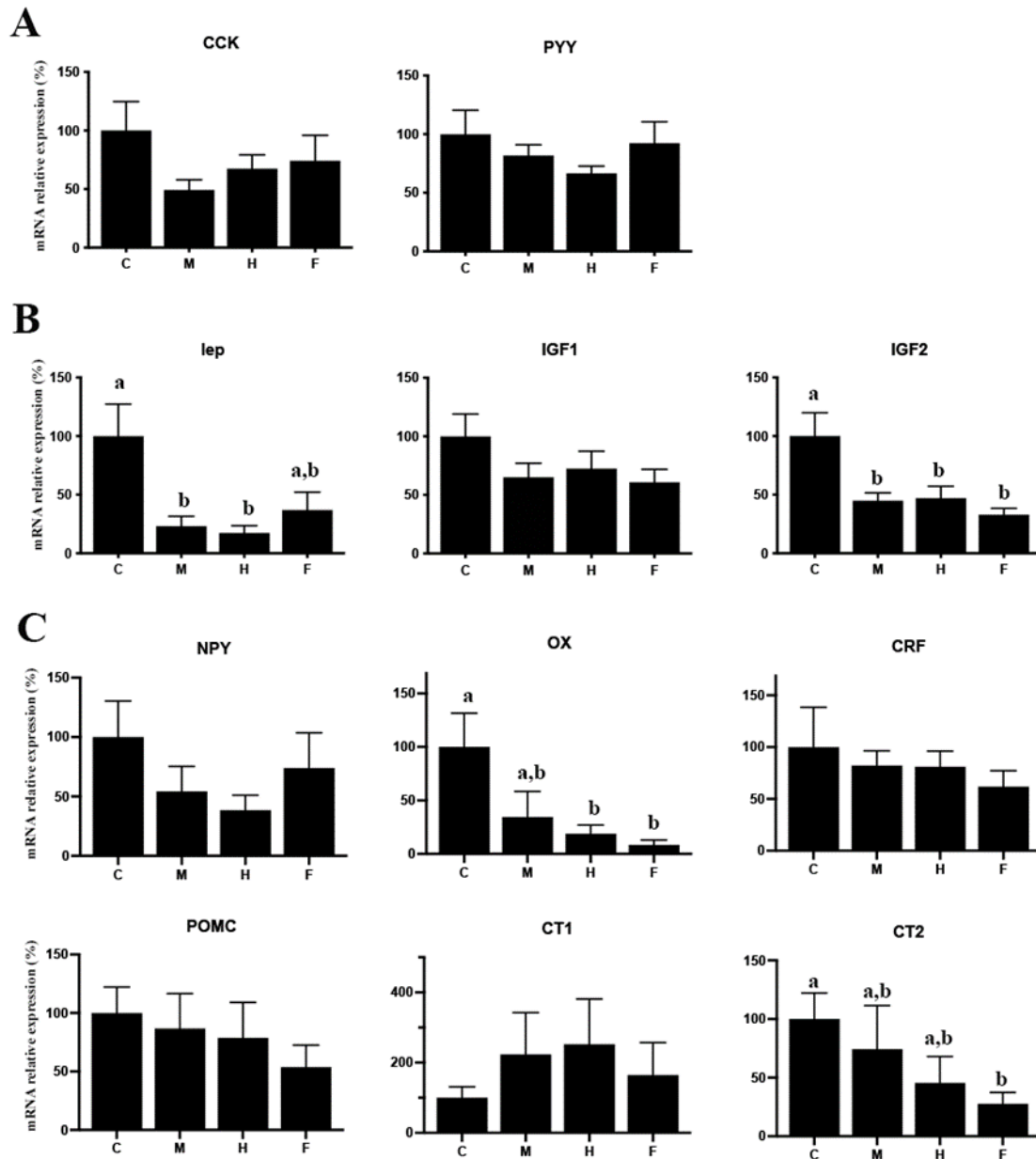
I fisk, der blev eksponeret for 10 mg CO<sub>2</sub>/l, var det et lille, men ikke statistisk signifikant fald i maksimalt foderindtag fra 2,8 % i kontrolgruppen til 2,65 % i 10 mg-gruppen (M). Både den højeste CO<sub>2</sub>-koncentration (25 mg/l, H) og den fluktuerende (10 – 25 mg/l, F) viste signifikant reduktion i foderindtag med fald til henholdsvis 2,5 %/ dag og 2,6 %/ dag (Figur 3).



**Figur 3.** Maksimalt dagligt foderindtag hos regnbueørred bestemt som et gennemsnit efter 4 dages *ad libitum*-fodring udtrykt som et gennemsnit for 3 kar per behandling i hårdt ferskvand (dH 22). Fisk blev holdt ved 10 mg CO<sub>2</sub>/l (M), 25 mg CO<sub>2</sub>/l (H) eller fluktuerende mellem 10 og 25 mg CO<sub>2</sub>/l (F) og under kontrol (C).

### Appetitregulerende hormoner

Der kunne observeres en tydelig korrelation mellem mRNA-niveauer af de forskellige appetitregulerende hormoner. Omend flere ikke var signifikant forskellige, var der tydelige tendenser, især peptid Y, IGF 1, og neuropeptid Y. I levervæv viste expressionen af leptin signifikant reduktion for både 10 og 25 mg CO<sub>2</sub>/l, mens IGF2 var signifikant reduceret for alle CO<sub>2</sub>-behandlinger. I hjernen var orexin-niveauer signifikant reduceret i både 25 mg CO<sub>2</sub>/l-gruppen samt i den fluktuerende gruppe, medens kokain- og amfetaminreguleret transkript var signifikant reduceret i den fluktuerende gruppe (Figur 4).



Figur 4. Effekter af forskellige CO<sub>2</sub>-regimer på mRNA-ekspression af forskellige appetitregulerende hormoner i tarm (panel A), lever (panel B) og hjerne (panel C). CCK, cholecystokinin; PYY, peptid Y; lep. Leptin; IGF1 & 2, insulin-agtig vækstfaktor 1 & 2; NPY, neuropeptid Y; OX, orexin; CRF, corticotropin frigivende faktor; POMC, proopiomelanocortin; CT1 & 2, kokain- og amfetaminreguleret transcript. Værdier, der ikke deler samme bogstav, er signifikant forskellige fra hinanden, n = 7.



## Histologi og mineralaflejring

Makroskopisk undersøgelse af nyren viste ingen tegn på nephrocalcinose, hvorimod begyndende tegn på nephrocalcinose var synlige i de histologiske undersøgelser og mineralanalyser fra visse behandlinger.

Forskellige CO<sub>2</sub>-behandlinger havde ingen effekt på vævsindhold af calcium, kobber, jern, kalium, magnesium, natrium, fosfor eller zink i tarm- og muskeltvæv. Fisk, der var blevet udsat for 25 mg CO<sub>2</sub>/l, havde nyrevævs-koncentrationer af calcium, der var 4 gange højere end i kontrolgruppen, magnesiumkoncentrationer, der var 15 % højere, og fosforkoncentrationer der var 26% højere. CO<sub>2</sub>-eksponering påvirkede ikke de øvrige mineral-koncentrationer. Hos fisk, der blev udsat for 10 mg CO<sub>2</sub>/l eller fluktuerende CO<sub>2</sub>-koncentrationer, blev der observeret en tendens til stigende vævskoncentrationer af calcium, magnesium og fosfor, men disse var ikke signifikant forskellige fra kontrolgruppens værdier (Tabel 1). Disse resultater giver en væsentlig indikation om at, til trods for at de histologiske analyser ikke viste omfattende tegn på nephrocalcinose, kan forhøjede CO<sub>2</sub>-koncentrationer i opdrætssystemerne kobles til en øget aflejring af mineraler i nyrevævet, der er relevante for forekomsten af nephrocalcinose.

**Tabel 1. Mineralindhold i (A) nyrevæv, (B) tarm og (C) skeletmuskulatur fra regnbueørred udsat for forskellige CO<sub>2</sub>-behandlinger efter 52 dage. C = Kontrol, M = 10 mg CO<sub>2</sub>/l, H = 25 mg CO<sub>2</sub>/l, F = fluktuerende CO<sub>2</sub>. Værdier, der ikke deler samme bogstav, er signifikant forskellige fra hinanden, n = 9.**

<b>A</b>	<b>Ca</b>	<b>Cu</b>	<b>Fe</b>	<b>K</b>	<b>Mg</b>	<b>Mn</b>	<b>Na</b>	<b>P</b>	<b>Zn</b>
	µg/g	µg/g	µg/g	mg/g	µg/g	µg/g	µg/g	mg/g	µg/g
C	707.4 ± 146.6 <sup>a</sup>	5.5 ± 0.2	335.2 ± 22.3	11.1 ± 0.3	578.9 ± 15.7 <sup>a</sup>	3.4 ± 0.1	6128.3 ± 220.3	10.9 ± 0.3 <sup>a</sup>	97.0 ± 2.8
M	1377.4 ± 405.2 <sup>ab</sup>	5.3 ± 0.2	313.9 ± 23.7	11.2 ± 0.3	584.3 ± 11.8 <sup>ab</sup>	4.0 ± 0.2	6162.0 ± 132.2	11.6 ± 0.2 <sup>ab</sup>	108.0 ± 2.7
H	2698.4 ± 466.6 <sup>b</sup>	6.0 ± 0.2	321.1 ± 18.7	13.0 ± 0.7	667.0 ± 27.0 <sup>b</sup>	4.8 ± 0.4	6452.9 ± 197.3	13.7 ± 0.6 <sup>b</sup>	122.4 ± 7.4
F	2060.1 ± 723.5 <sup>ab</sup>	5.8 ± 0.3	305.4 ± 24.9	11.5 ± 0.6	624.9 ± 34.8 <sup>ab</sup>	4.3 ± 0.5	6374.4 ± 438.4	12.2 ± 0.8 <sup>ab</sup>	109.2 ± 6.9

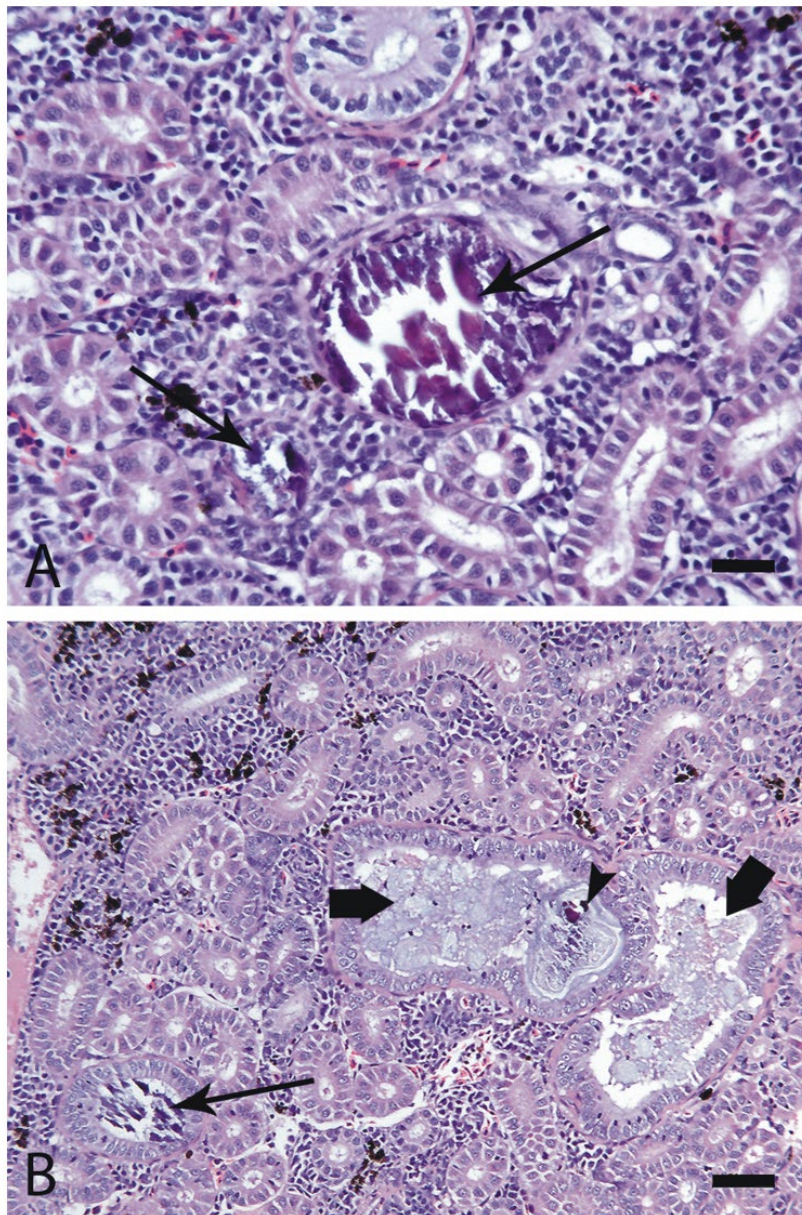
<b>B</b>	<b>Ca</b>	<b>Cu</b>	<b>Fe</b>	<b>K</b>	<b>Mg</b>	<b>Mn</b>	<b>Na</b>	<b>P</b>	<b>Zn</b>
	µg/g	µg/g	µg/g	mg/g	µg/g	µg/g	µg/g	mg/g	µg/g
C	413.6 ± 10.7	5.7 ± 1.2	65.4 ± 15.4	12.2 ± 0.2	648.7 ± 23.5	6.0 ± 1.8	4555.0 ± 418.2	10.2 ± 0.3	2054.2 ± 362.6
M	345.5 ± 10.7	5.5 ± 0.3	67.3 ± 10.5	12.5 ± 0.7	667.5 ± 62.1	5.3 ± 1.3	4347.8 ± 248.8	10.4 ± 0.5	2528.2 ± 398.6
H	416.6 ± 18.3	6.0 ± 0.4	57.4 ± 3.6	12.1 ± 0.5	647.0 ± 12.4	7.5 ± 1.1	4241.6 ± 180.3	10.5 ± 0.2	2570.6 ± 532.7
F	360.1 ± 8.2	5.9 ± 0.4	73.4 ± 10.1	12.6 ± 0.6	637.0 ± 14.4	5.9 ± 1.3	4339.1 ± 482.9	10.3 ± 0.2	2169.0 ± 191.8

<b>C</b>	<b>Ca</b>	<b>Cu</b>	<b>Fe</b>	<b>K</b>	<b>Mg</b>	<b>Mn</b>	<b>Na</b>	<b>P</b>	<b>Zn</b>
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	g/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	g/kg	mg/kg
C	302.0 ± 16.0	1.9 ± 0.2	15.0 ± 2.4	18.0 ± 0.4	1168.3 ± 28.6	1.3 ± 0.6	1048.1 ± 35.1	10.9 ± 0.2	19.0 ± 0.8
M	266.8 ± 7.4	1.6 ± 0.1	11.6 ± 3.0	18.0 ± 0.1	1185.5 ± 5.2	1.0 ± 0.4	1002.9 ± 46.9	10.9 ± 0.1	16.4 ± 0.2
H	344.1 ± 29.5	1.7 ± 0.1	9.4 ± 0.4	18.3 ± 0.9	1186.5 ± 33.6	0.7 ± 0.2	1055.4 ± 50.4	10.9 ± 0.4	17.2 ± 0.1
F	263.1 ± 23.0	1.4 ± 0.1	8.0 ± 1.2	17.8 ± 1.0	1105.5 ± 45.2	0.5 ± 0.1	1044.5 ± 81.7	10.4 ± 0.5	17.2 ± 1.4

De histologiske undersøgelser afslørede begyndende kalcificering i fisk, der var eksponeret for 10 og 25 mg CO<sub>2</sub>/l og i gruppen med fluktuerende CO<sub>2</sub>-indhold, uafhængigt af vandets hårdhed, medens der ikke var tegn på kalcificering i kontrolgrupper. Tegn på kalcificering forekom hyppigst i fisk fra

grupperne eksponeret for 25 mg CO<sub>2</sub>/l, og disse grupper viste desuden tegn proteinholdige aflejringer i nyre-tubuli og -samlekanaler (Figur 5).



**Figur 5. (A)** Eksempel på udvidede og uregelmæssige samlekanaler med mucin-agtigt basofil-indhold (tynde pile) og tab af epithelium i tværsnit af nyre. Bjælke = 28 µm. **(B)** Tubuli med mørke basofile mineralaflejringer i lumen (tykke pile), der sandsynligvis udgør forankringen af mineralaflejringer/kalcificering af nyretubuli (pilehoved). Bjælke = 56 µm. Farvet med hematoxylin og eosin (H&E). Kalkaflejringer bekræftet med von Kossa-farvning, der indikerer calcium.

Den samlede scoring af forekomsten af tegn på begyndende nephrocalcinose er vist i tabel 2. Ni tilfældige fisk fra hver behandling blev undersøgt histologisk. Overordnet set var der ingen forekomst af eller tegn på nephrocalcinose i fisk opdrættet i ferskvand på standarddiæter, hvorimod opdræt i havvand resulterede i øget indikation på nephrocalcinose relateret til CO<sub>2</sub>-eksponering. I ferskvand, når fisk blev opdrættet på en diæt, der indeholdt overskydende fosfor, forekom der indikationer på nephrocalcinose i alle behandlinger, også kontrolgruppen. Også her blev forekomst mere hyppig med stigende CO<sub>2</sub>-eksponering, hvor 2/3 af fiskene udviste tegn på nephrocalcinose ved 25 mg CO<sub>2</sub>/l.

**Tabel 2. Forekomst af histologiske indikationer på begyndende nephrocalcinose efter 6-8 ugers opdræt i enten havvand eller ferskvand på en kommerciel standarddiæt (EFICO Enviro 920 Advance, BioMar A/S) indeholdende 0,8 % fosfor, eller på en diæt med øget forsforindhold (1,9%). Ingen fisk opdrættet i ferskvand viste tegn på nephrocalcinose, hvorimod opdræt i havvand medførte tegn på nefrocalcinose relateret til CO<sub>2</sub>-eksponering. Alle fisk, inklusive kontrolgruppen, opdrættet på højfosfordiæt viste tegn på nephrocalcinose, som ligeledes blev hyppigere med øget CO<sub>2</sub>-eksponering.**

	Havvand Standarddiæt	Ferskvand Standarddiæt	Ferskvand Høj fosfor diæt
Kontrolgruppe	Ingen obs.	Ingen obs.	2/9
10 mg CO <sub>2</sub> /l (M)	1/9	Ingen obs.	3/9
25 mg CO <sub>2</sub> /l (H)	3/9	Ingen obs.	6/9
10 – 25 mg CO <sub>2</sub> /l (F)	1/9	Ingen obs.	4/9

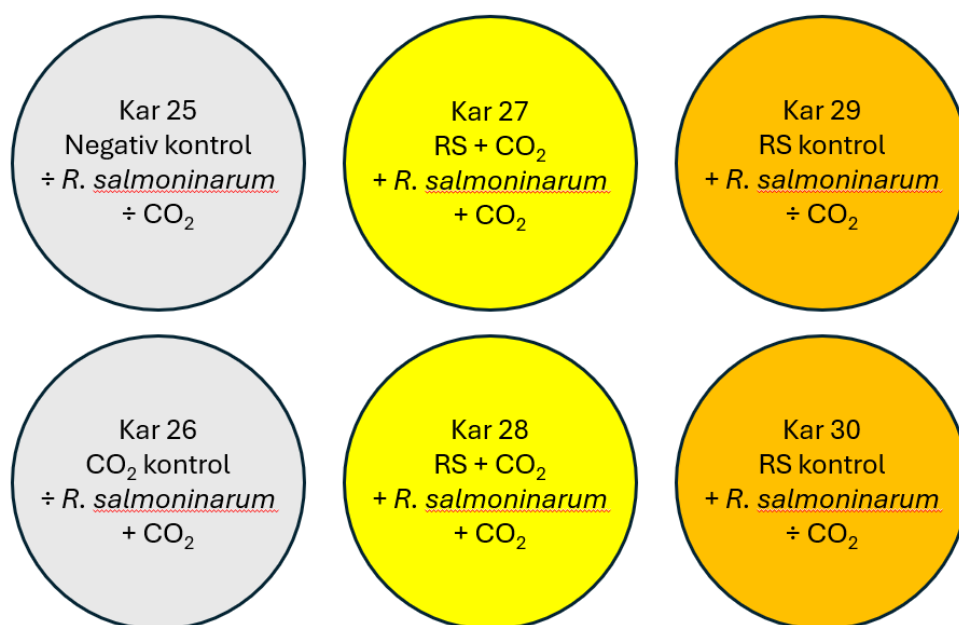
# Sygdomspatologi

For at belyse sammenhænge mellem eksponering for forhøjede CO<sub>2</sub>-koncentrationer, afledte patologiske forandringer i nyrevævet og modtageligheden overfor bakterielle nyresygdomme blev der gennemført et smitteforsøg med regnbueørred og *Renibacterium salmoninarum* under normokapniske forhold (kontrol) og ved samtidig eksponering for 25 mg CO<sub>2</sub>/l. *R. salmoninarum* er en intracellulær bakterie, der forårsager bakteriel nyresyge i laksefisk, også kendt som BKD (bacterial kidney disease). Fisk blev eksponeret for forhøjede CO<sub>2</sub>-koncentrationer og smitte med *R. salmoninarum* på samme tidspunkt. Hypotesen var, at CO<sub>2</sub> og smitte med *R. salmoninarum* kunne have interagerende effekter, idet det er kendt at CO<sub>2</sub> udsætter nyren for et pres i forhold til at skulle opretholde syre-basebalance samtidig med at være eksponeret for forhold, der kan afstedkomme patologiske forandringer, og at fisk potentielt ville være mere modtagelige overfor bakteriel infektion.

## Metoder og resultater

Øjenæg af regnbueørred fra et klækkeri certificeret frit for IPNV, IHNV, VHSV og bakteriel nyresyge blev desinficeret og klækket. Patogenfri yngel blev overført til et eksperimentelt infektionsanlæg, da de havde nået en gennemsnitlig vægt på 20 gram, med 90 fisk i hvert kar.

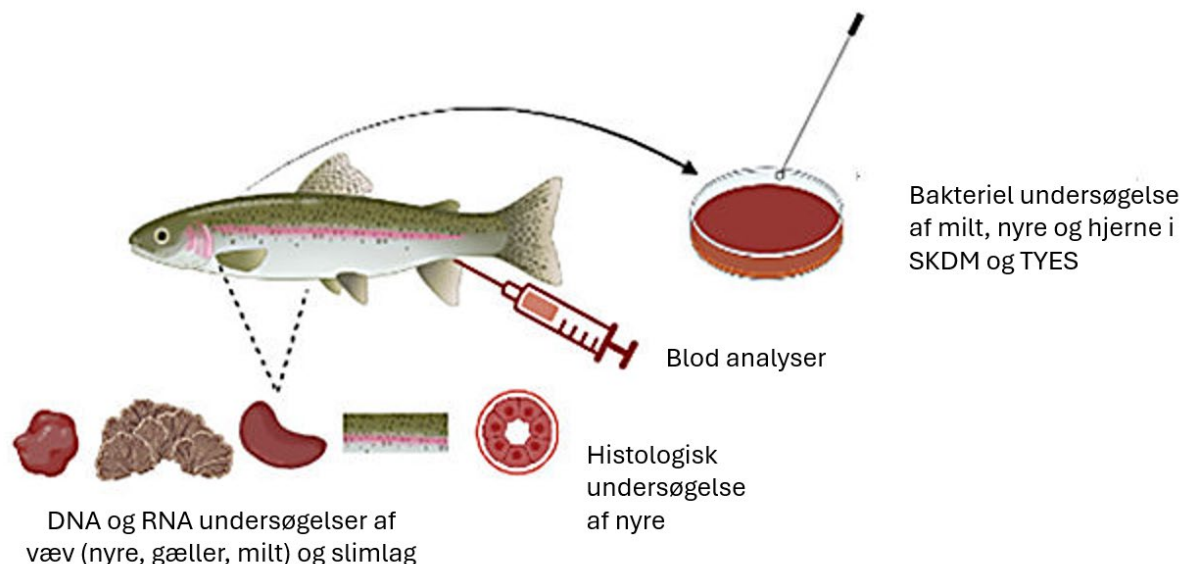
Et smitteforsøg blev gennemført som co-habituering, det vil sige, at 30 fisk fra 4 kar (n=120) kar blev bedøvet, finneklippet og injiceret med 0,1 ml inokulum bestående af *R. salmoninarum* isoleret fra tidligere smittede fisk, svarende til en aktivitet på 3,7 x 10<sup>7</sup> CFU/fisk. 2 af disse kar blev eksponeret for 25 mg CO<sub>2</sub>/l og 2 uden CO<sub>2</sub>. Yderligere 2 kar fungerede som kontrol uden smitte, et med CO<sub>2</sub> (25 mg/l) og et med normokapniske forhold (Figur 6).



Figur 6. Skematisk illustration af forsøgsopstilling til infektion med *R. salmoninarum* med eller uden tilføjet CO<sub>2</sub>. Et kar fungerede som negativ kontrol uden smitte eller CO<sub>2</sub> (kar 25), et fungerede som CO<sub>2</sub>-kontrol, uden smitte men med 25 mg CO<sub>2</sub>/l (kar 26), 2 kar fungerede som smittekar med både *R. salmoninarum* og 25 mg CO<sub>2</sub>/l (kar 27 + 28), og 2 kar fungerede som smittekar med *R. salmoninarum*, men uden CO<sub>2</sub> (kar 29 + 30).



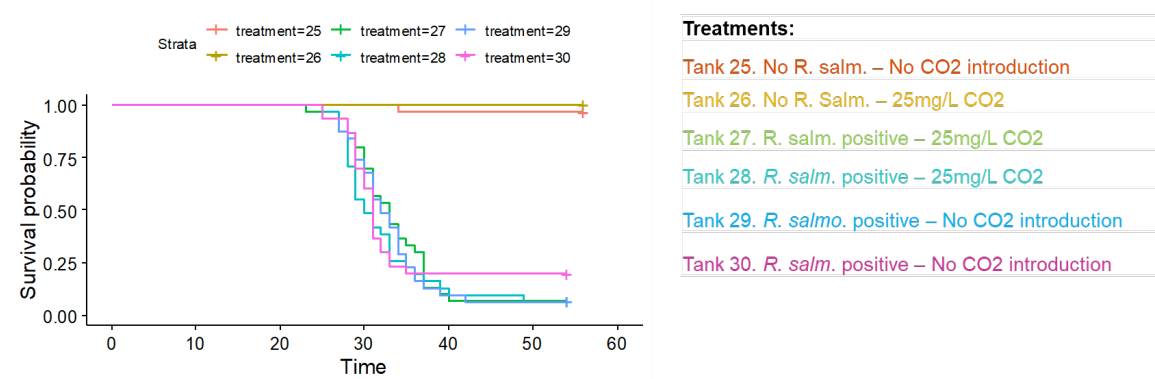
Fisk, der viste kliniske tegn på sygdom, blev dagligt udtaget og aflivet. I de følgende uger blev 5 fisk fra hvert kar udtaget efter uge 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, og 12. Fra disse fisk blev nyrer, gæller, milt og mukus analyseret for *R. salmoninarum* ved brug af genetiske metoder, nyrer blev udtaget til histologisk undersøgelse, blodprøver blev udtaget til plasmaanalyser, og nyrer, milt og hjerne blev undersøgt bakteriologisk (Figur 7).



**Figur 7. Prøvetagningsoverblik for fisk smittet med af *R. salmoninarum* efter uge 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, og 12 efter smitte. Nyre, gælle, milt og slimlag blev analyseret for *R. salmoninarum* ved brug af genetiske metoder, nyrer blev undersøgt histologisk, og milt, nyre og hjerne blev undersøgt bakteriologisk.**

## Dødelighed og smitte

Eksposering for CO<sub>2</sub> havde ingen effekt på overlevelsen i smitteforsøget. Dødelighed satte ind efter 3 uger (Figur 8) og fortsatte i de kommende 3 uger, indtil der var mellem 10-20 % overlevende fisk tilbage. I de sidste 2 uger af forsøget var der ingen dødelighed.

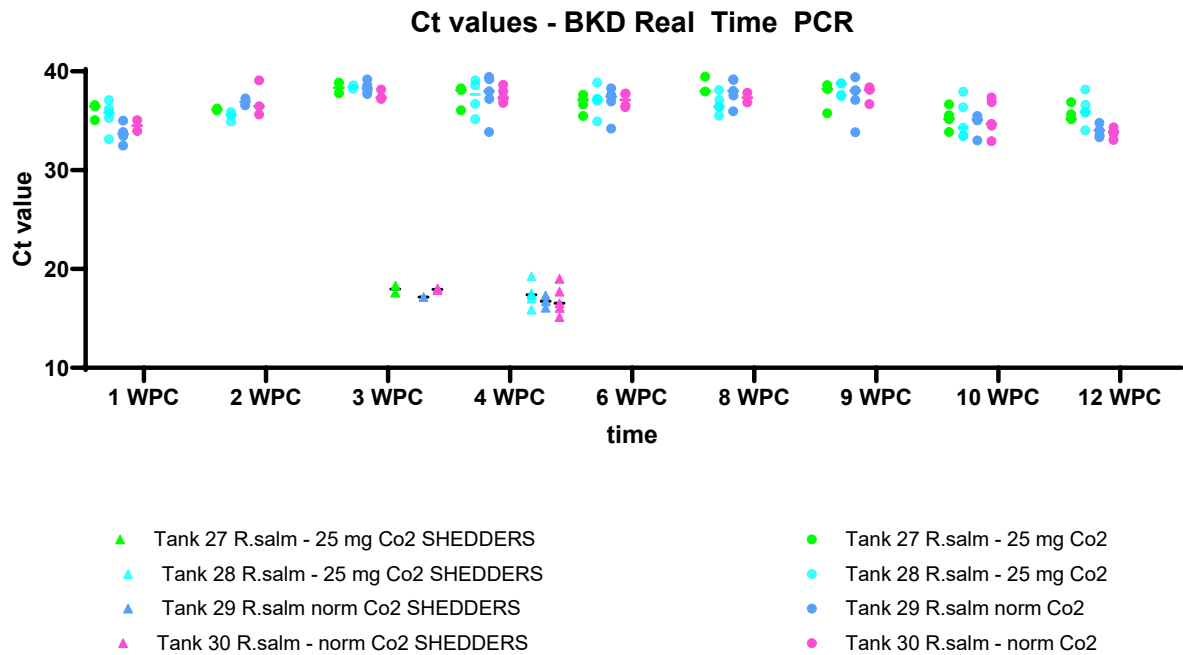


**Figur 8. Overlevelse i de 6 forsøgskar i løbet af de 8 ugers smitteforsøg. Der var ingen eller meget lille dødelighed i det negative kontrolkar og CO<sub>2</sub>-kontrolkarret. I kar, hvor fisk var eksponeret for *R. salmoninarum*, med eller uden kombination af CO<sub>2</sub>, begyndte dødeligheden ca. 3 uger efter smitte og fortsatte i yderligere 3 uger, hvorefter dødelighed standsede. Der var ingen effekt af CO<sub>2</sub>-eksponering på den observerede dødelighed.**

Fisk, der ikke overlevede smitteforsøg, viste punktblødninger i samtlige indre organer og havde tydelig opsvulmet nyre (Figur 9). Efter 3 uger var det muligt at isolere bakterier fra eksponerede fisk. qPCR-analyser viste ekstremt høje Ct-værdier (cycle threshold, inverst udtryk for ekspresion) for smittede fisk og høje værdier for co-habituerede fisk, der lå konstant i hele forsøgsperioden (Figur 10). Efter 12 uger var det fortsat muligt at isolere bakterier fra nogle væv. Dette understreger, at efter et klinisk sygdomsforløb opstår der en langvarig eller kronisk inflammatorisk infektion, der fører til vedholdende granulomatøse læsioner i nyren. I pattedyr er kronisk inflammation en central faktor i calcificering af væv (Demer et al., 2014).



**Figur 9. Moribunde fisk, der blev aflivet, havde omfattende blødninger i deres indre organer (øverst) og opsvulmet nyrevæv (nederst).**



**Figur 10. Ct-værdier for belastning med *R. salmoninarum* (bakteriel nyresyge) i løbet af 8 ugers smitteforsøg. Runde datapunkter indikerer co-habituerede individer med højt smitteniveau sammenlignet med injicerede fisk, der viser ekstremt høj smitte (trekanter).**

## Histologi

Histologiske undersøgelser af fisk, der viste kliniske tegn på infektion, viste granulomatisk nefritis med strukturelle forandringer forårsaget af punktblødninger, kraftig infiltration med hvide blodlegemer og nekrotisk interstitielt væv og tubuli. Ingen fisk viste histologiske tegn på mineralaflejringer eller andre mistænkelige læsioner i løbet af de første 8 uger af smitteforsøget, men enkelte fisk fra RS- + CO<sub>2</sub>-behandlingen viste begyndende tegn på mineralisering i nyren efter 12 uger.

# Monitering og prøvetagning fra opdræt

For at skabe et overblik over hvilke hårdhedsgrader ørredopdræt forekommer ved og den geografiske variation heri, indhentes vandprøver fra 10 opdrætsanlæg fordelt over Jylland. Desuden blev der udvalgt 3 opdrætsanlæg, hvor der blev foretaget døgnmålinger af opløst CO<sub>2</sub>. Fra udvalgte anlæg blev der prøvetaget fisk til vurdering af forekomst af nephrocalcinose, og der blev udtaget nyrevæv til patologiske undersøgelser for nephrocalcinosis og molekylære undersøgelser for bakteriel status.

## Metoder og resultater

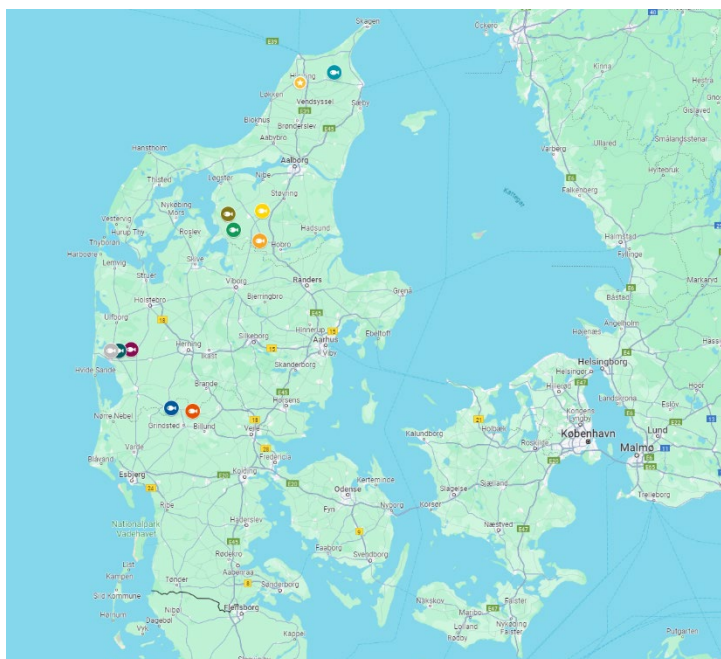
### Forekomst af nephrocalcinose

Der blev indsamlet fisk fra 3 forskellige dambrug med dokumenterede høje CO<sub>2</sub>-niveauer (19-21 mg CO<sub>2</sub>/l) hen over en 4 måneders sommerperiode. I alt 24 fisk med en vægt mellem 0,6 – 1,8 kg blev undersøgt for kliniske tegn på nyrelidelser og nephrocalcinose. Der blev ikke fundet tegn på dette.

Der blev yderligere fanget og aflivet 15 fisk tilfældigt fra et enkelt anlæg. Der blev taget nyreprøver til histologi, bakteriel prøvetagning (BU-swab), og nyrevæv i RNA-later. Histologiske undersøgelser viste ingen tegn på nephrocalcinose.

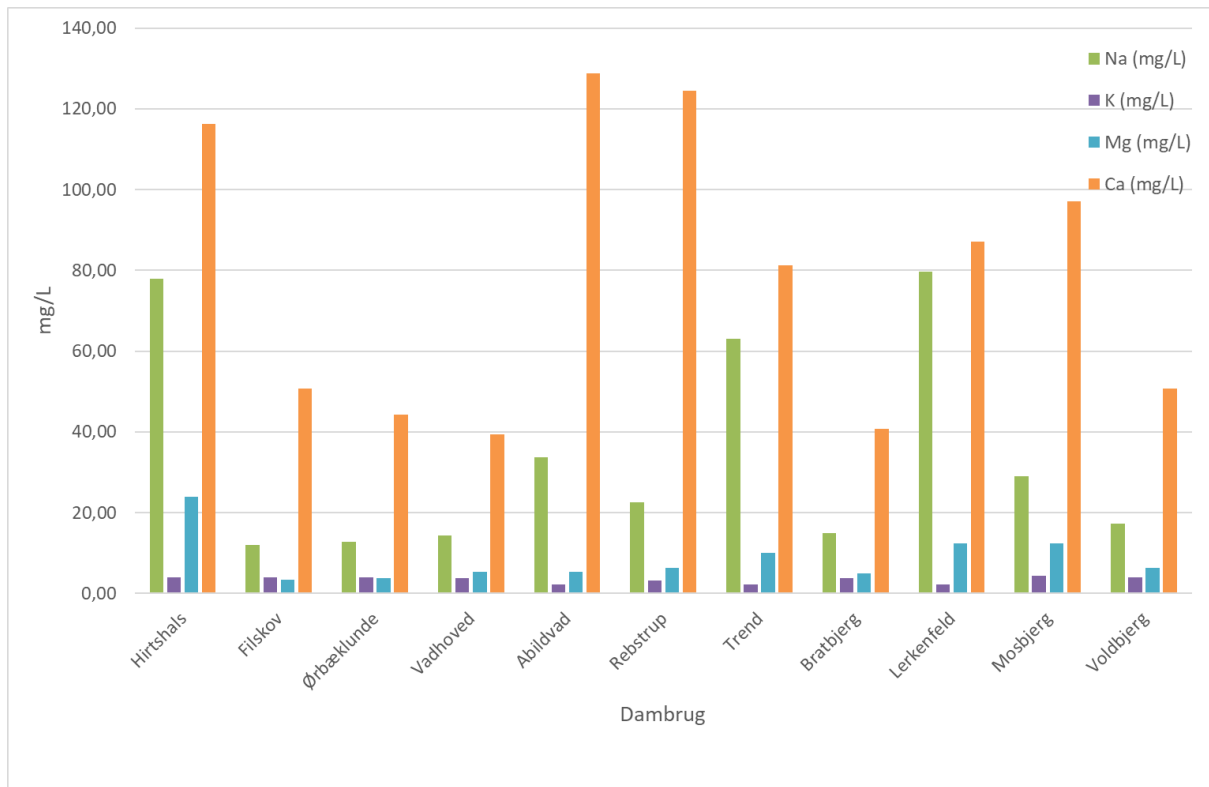
### Geografisk variation i vands hårdhed

Der blev indsamlet vandprøver fra 10 dambrug geografisk spredt over Jylland samt forsyningsvand fra Hirtshals (Figur 11). Vandprøver blev analyseret for natrium, kalium, calcium, og magnesium (Figur 12). Vandets hårdhed blev beregnet som CaCO<sub>3</sub>-ækvivalenter (dH) ud fra formlen  $2,497 \times [\text{Ca}] + 4,118 \times [\text{Mg}]$  hvor både Ca- og Mg-koncentrationer er angivet i mg/l.



**Figur 11. Placering af AquaPri-dambrug, hvorfra vandprøver blev indsamlet og analyseret for hårdhed og ionsammensætning. Prøver blev indsamlet ved indløbet, ikke i selve anlægget.**

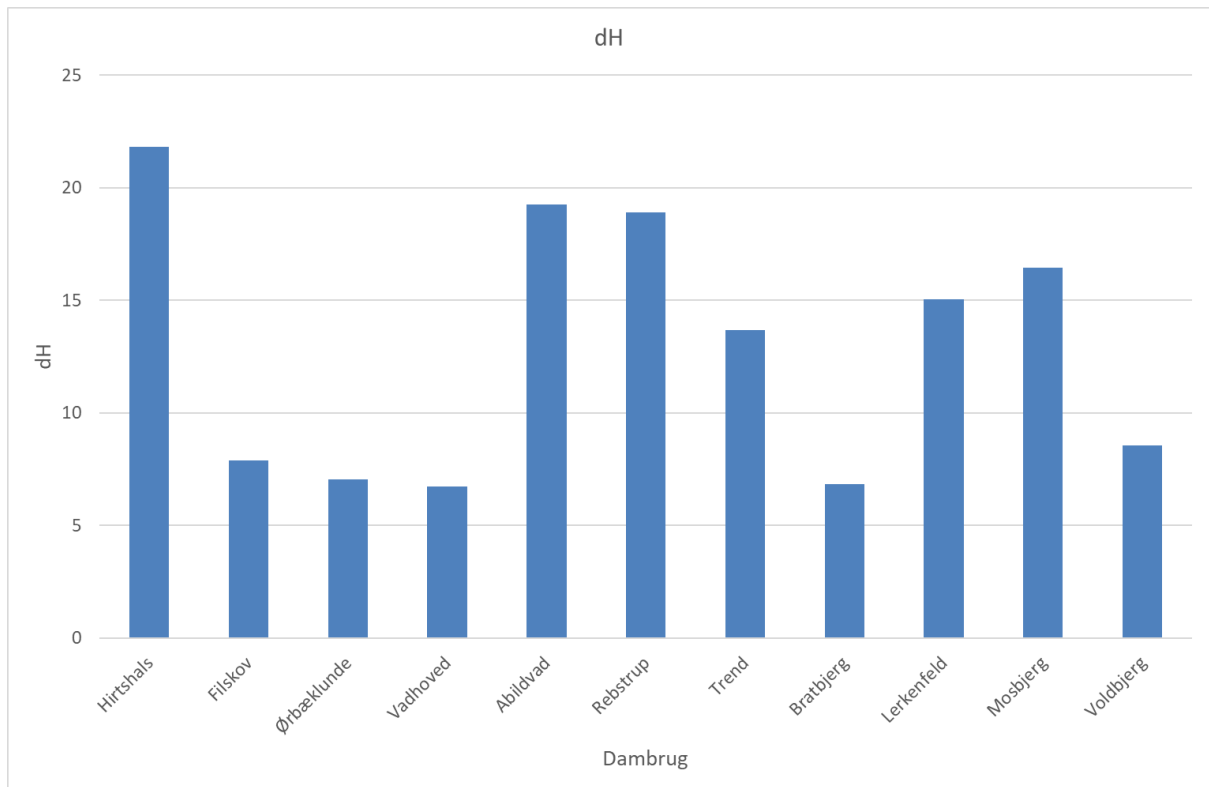




**Figur 12. Indholdet af natrium (Na), kalium (K), calcium (Ca) og magnesium (Mg) i vandprøver fra Hirtshals' forsyning og fra udvalgte opdrætsanlæg.**

Indholdet af natrium og kalium varierede fra henholdsvis 12,0 – 79,7 mg/l og 2,2 – 4,5 mg/l. Der var stor variation i vandets indhold af magnesium; det laveste indhold blev målt på Filskov Dambrug til 3,4 mg/l, og den højeste koncentration på 12,4 mg/l observeredes på Mosbjerg Dambrug. Vandets calciumindhold var lavest på Vadhoved Dambrug med 39,3 mg/l og højest på Abildvad Dambrug med en koncentration på 128,9 mg/l.

Resultatet for hårdhedsberegninger viste tydeligt, at det de højeste calciumcarbonat ( $\text{CaCO}_3$ )-ækvivalenter og det hårdeste vand forekom i det nordjyske med dH-værdier mellem 14 – 21 (hårdt vand), medens vandprøver fra det vestjyske enten var i den øvre skala af blødt (4 – 7 dH) eller nedre skala af mellemhårdt (7 – 14 dH) vand (Figur 13).

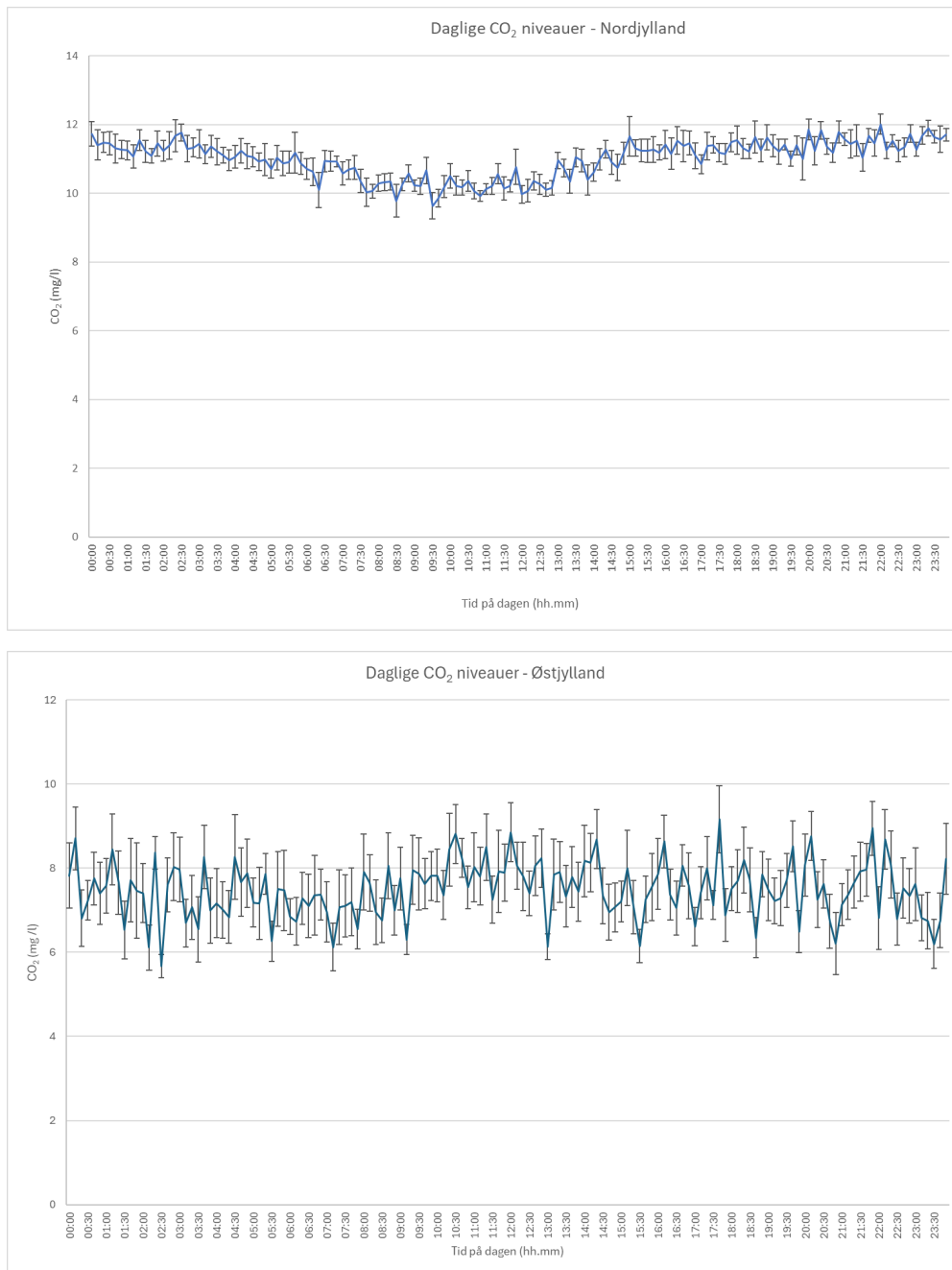


**Figur 13. Beregnede hårdheder ud fra  $\text{CaCO}_3$ -ækvivalenter fra de analyserede vandprøver. Sammenholdt med kortet ovenfor (figur 11) ses tydeligt, at de 4 anlæg mellem Hobro og Støvring samt i Vendsyssel har det hårdeste vand, medens anlæg ved Hvide Sande og i området Grindsted-Billund har det blødeste.**

## CO<sub>2</sub>-målinger

Målinger af opløst CO<sub>2</sub> blev målt på 3 akvakulturanlæg lokaliseret i henholdsvis Vestjylland, Østjylland og Nordjylland. Overordnet set var det tydeligt, at indholdet af CO<sub>2</sub> ændrede sig i takt med stigende biomasse. Målinger blev enten foretaget direkte i produktionskarrene eller i returkanalen til afgangsinstitutioner. Der var tilbøjelighed til, at måleudstyr blev tilgroet i løbet af måleperioderne, og at de forskellige anlæg ændrede på driftsparametre i løbet af perioden. Derfor er der i det følgende fokuseret på døgnvariationer over 10 dage og konstrueret en model, der viser ændringer over tid og ved forskellige driftsparametre.

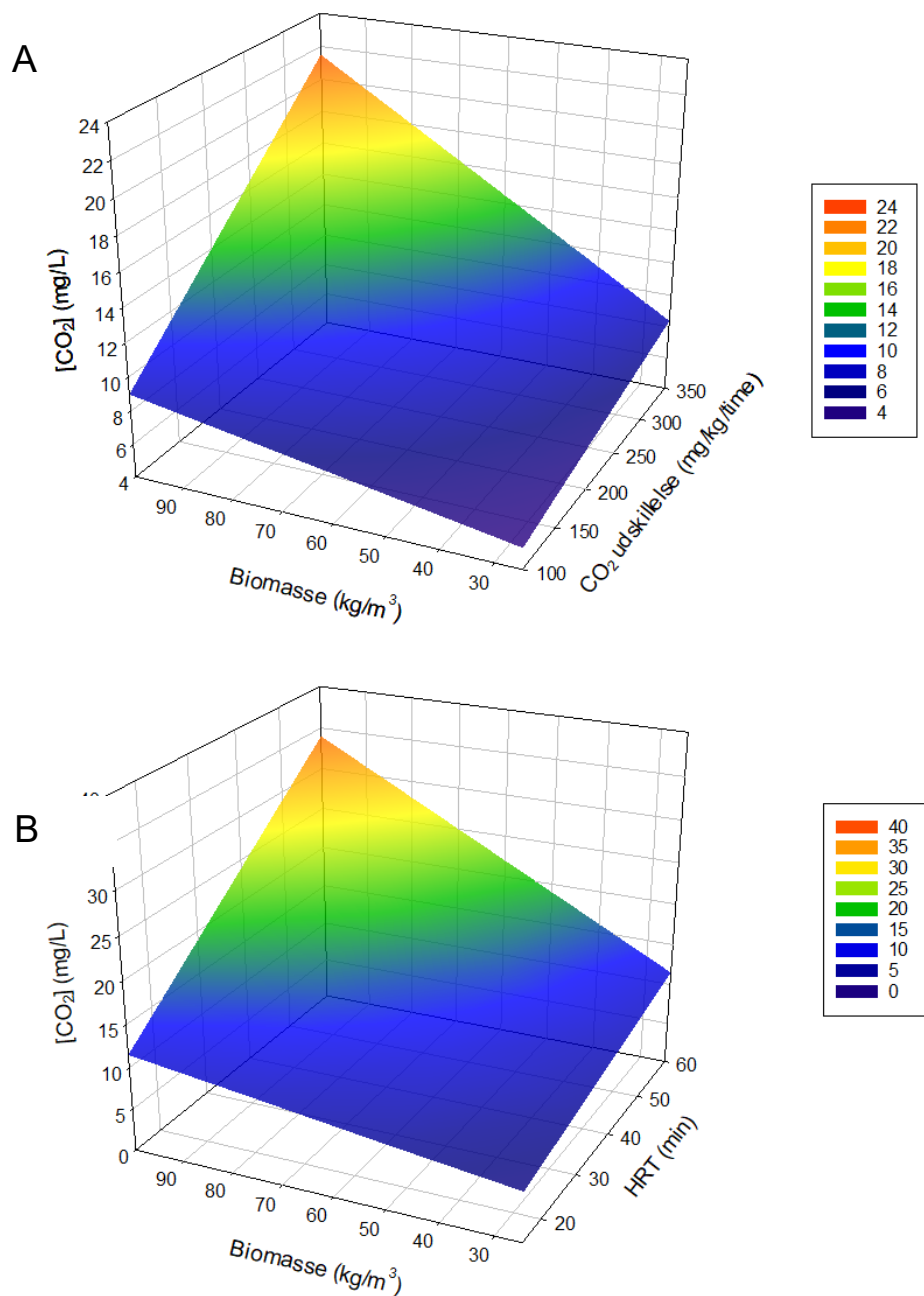
Målinger fra alle 3 lokaliteter viste meget lille variation i daglige koncentrationer af CO<sub>2</sub>. To af anlæggene varierede mellem 10 – 12 mg CO<sub>2</sub>/l og 6 – 9 mg CO<sub>2</sub>/l (Figur 14), medens det sidste lå mellem 22 – 24 mg/l. Den lille variation, der forekommer i målingerne, antages at skyldes de store volumener vand, der cirkulerer rundt i anlæggene, der – selvom fiskene ændringer mængden af udskilt CO<sub>2</sub> i løbet af døgnet (pga. aktivitet og fordøjelse) – udviser ændringer, der forekommer i løbet af døgnet.



**Figur 14. Målinger af døgnvariationer i opløst CO<sub>2</sub> på akvakulturanlæg i Nordjylland (øverst) og Østjylland (nederst) præsenteret som gennemsnit over 10 dages målinger.**

Derfor har vi i det følgende modelleret de ændringer, der ville forekomme med ændringer i vandgen- nemstrømning (hydraulisk retentions- tid), mængden af CO<sub>2</sub>, der udskilles af fiskene, og ændringer i biomassetæthed. Figur 15's panel A viser, hvordan en kombination af ændringer i CO<sub>2</sub>-udskillelse og biomassetæthed ændrer ligevægtskoncentrationen i opløst CO<sub>2</sub> ved en hydraulisk retentions- tid på 30 minutter (svarende til udskiftning af 200 % af vandets volumen per time). Eksempelvis ville en udskil- lesesrate på 300 mg CO<sub>2</sub>/kg /time ved 50 kg fisk/m<sup>3</sup> resultere i en CO<sub>2</sub>-koncentration på ca. 10 mg/l efter 24 timer. Fra panel B kan aflæses, at hvis den hydrauliske retentions- tid fordobles, vil også lige- vægtskoncentrationen fordobles.

Alle korrelationer mellem driftsparametre og ligevægtskoncentration af CO<sub>2</sub> er lineære, og samlet set viser de 2 paneler ret tydeligt, at driftsparametre har en langt større effekt på, hvilke CO<sub>2</sub>-koncentrationer fiskene oplever, så længe afgasseren er i stand til at levere vand, der er effektivt afgasset. I disse beregninger er antaget en indløbskoncentration på 4 mg CO<sub>2</sub>/L. Ændringer i indløbskoncentration vil resultere i proportionelle ændringer i ligevægtskoncentration.



**Figur 15. Modellering af ligevægtskoncentrationer for opløst CO<sub>2</sub> (mg/L) under forskellige driftsparametre. I panel A vises ligevægtskoncentrationen i CO<sub>2</sub> som følge af ændringer i fiskenes CO<sub>2</sub>-udskillelsesrater mellem 100 og 350 mg CO<sub>2</sub>/kg/time samt ved ændrede fisketætheder fra 25 til 100 kg/m<sup>3</sup>. Den hydrauliske retentions tid i denne beregning er fastsat til 30 minutter. I panel B vises sammenhængen mellem biomasse, også 25 til 100 kg / m<sup>3</sup>, samt ændringer i hydraulisk retentions tid fra 15 minutter til 1 time. Fiskenes CO<sub>2</sub>-udskillelsesrate i denne beregning er fastsat til 300 mg CO<sub>2</sub>/kg/time. I begge beregninger er indløbskoncentrationen af CO<sub>2</sub> 4 mg/L.**

# Afgasning af CO<sub>2</sub> og potentiale for automatisering

Afgasningseffektiviteten af CO<sub>2</sub> blev kvantificeret ved forskellige indløbskoncentrationer af CO<sub>2</sub>, ved forskellige løftehøjder og under forskellig hydrauliske loading. Der gennemførtes indledningsvist en undersøgelse af korrelationen mellem opløst fri CO<sub>2</sub> i vand med de 4 forskellige hårdheder for at vurdere, hvordan hårdhed påvirker opløselighed. Der gennemførtes efterfølgende forsøg, hvor pH gradvist sænkedes under kontrollerede forhold for at vurdere, hvorledes hårdhed påvirker karbonatligevægten. Der udførte herefter en række afgasningsforsøg ved brug af en kaskadekolonne. Princippet bag denne er, at vand pumpes over en risleplade og ned gennem et pakket medie (bioblokke), samtidig med at der trækkes luft igennem i den modsatte retning (modstrøm). I afgasseren er det muligt at regulere vandflow til afgasseren (hydraulisk belastning), luftgennemstrømning og højden af det pakkeede medie. Der gennemføres en forsøgsrække, hvori afgasningseffektivitet (% fjernelse), afgasningskapacitet (kg CO<sub>2</sub>/time) og energiforbrug ved afgasning (kWh/kg CO<sub>2</sub>) bestemmes for de forskellige hårdhedsgrader af vand, ved forskellige indløbskoncentrationer af CO<sub>2</sub> (koncentrationsgradienter), ved 2 forskellige højder af medie, ved forskellige gas:væske-forhold. Resultaterne anvendes til at give en vurdering af under hvilke forhold, afgasning fungerer optimalt i relation til fjernelse og energiforbrug. I kombination med resultaterne for effekter af CO<sub>2</sub> på produktionsparametre danner resultaterne desuden basis for at udarbejde en anbefaling om, hvornår der bør afgasses. Der blev desuden udarbejdet en praktisk model i samarbejde med Blue Unit A/S for, hvordan afgasning kan automatiseres i relation til, hvor tit en afgasser skal køre, og hvor stor en del af kapaciteten afgasseren skal anvende (hydraulisk belastning og luftmængde til afgasseren), og der blev udarbejdet en driftsøkonomisk oversigt over dette.

## Metoder og resultater

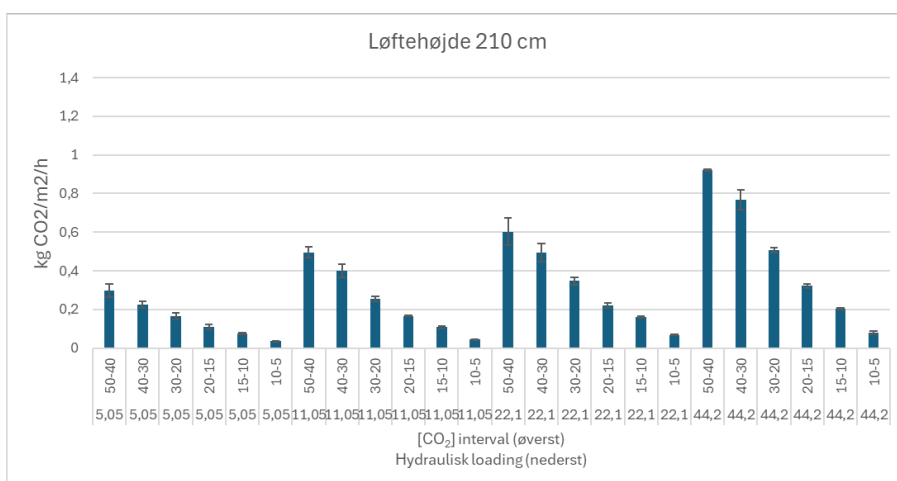
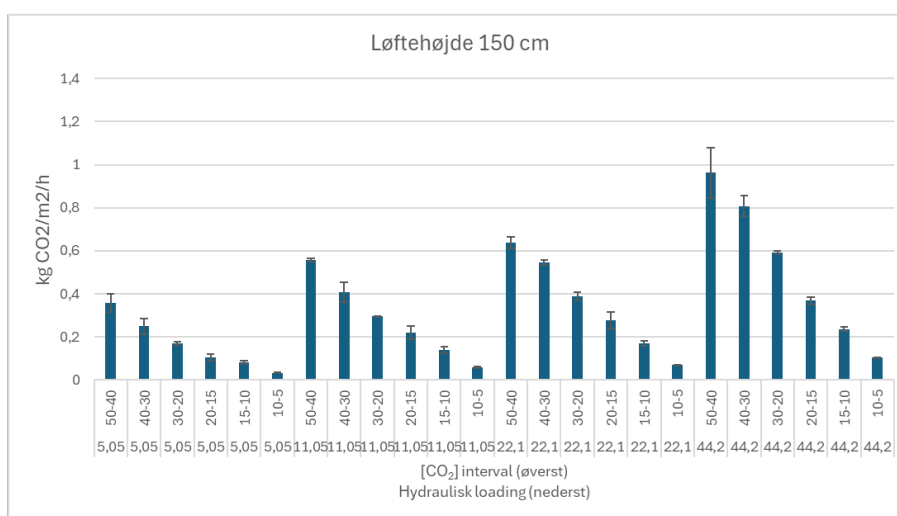
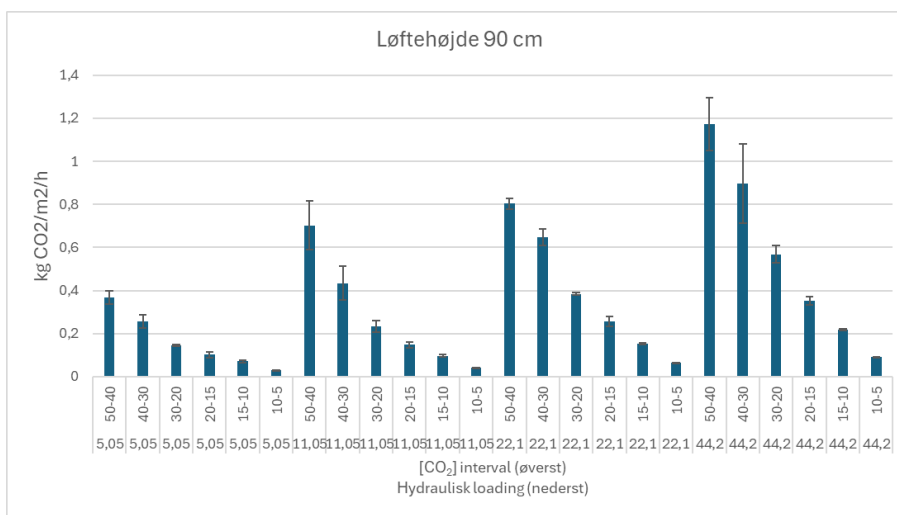
Et afgasningstårn med justerbar hydraulisk loading fra 5 – 45 m<sup>3</sup> vand/m<sup>2</sup>/time blev afprøvet med 2 forskellige medier, hver i 3 forskellige højder, med vandtilførsel der varierede i CO<sub>2</sub>-indhold fra 50 mg/l til <5 mg/l. Netto-CO<sub>2</sub>-fjernelse blev målt over tid, samtidig med energiforbrug til at beregne effektiv CO<sub>2</sub>-fjernelse per m<sup>2</sup> overflade og per kWh forbrugt (Figur 13).

## Afgasningskapacitet og effektivitet

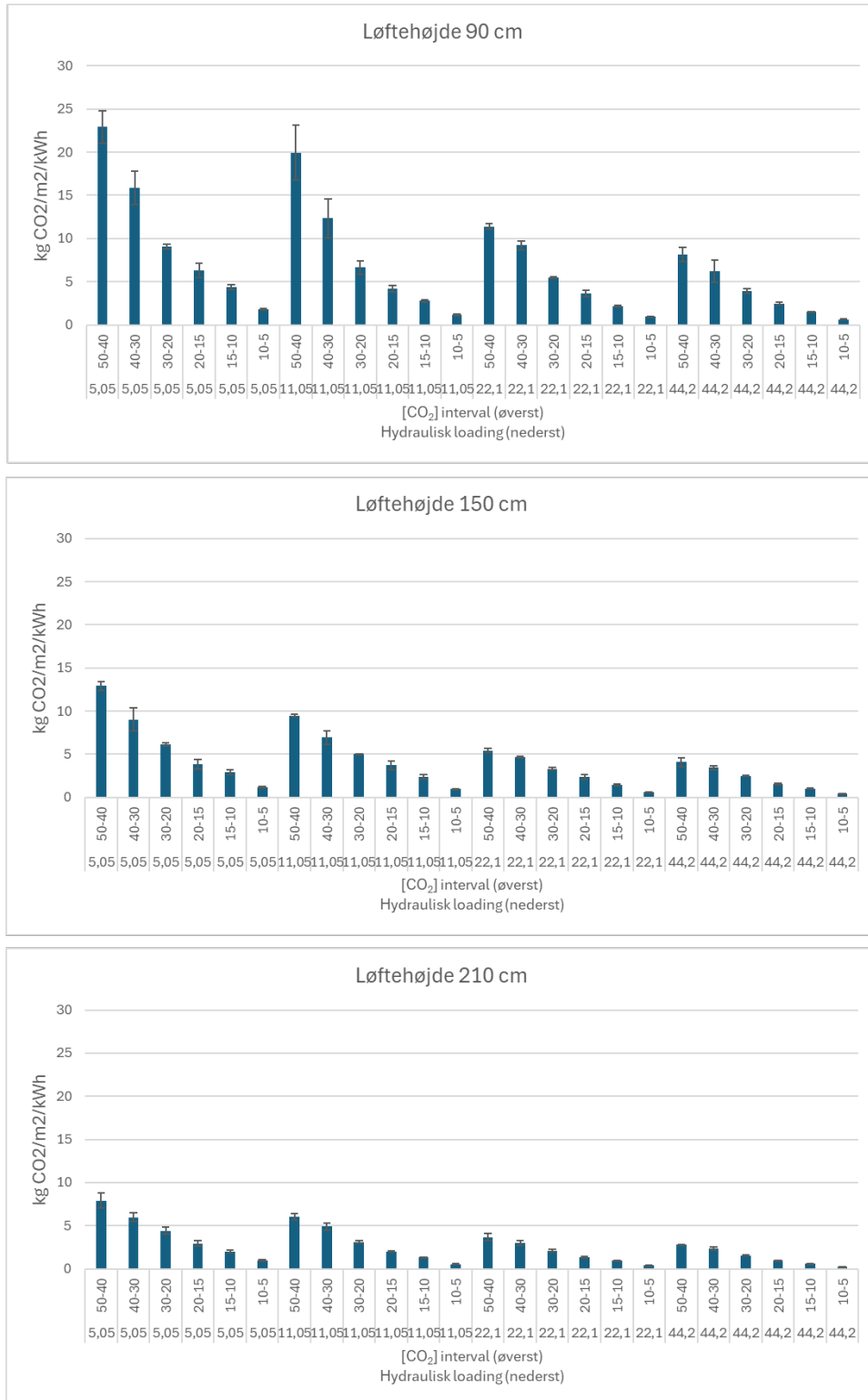
Resultaterne viser, at fjernelseseffektiviteten er koncentrationsafhængig uanset flowhastigheder og løftehøjder. En indløbskoncentration på 40 – 50 mg CO<sub>2</sub>/l resulterede altid i en mere effektiv fjernelse af CO<sub>2</sub>, mellem 0,25 og 1,1 kg CO<sub>2</sub>/m<sup>2</sup>/time, som faldt proportionelt med indløbskoncentration ned til 0,01 – 0,1 kg CO<sub>2</sub>/m<sup>2</sup>/time ved et indløb på 5 – 10 mg CO<sub>2</sub>/l. (Figur 14). Løftehøjde (hvor langt vandet rislede ned igennem tårnet) påvirkede ikke effektiviteten nævneværdigt. Som konsekvens var det langt mere energieffektivt at operere med lave løftehøjder og højt flow (Figur 15). Fra et designmæssigt perspektiv er man nødt til at overveje, hvilken kapacitet der er behov for i et anlæg og vurdere sit specifikke behov ud fra akkumuleringskoncentration (se ligevægtskoncentration, Figur 15) og vælger den mest hensigtsmæssige løsning. Løsningen vil desuden skulle afgøres ud fra hvor stort et fysisk aftryk (m<sup>2</sup> af bygning) afgasningsinstallationen man vil tolerere.



**Figur 16. Afgasningstårn til fjernelse af CO<sub>2</sub>. Konfiguration kunne ændres for at opnå forskellige vandtilførselsrater, lufttilførsel og forskellige højder af mediet inde i tårnet.**



Figur 17. CO<sub>2</sub>-nettofjernelse målt som kg/m<sup>2</sup>/ time under afgasningsforsøg ved 3 forskellige løftehøjder. Øverste række i den vandrette akse angiver koncentrationsområdet for CO<sub>2</sub>-indholdet i indløbsvand, mens nederste række angiver den hydrauliske loading i m<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>/time. I dette tilfælde er der anvendt bioblokke (Exponet) som pakmedie. Alle målinger er foretaget med en G:L >10. Resultaterne viser, at effektiviteten er afhængig af indløbskoncentration, men overraskende nok at effektiviteten ikke forbedres væsentligt af løftehøjde. Typen af pakmedie, der blev anvendt, havde ingen indflydelse på fjernelsen af CO<sub>2</sub>.



Figur 18. CO<sub>2</sub>-fjernelseeffektivitet udtrykt som kg CO<sub>2</sub>/m<sup>2</sup>/kWh under afgasningsforsøg ved 3 forskellige løftehøjder. Øverste række i den vandrette akse angiver koncentrationsområdet for CO<sub>2</sub>-indholdet i indløbsvand, medens nederste række angiver den hydrauliske loading i m<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>/time. I dette tilfælde er der anvendt biobløkke (Exponet) som pakmedie, og effektiviteten er beregnet ud fra nettofjernelse (jf. Figur 17) i relation til effektforbrug. Effektiviteten stiger uendeligt med reduceret løftehøjde, fordi energiforbruget til at løfte vand er stort, men falder med faldende indløbskoncentration på grund af reduceret nettofjernelse af CO<sub>2</sub>.



Overordnet set giver det ingen mening at automatisere driften af et afgasningstårn. Der vil altid være behov for afgasning, ved lave indløbskoncentrationer er der et tab af effektivitet, og det vil altid være ønskværdigt at forsyne fiskene med vand med lavest mulige indhold af opløst CO<sub>2</sub>. En afgasningsinstallation kunne opbygges på kapacitetsbasis, det vil sige med flere sektioner, der individuelt kunne bringes i drift, for eksempel i takt med, at biomassen i tanken stiger, eller på de tidspunkter af døgnet hvor CO<sub>2</sub>-udskillelsen er højest.

Det er af afgørende betydning, at den hydrauliske retentionstid i anlægget holdes så kort som muligt for at minimere CO<sub>2</sub>-akkumuleringen i selve produktionen. Afgasningsinstallationer i RAS-anlæg er centraliserede og modtager ofte blandingsvand fra samtlige produktionsenheder i en sektion (hvis et anlæg er sektionsinddelt). Der kunne være et rationale i at installere decentraliserede afgasningsenheder, eksempelvis på outgrow-enheder, der typisk er karakteriserede ved meget store volumener. Eksempelvis er nogle enhedsstørrelser i lakseproduktion nu over 1000 m<sup>3</sup>, og der kunne være store energibesparelser at hente, hvis decentraliseret afgasning kunne tillade højere HRT, uden at øvrige vandkvalitetsparametre blev kompromitteret.

Det er overraskende at CO<sub>2</sub>-afgasningen ikke er positivt korreleret med kontakttid (faldhøjde) i afgasningstårnet. Der er flere mulige forklaringer på dette. Den ene er at et G:L-forhold på 10 (10 volumener luft tilført per volumen vand) ikke er tilstrækkeligt, til trods for at dette i flere videnskabelige publikationer er angivet som optimalt. Alternativt opnås der ikke fuld opblanding af luft og vand i afgasningstårnet, eksempelvis hvis den tilførte luft har en tilbøjelighed til at stige op langs siden af mediet frem for igennem mediet. Endelig kan det ikke udelukkes, at vandet ved høj hydraulisk loading trækker luft med ned i afgasningstårnet og på den måde giver modstand til den tilførte luft og dermed utilsigtet reduceret G:L.

Moderne RAS-anlæg drives ofte med vakuumaftgasning (0,5 – 1,0 mBar). Der er p.t. ingen tilgængelig information om, hvorledes vakuum og lufttilførselsrater under vakuum påvirker afgasningseffektivitet. Det bør tilstræbes at indsamle data for disse parametre.

## Diskussion og konklusion

Tilvækst, foderudnyttelse, foderindtag, og kvælstofretention i regnbueørred påvirkes alle negativt af stigende CO<sub>2</sub>-koncentrationer. Ved opdræt i ferskvand under restriktiv fodring opstår der dog først negative effekter af CO<sub>2</sub> ved 25 mg/l, hvor vækstrater og foderkonvertering var ca. 10 % ringere end for kontrolgruppen. Derimod var der ingen signifikante negative effekter ved 10 mg/l, eller hvis koncentrationer svingede mellem 10 og 25 mg CO<sub>2</sub>/L fra morgen til aften. Dette indikerer en ret høj tolerance for CO<sub>2</sub> hos regnbueørred til sammenligning med eksempelvis laks. Dog skal det understreges, at fiskene blev fodret restriktivt, og at effekter sandsynligvis vil forekomme, såfremt fisk bliver fodret *ad libitum* i og med, at der var tydelige signifikante effekter på hormoner involveret i appetitregulering, eksempelvis en signifikant reduktion i orexin, der stimulerer foderindtag. Det blev da også vist, at maksimalt foderindtag blev nedreguleret ved stigende CO<sub>2</sub>-koncentrationer.

Ved opdræt af regnbueørred i saltvand var billedet anderledes. Her faldt den specifikke vækstrate med 14 og 43 % ved opdræt i henholdsvis 10 og 25 mg CO<sub>2</sub>/l, medens foderkonverteringen steg med henholdsvis 10 og 29 % i forhold til kontrol. Forklaringen på denne store forskel i effekt af CO<sub>2</sub> i ferskvand og saltvand er ikke åbenlys, men skal sandsynligvis findes i enten stigende metaboliske omkostninger for fisk i saltvand, eksempelvis til osmoregulering og syrebaseregulering, eller i at kombinationen af saltvand og CO<sub>2</sub> har en negativ påvirkning af fiskenes evne til at fordøje og optage næringsstoffer fra foderet. Det er tidligere vist at CO<sub>2</sub> ikke har nogen effekt på fordøjeligheden af næringsstoffer i ferskvand, men det kan ikke udelukkes, at der er ukendte faktorer, der spiller ind ved opdræt i saltvand.

Overordnet set var det overraskende at fluktuerende CO<sub>2</sub>-koncentrationer ikke havde en større effekt end observeret. Når fisk oplever CO<sub>2</sub> i deres miljø, udskiller de kloridioner til fordel for akkumulering af bikarbonat for at bufre deres indre pH. Hypotesen var, at det ville være en større fysiologisk udfordring for fisk dagligt at skulle regulere deres indre miljø som respons på den ydre forsurening af vandet, som CO<sub>2</sub> medfører, eller at dette ville være en presfaktor, som negativt påvirkede deres foderindtag.

I løbet af disse opdrætsforsøg sås ingen makroskopiske tegn på forekomst af nephrocalcinose, hverken i fersk- eller saltvand, eller ved fodring med fosforberiget foder. Der var dog tydelige tegn på – fra undersøgelser af nyrens mineralsammensætning og de histologiske undersøgelser – at der var begyndende mineralaflejringer, som igen var korreleret med CO<sub>2</sub>-koncentrationer. Vi konkluderer derfor, at salinitet, fosforindtag og CO<sub>2</sub> er faktorer, der påvirker forekomsten af nephrocalcinose. I Danmark er der stor variation i hårdheden af indtagsvandet, hovedsageligt forårsaget af store regionale forskelle i calciumindholdet, og i langt mindre grad af magnesiumindholdet. Det er sandsynligt at dette kan spille en rolle i forekomsten af nephrocalcinose, i samspil med ovennævnte faktorer.

Forsøg med regnbueørred, der samtidigt blev eksponeret for 25 mg/l CO<sub>2</sub> og smitte med bakteriel nyresyge forårsagende *Renibacterium salmoninarum*, viste ingen tydelig interaktion. Den kumulative dødelighed var den samme for fisk under normokapniske forhold som ved 25 mg CO<sub>2</sub> /l, og der blev ikke observeret patologiske eller histologiske indikationer på nephrocalcinose i løbet af smitteforsøget.

Dog viste histologiske undersøgelser af overlevende fisk efter 12 uger begyndende tegn på mineralisering i nyrevævet. Om end der ikke var direkte korrelation mellem smitte og CO<sub>2</sub> og nephrocalcinose, kan det ikke udelukkes at "overlevende" af BKD har en højere tilbøjelighed til at udvikle nephrocalcinose, f.eks. på grund af arvæv fra infektion. Dette kunne være forklaringen på, at der periodisk forekommer observationer af nephrocalcinose på kommercielle anlæg. Andre driftsparametre kan også have indflydelse, men det lader ikke til at vandets hårdhed, selvom der er stor geografisk variation, spiller en større rolle. Heller ikke i afgasningsssammenhænge vurderes vandets hårdhed at spille

nogen rolle, hvorimod alkalinitet, som reguleres på de individuelle anlæg, formentlig har en ikke uvæsentlig rolle.

Bestemmelse af afgasningskapacitet og effektivitet er ikke tilstrækkelige til at give en vurdering af, hvad der er den bedste afgasningsprocedure. Biomassetæthed og hydraulisk retentionstid (HRT) er tydeligvis de mest afgørende parametre for, hvad fisk oplever af opløst CO<sub>2</sub>, mens det bør tilstræbes at opnå så lave CO<sub>2</sub>-koncentrationer i indløbsvandet som muligt. Design af systemer med større kapacitet og bedre effektivitet bør være en målsætning, ligesom det bør undersøges, hvorvidt decentraliserede afgasningsinstallationer kan afhjælpe behovet for korte HRT.

# Referencer

- Dalsgaard, J., Lund, I., Thorarinsdottir, R., Drengstig, A., Arvonen, K., Pedersen, P.B., 2013. Farming different species in RAS in Nordic countries: Current status and future perspectives. *Aquac. Eng.* 53, 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2012.11.008>
- Danley, L., Kenney, P.B., Hankins, A., 2005. Effects of Carbon Dioxide Exposure on Intensively Cultured Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* : Physiological Responses and Fillet Attributes. *J. World Aquac. Soc.* 36, 249–261. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2005.tb00329.x>
- Good, C., Davidson, J., Welsh, C., Snekvik, K., Summerfelt, S., 2010. The effects of carbon dioxide on performance and histopathology of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in water recirculation aquaculture systems. *Aquac. Eng.* 42, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2009.11.001>
- Hosfeld, C.D., Engevik, A., Mollan, T., Lunde, T.M., Waagbø, R., Olsen, A.B., Breck, O., Stefansson, S., Fivelstad, S., 2008. Long-term separate and combined effects of environmental hypercapnia and hyperoxia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. *Aquaculture* 280, 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.05.009>
- Khan, J.R., Johansen, D., Skov, P.V., 2018. The effects of acute and long-term exposure to CO<sub>2</sub> on the respiratory physiology and production performance of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in freshwater. *Aquaculture* 491. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.03.010>
- Klykken, C., Reed, A.K., Dalum, A.S., Olsen, R.E., Moe, M.K., Attramadal, K.J.K., Boissonnot, L., 2022. Physiological changes observed in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with nephrocalcinosis. *Aquaculture* 554, 738104. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738104>
- Martins, C.I.M., Eding, E.H., Verdegem, M.C.J., Heinsbroek, L.T.N., Schneider, O., Blancheton, J.P., d'Orbcastel, E.R., Verreth, J.A.J., 2010. New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: A perspective on environmental sustainability. *Aquac. Eng.* 43, 83–93. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2010.09.002>
- Minarova, H., Palikova, M., Kopp, R., Maly, O., Mares, J., Mikulikova, I., Papezikova, I., Piacek, V., Pojezdal, L., Pikula, J., 2023. Nephrocalcinosis in farmed salmonids: diagnostic challenges associated with low performance and sporadic mortality. *Front. Vet. Sci.* 10. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1121296>
- Skov, P.V., 2019. CO<sub>2</sub> in aquaculture. *Fish Physiol.* 37, 287–321. <https://doi.org/10.1016/bs.fp.2019.07.004>
- Smart, G.R., Knox, D., Harrison, J.G., Ralph, J.A., Richard, R.H., Cowey, C.B., 1979. Nephrocalcinosis in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson; the effect of exposure to elevated CO<sub>2</sub> concentrations. *J. Fish Dis.* 2, 279–289. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1979.tb00170.x>



Danmarks  
Tekniske  
Universitet

DTU Aqua  
Henrik Dams Allé  
2800 Kongens Lyngby

[www.aqua.dtu.dk](http://www.aqua.dtu.dk)