

Bjørn Straume, Robert Strøm og Johannes Binder

Utvikling av et flow-system for filming av planktonprøver som kan analyseres ved bruk av kunstig intelligens

Bacheloroppgave Biomarin Innovasjon
Veiledere: Stig Atle Tuene og Lars Christian Gansel
Mai 2023

Sammendrag

Lakselus er i dag et stort problem for oppdrettsnæringen. Trafikklyssystemet er utviklet for å overvåke, kontrollere og begrense spredningen av lakselus. En av utfordringene knyttet til trafikklyssystemet, er å validere om antall planktoniske lakseluslarver i gitt område, reflekterer virkeligheten. Videre blir antallet nødvendige prøver for å oppnå representativ data, påvirket av tidsbruk og prosesseringskapasitet. Denne bacheloroppgaven tar for seg utviklingen av et flow-system som tilrettelegger for bruken av kunstig intelligens til analysing av organismer i planktonprøver.

Opgaven omhandler utvikling av et oppsett bestående av lupe, kamera, pumpe og observasjonskammer. Opgaven beskriver fire hovedprosesser; lyskilder, pumpehastighet, kamerainnstillinger, og utvikling av et observasjonskammer. I tillegg har det blitt gjennomført innsamling og behandling av planktonprøver, og dyrking av lakseluslarver. Ferske planktonprøver ble benyttet som observasjonsgrunnlag til utvikling av flow-systemet. Det ble gjennomført forsøk med kameraet, lupe og pumpens ulike innstillinger. Innsamling av plankton ble utført ved bruk av en planktonhåv. For å samsvare med størrelsen til lakselusens planktoniske stadier, ble prøvematerialet filtrert til plankton i størrelser mellom 180-500 μ m. Prøvene ble tilsatt etanol, og fortynnet til ønsket tetthet. Vertikal innsamlingsmetode viste til en høyere prøvetetthet ved innsamling. Resultatene viser til at ved filming av prøvemateriale ga kameraoppløsningen «L 24M 6000 x 4000» sammen med lyskilde under objektbordet, og 9x forstørrelse de klareste bildene. Pumpehastighet på 5 ml/min ga best bildekvalitet. Lavere hastigheter førte til klarere bilder, men mer tidsbruk. Høyere hastigheter førte til redusert bildekvalitet, men mindre tidsbruk. Resultatene viser til at flow-systemet ga videoer av god nok kvalitet til å kunne brukes som trenings- og valideringsdata til en AI-programvare.

De opparbeidede resultatene kan bli brukt til å bestemme hvordan man kan utvikle et flow-system i kombinasjon med kunstig intelligens, for analysing av organismer i en planktonprøve.

Abstract

Salmon lice are a major problem for the aquaculture industry today. The traffic light system has been developed to monitor, control, and limit the spread of salmon lice. One of the challenges associated with the traffic light system is to validate whether the number of planktonic salmon lice larvae in a given area, reflects reality. This bachelor's thesis deals with the development of a flow system that facilitates the use of artificial intelligence for counting and identifying salmon lice larvae in plankton samples.

The thesis deals with the development of a setup consisting of a microscope, camera, pump, and observation chamber. The thesis describes four main processes: light sources, pump speed, camera settings, and the development of an observation chamber. The thesis also describes processes as collection of plankton samples and cultivating salmon lice. Fresh plankton samples have been used as basis of observation for the development of the flow-system. There has been conducted experiments with camera, microscope, and the pump's different settings. Collection of plankton has been done with a plankton net. To match the size of the salmon lice planktonic stages, the plankton was filtered to be in a size from 180-500 μ m. Ethanol were added to the plankton samples, before they were diluted to the desired density. Vertical collection method resulted in a higher sample density. The results indicate that filming with the camera setting «L 24M 6000 x 4000» in combination with a light source under the object table, and a 9x magnification provided the clearest pictures. A pump speed at 5ml/min gave the best pictures. A lower pump speed resulted in better image quality, but more time usage. A higher pump speed resulted in a reduced image quality, but with lower time usage. The results indicate that the flow-system provided videos of sufficient quality to be used as training data for AI-software.

The results attained from this thesis can be used to develop a flow-system in combination with artificial intelligence, for analyzing organisms in a plankton sample.

Forord

Denne bacheloroppgaven er skrevet av studenter ved Biomarin Innovasjon, NTNU Ålesund. Temaet for oppgaven baserer seg på metodene og modellene som benyttes for innsamling og registrering av lakseluslarver. Bacheloroppgaven tar for seg utvikling av et flow-system, som sammen med kunstig intelligens kan analysere organismer i planktonprøver. Oppgaven har gitt god innsikt i hvordan dagens modeller benyttes, samt utfordringene knyttet til registrering av lakseluslarver.

Vi ønsker å rette en takk til våre veiledere Stig Atle Tuene og Lars Christian Gansel, som har bidratt med faglig og teknisk kompetanse. Vi ønsker også å takke Atlanterhavsparken som har bidratt med utstyr-og verktøy, teknisk kompetanse og fasiliteter.

Innholdsfortegnelse

1.0	Innledning	1
1.1	<i>Lakselusens biologi</i>	2
1.2	<i>Forekomst av dyreplankton i nord-atlantiske vannmasser</i>	3
1.3	<i>Metoder for innsamling av planktonprøver</i>	5
1.4	<i>Trafikklyssystemet og modeller av lakselusens planktoniske stadier</i>	5
1.5	<i>Utfordringer med dagens modeller</i>	7
1.6	<i>Metodikk for telling av luselarver</i>	8
1.7	<i>Kunstig intelligens</i>	9
1.8	<i>Bruk av kunstig intelligens til identifisering av plankton</i>	9
1.9	<i>Formål</i>	10
2.0	Materiale og metoder	11
2.1	<i>Innsamling og behandling av planktonprøver</i>	11
2.2	<i>Dyrking av lakselus og eggstrenger</i>	13
2.3	<i>GHL Doser 2 pumpesystem</i>	14
2.4	<i>Lupe og kamerasystem</i>	15
2.5	<i>Utvikling av et observasjonskammer</i>	16
2.6	<i>Beskrivelse av flow-systemet</i>	18
2.7	<i>Metodikk ved telling av organismer i planktonprøver</i>	19
3.0	Resultater	20
3.1	<i>Hastighet og bilde kvalitet</i>	20
3.2	<i>Prøvetetthet i planktonprøver</i>	21
3.3	<i>Kamerainnstillinger</i>	22
3.4	<i>Ulike lyskilder</i>	23
3.5	<i>Planktoninnsamling og testing av flow-system</i>	24
3.5.1	<i>Observerte dyreplankton</i>	24
3.5.2	<i>Tidsbruk og observerte dyreplankton ved ulike hastigheter</i>	25
3.5.3	<i>Tidsbruk ved bruk av flow-systemet</i>	25
4.0	Diskusjon	26
4.1	<i>Innsamling og behandling av planktonprøver</i>	26
4.1.1	<i>Filtrering og tetthet av prøvemateriale</i>	27
4.2	<i>Dyrking av lakseluslarver</i>	27
4.3	<i>Lyskilder og kamerainnstillinger</i>	28
4.3.1	<i>Lyskilder</i>	30
4.4	<i>Pumpehastighet</i>	30
4.5	<i>Tidsbruk ved flow-systemet</i>	31
4.6	<i>Utvikling av observasjonskammer</i>	33
4.7	<i>Oversikt over fordeler og ulemper ved utvikling av flow-systemet</i>	34

<i>4.8 Videreutvikling av flow-systemet</i>	35
5.0 Konklusjon	35
Bibliografi	36

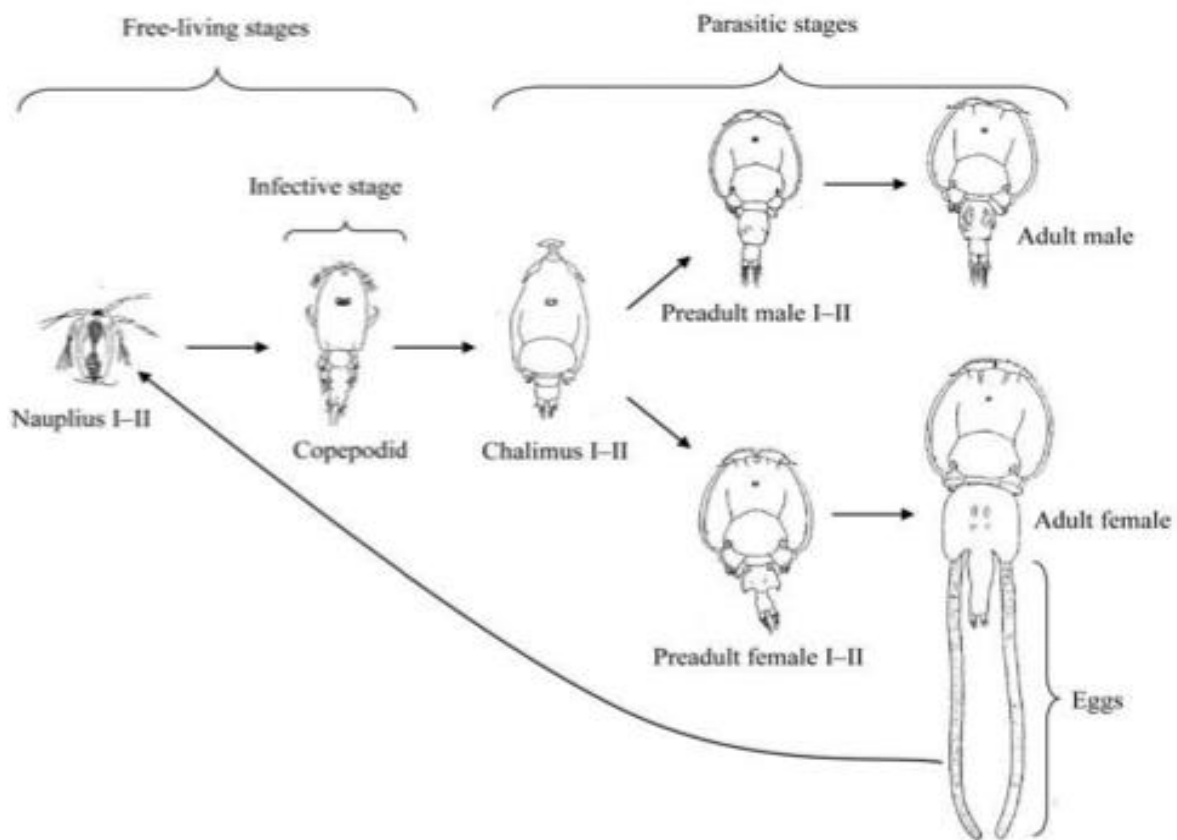
1.0 Innledning

Norsk oppdrettsnæring har hatt eksponentiell vekst siden næringen fikk sitt fotfeste på tidlig 60-tallet. Norge har etablert seg som den største eksportøren av oppdrettslaks i verden. Siden 2009 har lakseeksportens verdi tredoblet, med en samlet eksportverdi på om lag 72,5 milliarder kroner i 2019 (SSB, 2020). Lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*), er en av næringens største utfordringer. Lakselusens høye resistens og hyppig formeringsevne, medfører både økonomiske og velferdsmessige utfordringer. I 2018 ble det eksportert norsk laks til en verdi av 64, 5 milliarder kroner (SSB, 2020). Samme år ble det brukt over 5,2 milliarder kroner på tiltak knyttet direkte opp mot bekjempelse av lakselus (Ilaks, 2018). Den kraftige økningen av lakselus har også påvirket norsk villfisk, med rapporterte tilfeller av infiseringer på både villaks og villørret (Grimnes et al. 1999). I 2010 – 2014 ble det anslått årlig tap av 50 000 villaks som følge av lakselus, noe representerer om lag 10% av den totale villaksbestanden (Karlsen, 2019).

På bakgrunn av utfordringene er det iverksatt tiltak for å begrense ytterligere vekst av lakselus. Fiskeridirektoratet publiserte i 2018 en forskrift som hadde som formål: «å redusere forekomsten av lakselus slik at skadevirkningene på fisk i akvakulturanlegg og i viltlevende bestander av laksefisk minimaliseres, samt redusere og bekjempe resistensutvikling hos lakselus» (Lovdata, 2016). De implementerte tiltakene består av modeller for registrering og loggføring av lusebestanden i utsatte områder. Metodikken bak disse modellene har blitt kritisert, ettersom de er tidkrevende og utfordrende å validere (Sjømat Norge, 2020). Til utbedring av modellene har det blitt gjennomført studier som sammenligner metoder for registrering av lakseluslarver (Bui et al., 2021). Felles for metodene er at de ikke gir et dekkende bilde av antall lakseluslarver i et område i sanntid. En mulig forbedring av dagens metoder er ved bruk av kunstig intelligens hvor det kan lages automatiske modeller for gjenkjenning av lakselusens ulike stadier. Et slikt AI-system krever imidlertid trenings- og valideringsdata i form av bilder av lakselusens ulike stadier.

1.1 Lakselusens biologi

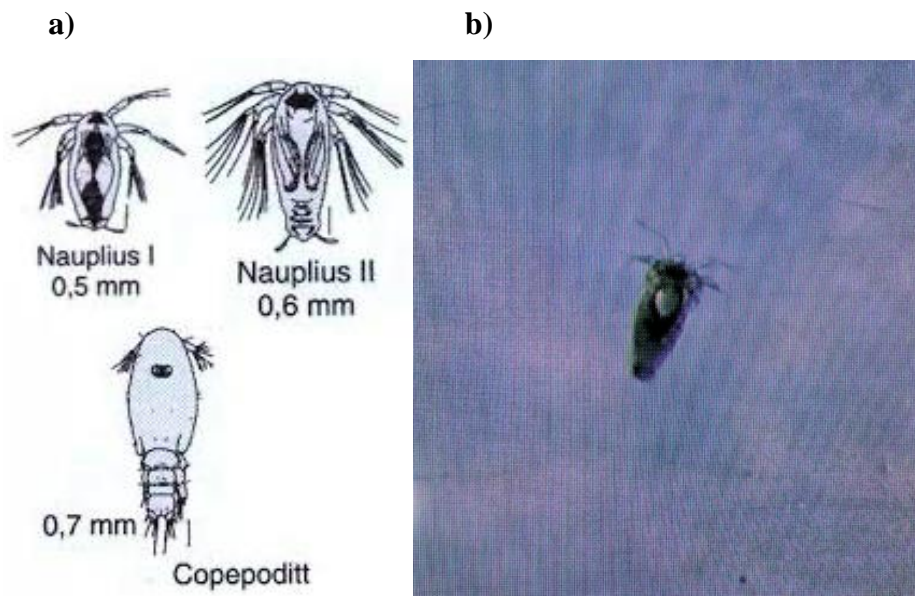
Lakselus er en ektoparasitt som kan infisere all laksefisk (Nicholls, 2017). I områder med mye oppdrett av laksefisk har det de siste årene vært en stor økning av antall lakselus (Dalvin, 2018). Lusen spiser laksens skinn og blod. Dette medfører både redusert vekst og svekket helsetilstand hos fisken. Lakselusen utvikler seg gjennom åtte livsstadier, og utviklingshastighet er blant annet avhengig av temperaturen i sjøen. Høye temperaturer korter ned tiden fra lakselusen klekker, og til den når det siste utviklingsstadiet (Hamre et al., 2013).



Figur 1. Lakselusens livssyklus. Figuren illustrer lakselusens frittlevende, infeksjons- og parasittiske utviklingsstadium. Hentet fra: (Igboeli et al., 2014).

Voksen hann- og hunnlus når lengder opp til 5- og 10 mm. Livssyklusen er karakterisert ut ifra åtte stadier, hvor hvert av stadiene videreutvikles gjennom skallskifte: to planktoniske stadier, ett infeksjons copepoditt-stadie, to parasittiske chalimus-stadier, to bevegelige stadier og et siste bevegelig stadie hvor lusen oppnår kjønnsmodning (Hamre et al., 2009).

I de to første stadiene, *Nauplius* og *Copepoditt*, er lusen planktonisk. Levetiden til copepoditten varierer alt fra en uke til en måned, avhengig av temperatur (Sandvik, 2019). Overlevelsesraten til copepoditten etter infeksjon på en vert, er større ved 12°C, enn ved 7°C. (Hamre et al., 2009). Undersøkelser av lakselusens planktoniske stadier i frie vannmasser, herunder *nauplius* og *copepoditt*, vil kunne si noe om det aktuelle lusnivået og smittepresset som oppstår i fjordene.

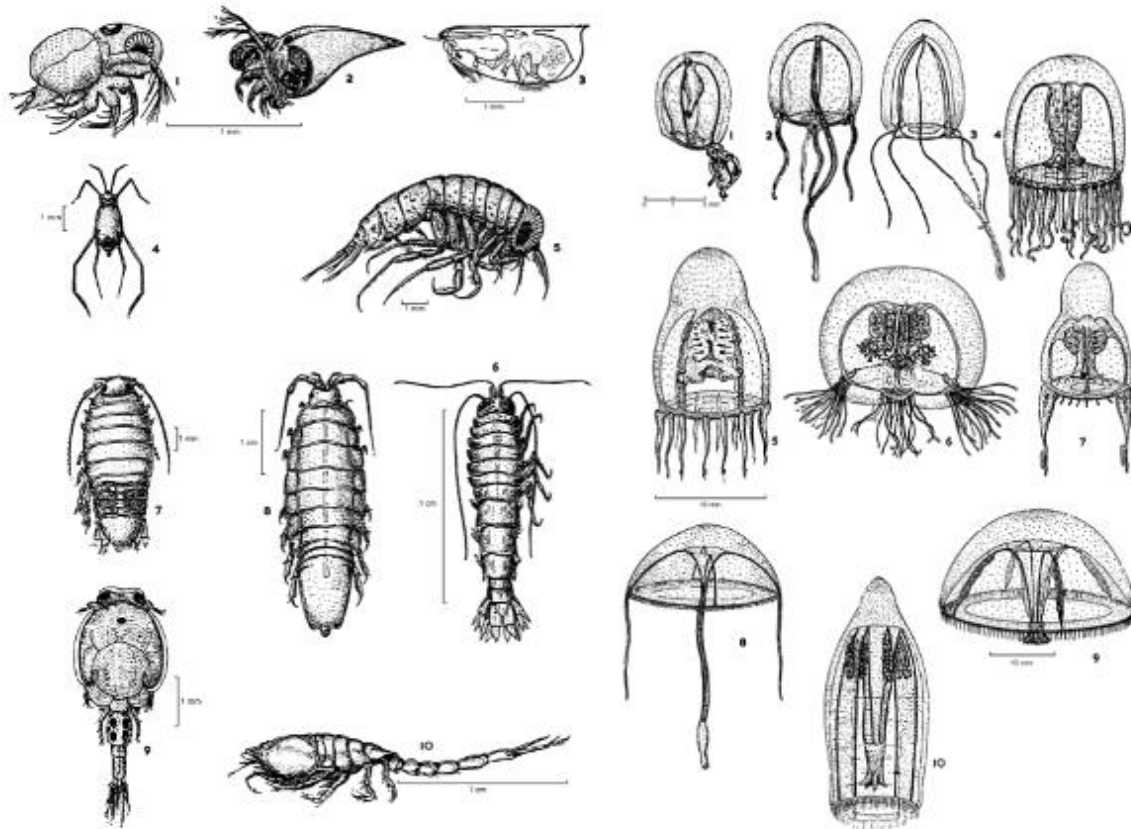


Figur 2. Oversikt over lakselusens planktoniske stadier. Sammenligning av nauplius-stadiet hentet fra havforskningsinstituttets modell (a), mot egenprodusert bilde (b).

De planktoniske stadiene *nauplius* og *copepoditt* er stadiene man ønsker å få et anslag over når man innsamler planktonprøver. Modellene som brukes må kunne skille *nauplius* og *copepoditt* fra andre dyreplankton, ved telling og identifisering.

1.2 Forekomst av dyreplankton i nord-atlantiske vannmasser

Dyreplankton eller «zooplankton», er fellesbetegnelsen for en rekke små dyr som flyter eller driver fritt i vannmassene. Mange av artene foretar sesongmessige vertikalvandring. Om vinteren står de på flere hundre meters dyp og beveger seg opp til overflaten om våren og sommeren (Harris et al., 2000). Flere av artene foretar også daglig vertikalvandring. Disse artene oppholder seg i dypere vannlag midt på dagen, og nærmere overflaten i de mørkere delene av døgnet. Dyreplankton har forholdsvis kort liv, og små arter kan ha flere generasjoner i løpet av et år (Dommasnes et al., 2008).



Figur 3. Oversikt over noen ulike dyreplankton og gelèplankton som finnes i norske farvann (Harris et al., 2000).

Blant dyreplankton er ulike arter av hoppekreps, krepsdyr og amfipoder de viktigste organismene i Norskehavet. Hoppekreps opptrer i store konsentrasjoner, og utgjør 80-90% av den samlede biomassen av dyreplanktonet i de atlantiske havområdene (Skogen et al., 2007). Andre vanlige planktonorganismer som opptrer hyppig i vannlagene, er pilormer og gelèplankton. Fiskeegg og larver defineres også som dyreplankton (Skogen et al., 2007).

Maneter, ribbemaneter og salper er effektive beite- og rovdyr, og kan, når de opptrer i store tettheter, ha en betydelig innvirkning på energiflyten i økosystemet. Gelèplankton inngår ikke positivt i utnyttbare næringskjeder. Videre er det vanskelig å samle opp og identifisere/skille de ulike artene fra hverandre. Per dags dato er det tilnærmet ingen overvåking av denne planktongruppen (Dommasnes et al., 2008).

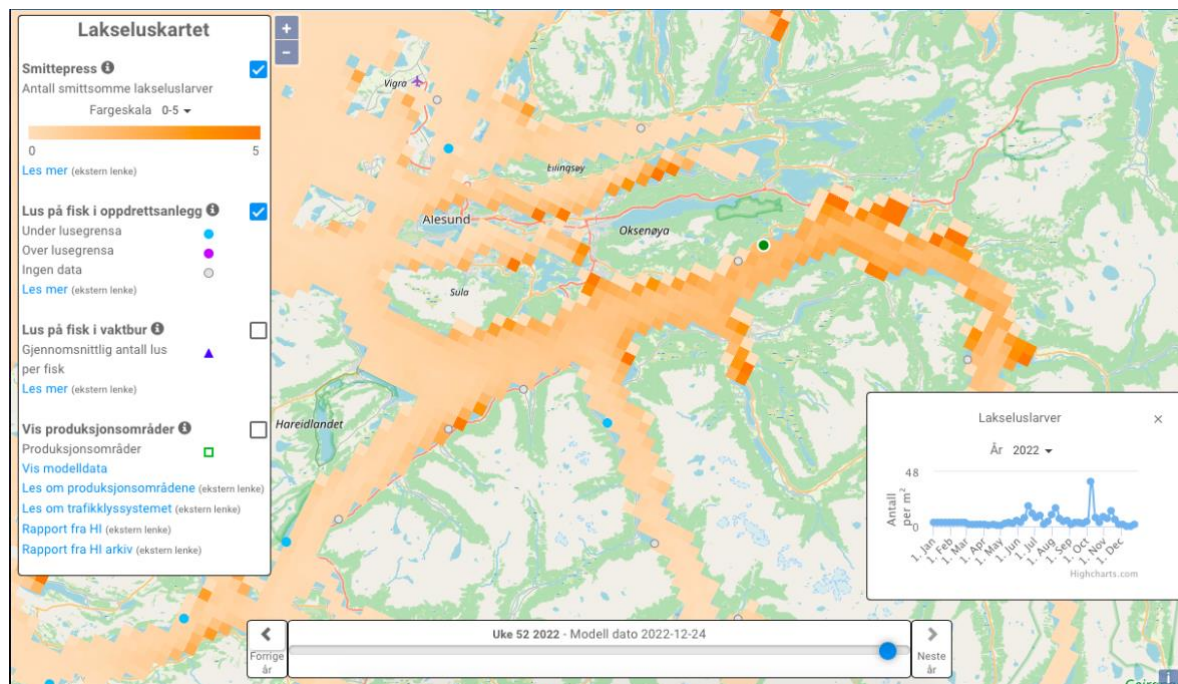
1.3 Metoder for innsamling av planktonprøver

Innsamling av planktonprøver gjennomføres i hovedsak ved bruk av planktonhåv. Bruk av planktonhåv kan deles inn i to ulike bruksområder, horisontalt og vertikalt. Metodene benyttes ved bruk av vertikal/horisontal tråling eller gjennomstrømning (Andersen et al., 2022). Ved innsamling av planktonprøver blir lengde, strømhastighet og håvens volum beregnet for å fastslå antall liter filtrert sjøvann. Norske fjorder inneholder et sted mellom 0-5 copepoditter per m⁻². Studier viser til funn av maksimum ≈ 1 individ per 3 m³ ved bruk av horisontale trålinger med planktonhåv (Bui et al., 2021). Lakselusens spredte utbredelse i dens fritt-svømmende stadier gjør innsamlingen mer utfordrende (Nelson et al., 2018). For å oppnå representativ data av antall lakseluslarver i et område kreves det dermed filtrering av store mengder sjøvann, noe som vil være utfordrende ved tradisjonell bruk av planktonhåv.

Andre metoder som for eksempel bruk av pumpe kan benyttes ved innsamling av planktonprøver. I en artikkel publisert av Hassel, et al (2013) beskrives prøvetakingsmetoder i ulike dimensjoner. Her poengteres det at metoden bør gjenspeile individene man ønsker undersøkt. Ulik metodikk som ved bruk av for eksempel Multisampler, FLYGT, Harstadtrål, Gulf III eller Otter Surface Sampler, vil resultere i prøver som representerer ulik marin flora (Hassel et al., 2013). Overordnet for metodene som benyttes er kravet om tilstrekkelig kapasitet for å få et dekkende bilde over utvalget av plankton i et gitt område. Taggart & Leggett (1984) sammenlignet effektivitetsforskjellene mellom pumpe og vertikale trålinger. Studiet viser at total mengde innsamlet plankton var tilnærmet lik. Imidlertid viste bruken av pumpe til et mer representativt utvalg av plankton, og et lavere tidsbruk (Taggart & Leggett, 1984).

1.4 Trafikklyssystemet og modeller av lakselusens planktoniske stadier

Havforskningsinstituttets hydrodynamiske spredningsmodell, overvåker og beregner mengden planktoniske luselarver i et gitt område. Modellen viser hvor mange planktoniske luselarver (copepoditter) per kvadratmeter som befinner seg i det aktuelle området. I det modellbaserte overvåkingssystemet gir strømmodellen NorKyst-800 informasjon om strøm, temperatur og salinitet i tre dimensjoner langs kysten og i fjordene. Basert på kunnskap om lusebiologi, atferd og dødelighet beregner modellen hvordan de planktoniske stadiene til lakselus sprer seg. Deretter estimeres tetthet av lakselus i de aktuelle områdene (Sandvik, 2016).



Figur 4. Havforskningsinstituttets lakseluskart. Bildet viser oversikt over smittepresset i Møre og Romsdal. Smittepresset karakteriseres ut ifra fargekoder (gult for lavt smittepress, rødt for høyt smittepress). Hentet Havforskningsinstituttets nettsider.

Hvor mange lakselus som klekkes på oppdrettsanleggene er avgjørende for at modellen skal gi et representativt resultat. Oppdrettere er pålagt til å ukentlig rapportere inn hvor mye lakselus som er på fisken, samt temperatur i sjøen. I tillegg rapporteres det månedlig hvor mye fisk som er til stede ved det aktuelle anlegget. De overnevnte opplysningene benyttes til å estimere hvor mange luselarver som klekkes i timen, i hvert anlegg langs hele kysten (Sandvik, 2013). Videre, kan smittepresset og lakseluskartet kalibreres opp mot observasjoner av lus på fisk som har stått ute i vaktbur, eller mot lus på villaks/utvandrende smolt. Ved å analysere resultatene, kan det avklares hvor antallet luselarver utgjør en fare for de ville laksestammene- selv i områder hvor det ikke har blitt gjort observasjoner (Havforskningsinstituttet, 2023). Resultatene fra den hydrodynamiske spredningsmodellen fungerer som en statusrapport om lusenivået langs hele norskekysten, og i fjordene. Modelldataene inngår som en viktig del av planlegging av feltaktivitet, sluttrapportering til Mattilsynet, Havforskningsinstituttets risikovurdering av norsk oppdrettsfisk, og grunnlagsdata til *trafikklyssystemet*¹ (Johnsen et al., 2014).

¹ Trafikklyssystemet bygger på lakselusens miljøpåvirkning. Resultatene av kontinuerlig overvåkning av lakselus avgjør om oppdrettere får øke, minske eller fortsette med dagens produksjon.

1.5 utfordringer med dagens modeller

Dagens modeller tar for seg lusepåslag i anlegg, og lakselusens biologi satt sammen med strømmodeller. Strømmodellene fremviser blant annet faktorer som salinitet, vind, temperatur, tidevann og ferskvannsretning. Parametere som omhandler lakselusens biologi, tar for seg de biotiske faktorene som kan påvirke lakseluslarvens bevegelsesmønster (Frank et al., 2013). Dette kan være i form av antagelser om døgngrader, utvikling, adferd eller vertikalvandring. utfordringen knyttet til disse modellene er at de ikke tar høyde for årsaken til økt eller minsket luseoppblomstring. Strømmen kan variere ved ulike dyp, samtidig som det ikke finnes konkret data rundt hvilke dybder luselarver klekkes. Grunnet et dynamisk strømbilde, er oppdrettsanlegg sine lokasjoner ofte utsatt for vertikale vannbevegelser. Modellene som benyttes i dag fremstiller dermed ikke nødvendigvis realiteten. På bakgrunn av dette er det viktig å utvikle, kalibrere og teste modellene opp mot faktisk data av antall lakseluslarver i havet. Som substitutt til nøyaktig data blir påslaget av lakselus benyttet som et anslag på antall lakseluslarver i undersøkte vannmasser. Dette fører til usikkerhet rundt hvor nøyaktige resultater modellene fremviser (Sandvik et al., 2017).

Studier viser til at spredningen av lakselus gjøres i de planktoniske fasene av lakselusens livssyklus (nauplius og copepoditt). Kunnskap rundt lusens planktoniske stadier er imidlertid begrenset, særlig om vertikalvandring og adferd (Arne Bjørn et al., 2011). Faktorer som trekkes frem som påvirker lusens vertikalfordeling er lys og saltholdighet. Disse er nøkkelfaktorer for å kunne utarbeide bedre modeller for spredning og transport av luselarver (Arne Bjørn et al., 2011). De er relevante for modellering av fjordene, som har store forskjeller horisontalt og vertikalt av strøm og saltholdighet. Mer forståelse av hvordan saltholdighet, lys og mørke påvirker lusens vertikale og horisontale bevegelser, vil gi mer detaljert data til numeriske fjordmodeller. Dette kan også bedre mulighetene for beregning av spredning, noe som kan brukes som bekjempelsestiltak mot lakselus (Arne Bjørn et al., 2011). Havforskningsinstituttets rapport nr. 12-2017 fremhever at valideringen av dagens modeller er utfordrende. Rapporten trekker frem at modellene estimerer antall smittsomme lakselus, mens observasjonene som modellen benytter er hentet fra lusetellinger gjort på laks (Sandvik et al., 2017). På bakgrunn av dette tydeliggjøres behovet etter å utforme modeller som kan etablere en klar sammenheng mellom antall lakselus i frie vannmasser, og antall lus som setter seg på fisken (Sandvik et al., 2017).

1.6 Metodikk for telling av luselarver

Ved telling av lakseluslarver i en planktonprøve filtreres vekk uønskede større planteplankton, dyreplankton og alger. Maskestørrelsen på filteret som brukes må korrelere med størrelsen på organismen man ønsker å identifisere. Den tradisjonelle metoden for å telle lakselus i en planktonprøve gjøres ved bruk av lysmikroskopi. Ved bruk av denne metoden blir innsamlet plankton telt manuelt. Metoden kan benyttes sammen med fluorescerende lys (Thompson et al., 2022).

PCR (polymerasekjedereaksjon) er en metode for å identifisere antall lakseluslarver i en prøve, ved å avdekke antall DNA kopier i en luselarve (Fossum, 2021). Automated fluid imaging er en metode som benytter seg av digitale bilder i et Flowcyntometer.

Flowcyntometeret sorterer celler i en løsning, og tilfører væske med partikler til et *flow-system*, hvor et kamera tar kontinuerlig bilder (Kierulf, 2022). Flow-system er en metodikk som presenterer informasjon gjennom en flytende strøm av energi eller material (Ranger, 1981). Ved bruk av flowcyntometri blir silhuetten til de ulike partiklene fanget opp, og lakseluselarvene kan skilles fra andre organismer ved bruk av et AI-bildegjenkjenningsprogram.

En studie utført i 2020, sammenlignet ulike metoder for telling og registrering av lakselus. Hensikten var å avdekke hvilke metoder som viste seg til å være tidsbesparende og kostnadseffektive (Bui et al., 2021). Studiet la til grunn at tradisjonell telling av larver med lysmikroskopi gir høyest presisjon, men er både dyrt og tidkrevende. Metoden krever høy kompetanse for å unngå at luselarver blir oversett. Fluorescerende lys kortet ned tiden av selve tellingen, men krevde preparering av prøvene og lagring over tid. PCR-metodene viste til høy presisjon, men med varierende nøyaktighet fra prøve til prøve. Tidsbruken ved telling- og registrering varierer etter når på året man samler inn prøver. Hvor effektivt man teller organismene i planktonprøvene, vil også variere fra person til person. Metodikken forbundet med telling av plankton, er knyttet til relativt krevende prosesser. Flow-systemet denne oppgaven presenterer vil forenkle disse prosessene.

1.7 Kunstig intelligens

AI (artificial intelligence), kan defineres som «*en robot eller datamaskin sin evne til å utføre oppgaver som vanligvis blir gjort av mennesker ettersom det krever intelligens og dømmekraft*» (Copeland, 2023). Ved utvikling av AI, må programmet trenes opp for å kunne utføre den konkrete oppgaven den er bygget for å gjøre. Dette gjøres ved å mate programmet med eksempeldata og treningsdata. Datasettet deles inn i to deler; et for trening og et for validering. Programmet benytter seg av ulike teknikker og matematiske modeller for å analysere, trekke erfaringer og sammenhenger mellom ulike datasett (PWC, 2023). AI blir i dag benyttet for å detektere, identifisere og klassifisere ulike arter dyreplankton.

Forskningsartikkelen Lou, et al (2018) beskriver ulike teknikker brukt for å trene opp AI-programvare. En av teknikkene de benytter seg av er kalt «*transfer learning*» og blir brukt for å fremskynde treningstiden til AI-programmet. Artikkelen beskriver også en teknikk (*Mask R-CNN*) for telling av antall individer i en planktonprøve. Mask R-CNN gjorde det mulig å automatisere telleprosessen (Luo et al., 2018).

1.8 Bruk av kunstig intelligens til identifisering av plankton

En bacheloroppgave ved NTNU Ålesund beskriver utvikling av mer effektive metoder for å registrere lakseluslarver (Jensen et al., 2021). Oppgaven benyttet seg av et kamera-montert mikroskop for å fotografere lakselus i planktonprøver. Forskningen konkluderte med at 98,41% av lakselusen ble identifisert ved bruk av den utviklede metoden. Forskningen viser til muligheter innenfor AI utvikling som et potensielt alternativ for effektiv telling.

En artikkel publisert i 2018 beskriver nevralt nettverk (*Convolutional neural networks*) sammen med videoanalyse for gjenkjennelse av fytoplankton i frie vannmasser. Ved gjennomføring av forskningen ble det benyttet et FlowCam, som kombinerer digital videobehandling, strømmingscytometri og mikroskop i ett og samme verktøy (Lloret et al., 2018). Sammensatt danner dette et dekkende bilde over mengden fytoplankton i en planktonprøve. Avansert maskinlæring med nevralt nettverk kan automatisere metoder for å fastslå utbredelsen av plankton. Automatiseringen resulterer i mer effektive og presise resultater, enn hvis samme prøve blir registrert gjennom tradisjonelle metoder (González et al., 2019).

Kaichang Cheng (2019), tar for seg problematikken knyttet til registrering av omfattende mengder planktonprøver. På bakgrunn av dette ble det utviklet et bildegjenkjenningssystem som ved hjelp av konvolusjonelle nevrale nettverk (CNN), og automatisk klassifisering av bildene, vil forenkle registreringsprosesser. Resultatene viste til at CNN modellene ga ResNet 50² en gjenkjenningsgrad på 95.52 % og 94.13%. Studiet viser til at bruk av kameraoppsett med bildegjenkjennings-programvare kan øke effektiviteten ved gjennomføring av planktonregistrering (Cheng et al., 2019).

1.9. Formål

Institutt for biologiske fag i Ålesund (IBA) ser på mulighetene til å knytte kunstig intelligens opp mot analysering av lakseluslarver i planktonprøver. Det er pågående utvikling av en AI-programvare som skal identifisere og registrere ulikt plankton i ferske planktonprøver.

Imidlertid er prosjektet avhengig et flow-system som kan benytte ferske planktonprøver til trenings-og valideringsdata til AI-programvaren. Det endelige målet er et stasjonært oppsett hvor ferskt plankton kan pumpes direkte fra sjøen til flow-systemet, og analyseres i sanntid.

Formålet med bacheloroppgaven er å utvikle et flow-system som kan benyttes sammen med AI til analysering av organismer i ferske planktonprøver.

² ResNet 50: Residual network, en spesifikk type convolutional neural network introdusert av Kaichang Cheng i studien «*Enhanced convolutional neural network for plankton identification and enumeration*»

2.0 Materiale og metoder

2.1 Innsamling og behandling av planktonprøver

Innsamling av plankton ble utført ved bruk av en planktonhåv (Figur 5).

Planktonhåven bestod av et sylinderformet nett med en maskestørrelse på 1000 μm . Enden er utstyrt med et tau som gjør det mulig å knyte igjen håven. Planktonet kan dermed tømmes over i en beholder etter bruk. Håven er utstyrt med harpe, snøre og lodd. Kombinasjonen av disse gjør det mulig å utføre diverse metoder for innsamling av plankton.



Figur 5. Planktonhåv benyttet til innsamling av plankton ved bruk av horisontal innsamlingsmetode. Spesifikasjoner; Lengde; 5 meter, Åpning; 50 cm i diameter.

Innsamling av plankton ble utført ved fem forskjellige lokaliteter; Gudmundset ($62^{\circ}27'11.4''\text{N}$ $6^{\circ}36'15.3''\text{Ø}$), 03.02.2023, Tueneset ($62^{\circ}28'15''\text{N}$ $6^{\circ}9'17''\text{Ø}$), 19.03.23, Aspevågen ($62^{\circ}22'17''\text{N}$ $6^{\circ}1'35''\text{Ø}$), 28.03.23, Steinvågneset ($62^{\circ}28'20.15''\text{N}$ $6^{\circ}7'18.84''\text{Ø}$), 14.04.23 og Sandvika ($62^{\circ}27'56.41''\text{N}$ $6^{\circ}5'37.78''\text{Ø}$) 24.04.23.

Det ble benyttet to metoder for innsamling; vertikal (*tråling*) og horisontal (*gjennomstrømning*). Ved horisontal innsamling ble planktonhåven lagt i sjøen på foretrukken dybde. Dybden varierte fra 0-2 meter, avhengig av lokasjon og vær/strømforhold. I dårlige værforhold ble harpe og lodd benyttet til å få håven til å ligge i ro i sjøen. Loddet ble kastet ut

i sjøen i en bestemt retning, og harpen knytt fast i motsatt retning. Nettet ble dermed liggende strakt i sjøen. Håven lå i sjøen i 20 minutter.

Ved vertikal innsamling ble det utført åtte trålinger på hver av lokalitetene. Loddet ble kastet ut i sjøen for å få håven til å synke raskt til bunn. Dybden på de ulike lokalitetene ble anslått til å være 12-15 meter. Etter at håven nådde bunnen, ble den dratt vertikalt gjennom vannet. Innsamlet plankton ble tilført en beholder. Prøvematerialet ble tatt med til NTNUs laboratorium for videre behandling.

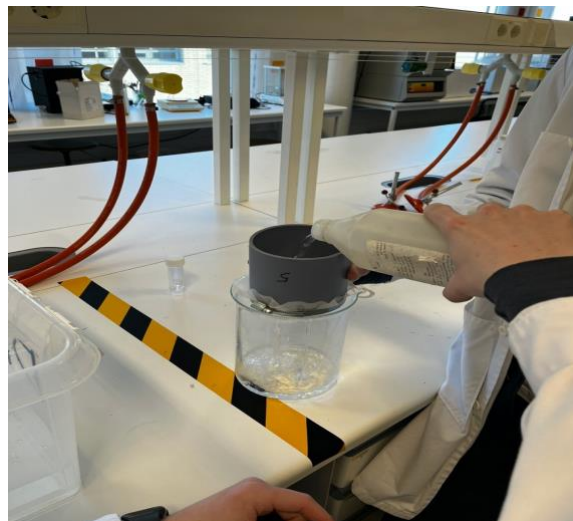
Anslag over estimert volum filtrert sjøvann ved gjennomstrømning:

$$\text{Volum vann som blir filtrert} = \text{Areal} * \text{tid} * \text{strømhastighet}$$

Anslag over estimert volum av filtrert sjøvann ved vertikale trålinger:

$$\text{Volum vann som blir filtrert} = \text{Areal} * \text{Dybdeintervall} * \text{Antall trålinger}$$

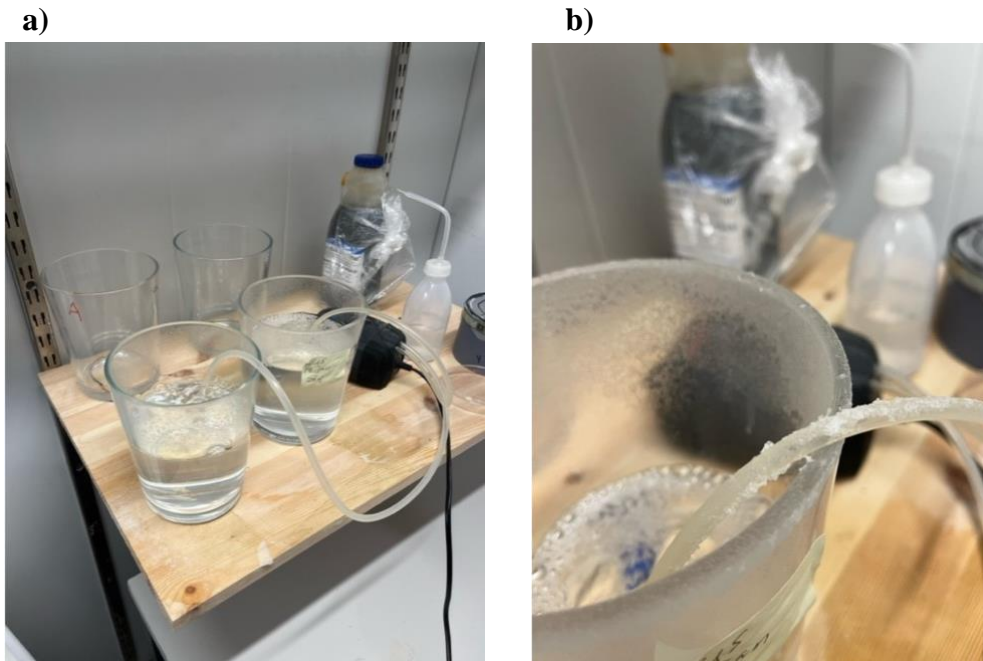
Ferske planktonprøver ble tilsatt 80% etanol. Mengden etanol ble tilpasset størrelsen på prøvene. Prøvene ble deretter filtrert. For å samsvare med lakselusens planktoniske stadier, ble prøvene filtrert til en nedre grense på 180 μm , og en øvre grense på 500 μm . De ulike prøvene ble overført til beholdere markert med navn, dato, størrelsessjike (μm) og innsamlingsmetode (horisontal/vertikal).



Figur 6. Filtrering av planktonprøve. Planktonprøven ble filtrert med en nedre grense på 180 μm , og en øvre grense på 500 μm . Uønskede mindre partikler og større plante- og dyreplankton ble filtrert vekk.

2.2 Dyrking av lakselus og eggstrenger

Havforskningsinstituttets lakseluskart (Figur 4) indikerte at luselarver ikke ville være til stede i prøvene. Kjønnsmoden lakselus og eggstrenger ble innsamlet fra SalMars oppdrettsanlegg på Gudmundset. Luselarver ble dyrket frem på laboratoriets kjølerom i to separate kar fylt med filtrert sjøvann. Kjølerommet holdt en temperatur på 7 °C. Karene var tilkoblet en oksygenpumpe. Tilførselen av oksygen skapte bevegelse i vannet. Bevegelsen i vannet forhindret oppsamling av eggstrenger og larver i bunn av karene. Uten tilstrekkelig oppfølging ved første dyrking, fordampet sjøvannet som følge av oksygentilførselen (Figur 7 b). Ved videre dyrking ble det tatt høyde for fordampning. For å forhindre uønsket økning i salinitet ble det tilsatt filtrert vann etter behov.



Figur 7. a) Dyrking av lakseluslarver og eggstrenger. b) krystalldannelsen som fulgte av fordampning.

Etter første parti, ble dyrking og klekking av lakseluslarver flyttet til Atlanterhavsparkens fasiliteter. Det benyttede kjølerommet ble satt til en temperatur på 15 °C. Det ble benyttet levende og døde luselarver som observasjonsgrunnlag til utvikling av flow-systemet.

2.3 GHL Doser 2 pumpesystem

Til utvikling av flow-systemet ble det benyttet en GHL Doser 2 som pumpesystem. Pumpen kontrolleres via programvaren *Doser GM*. Pumpen er designet med to ulike slanger, én som plasseres i planktonprøven, og én som plasseres inn i flow-systemet. Det var hovedsakelig hastigheten på volumet som ble pumpet ut som måtte tilpasses. For å fastslå hvilken hastighetsinnstilling som ga best videokvalitet ble det gjennomført et forsøk, hvor hastigheten på pumpen ble vurdert opp mot bildekvaliteten. Forsøket benyttet seg av planktonprøver med en øvre filtreringsgrense på 500 µm. Det ble ikke benyttet en nedre grense på størrelsessortering. Formålet med å fjerne en nedre filtreringsgrense, var å undersøke om mindre plankton og partikler ville sette seg fast i pumpen, eller et av systemets andre komponenter. Prøvematerialet hadde moderat tetthet og ble justert etter behov.

Innstilling 3: 20 ml planktonprøve på hastighet 28 ml/min

Innstilling 2: 20 ml planktonprøve på hastighet 16 ml/min

Innstilling 1: 20 ml planktonprøve på hastighet 9 ml/min

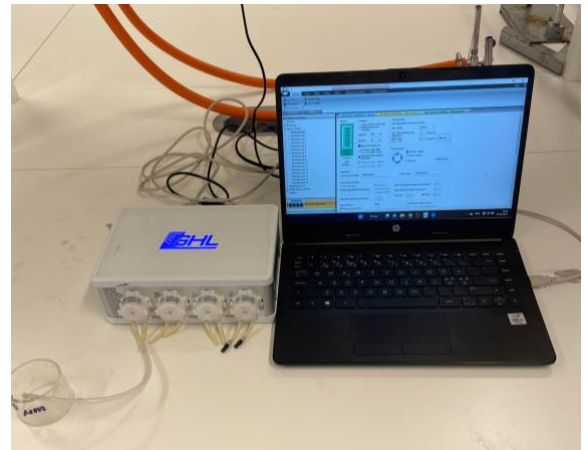
Innstilling 0: 20 ml planktonprøve på hastighet 5 ml/min

Resultat 3.1

Programvareinnstillingene som ble benyttet var:

- Max. kapasitet = 500 ml
- Min. kapasitet = ½ av total prøve
- Hurtighet = 0 (slow).
- Dosering = Etter behov.

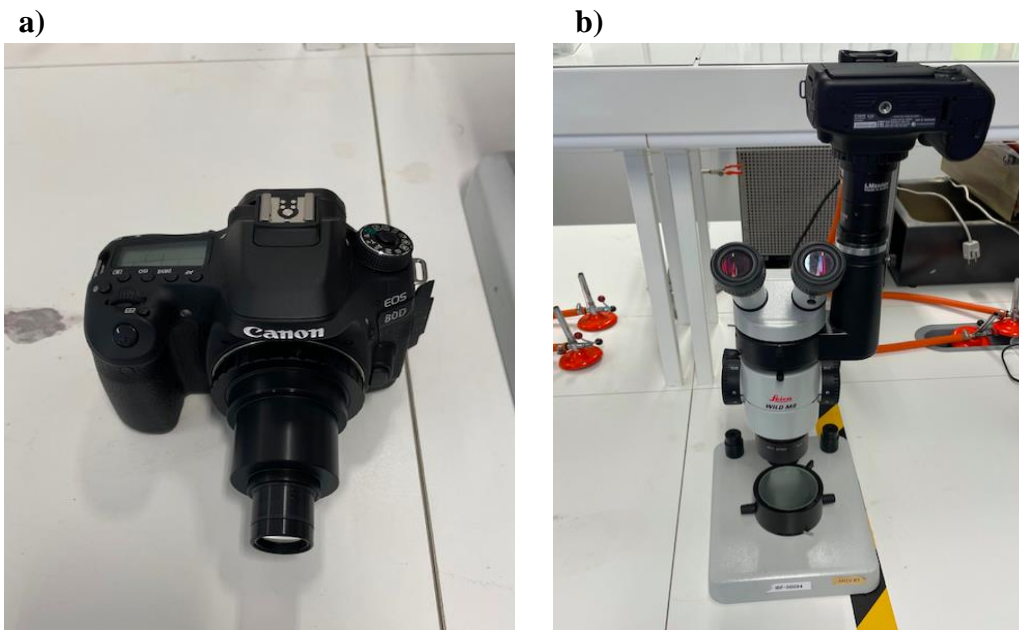
Figur 8. GHL Doser 2 pumpesystemet tilkoblet datamaskin. Programvaren vises på dataskjermen



Det ble gjennomført forsøk med ulik tetthet i prøvematerialet. Prøvemateriale med ulik tetthet ble pumpet gjennom systemet med en hastighet på 5 ml/min. Hensikten med forsøket var å undersøke hvilken tetthet som var best til identifisering av organismer, samtidig som det viste et representativt utvalg ulikt plankton.

2.4 Lupe og kamerasystem

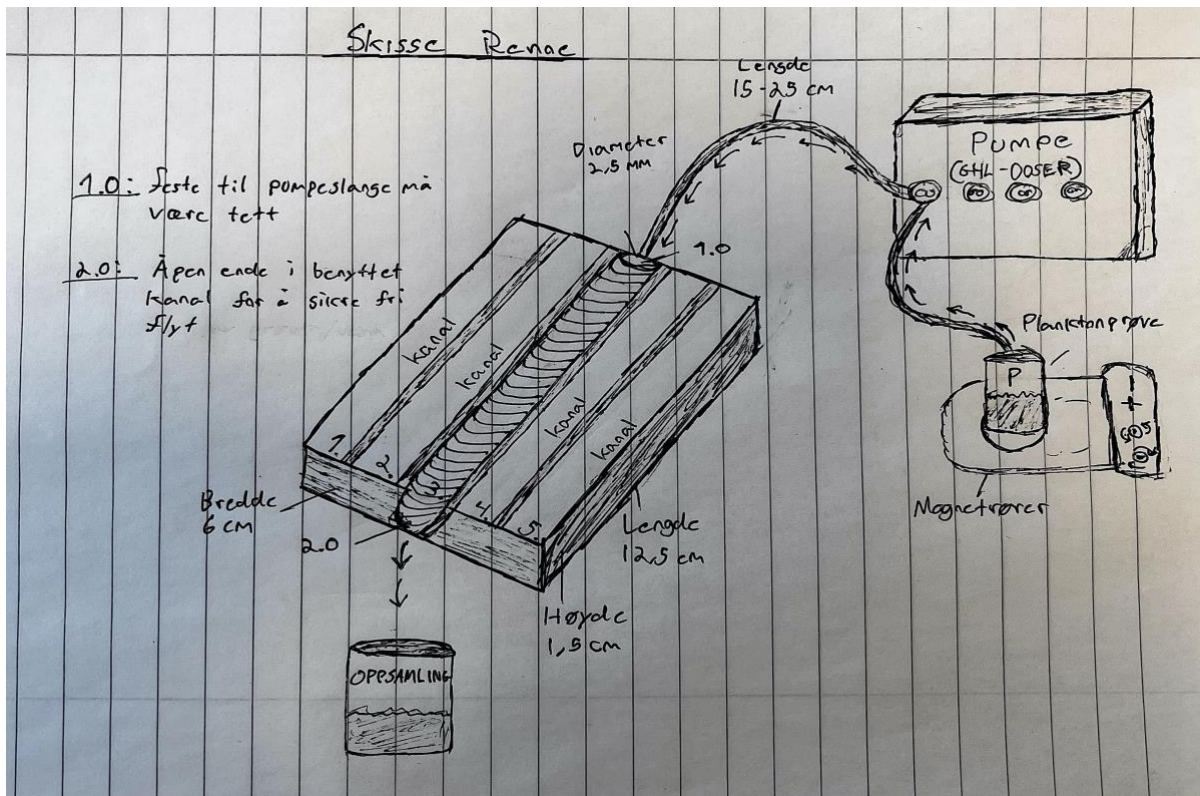
Lupen som ble benyttet er Leica Wild M8 sammen med en LM Scope C-Mount. For fotografering og opptak av video ble et speilreflekskamera montert på lupen (Figur 9 b). Lupen tilbyr et forstørrelsesområde på 6x til 50x. For å avdekke hvilke forstørrelser som var hensiktsmessig å benytte, ble det gjennomført en systematisk gjennomgang av lupens innstillinger. Det ble benyttet forstørrelser mellom 9-18x. Objektbordet til lupen er utstyrt med et vendespeil med to sider. Den ene siden består av et reflekterende speil og den andre av en matt hvit overflate. Det ble utført forsøk for å avgjøre hvilken side av vendespeilet som var hensiktsmessig å bruke. Belysning fra ulike vinkler ble testet. Fotografering og opptak av video ble gjort ved bruk av speilreflekskameraet Canon EOS 80D (Figur 9 a). Det ble gjennomført forsøk med ulike oppløsninger for å fastslå hvilke bildeinnstillinger som ga klareste bilder. Lukkehastighet ble satt på auto. ISO ble innstilt på 400. Exposure comp/AEB setting ble innstilt på -0.5, med picture style auto. For opptak av video ble det benyttet de samme innstillingene som ved billedtagning. Innstillingene ble valgt som et godt utgangspunkt til billedtakning av organismer i bevegelse. Ved videotakning ble det tatt 50 bilder i sekundet. Kameraet var koblet til en skjerm ved bruk av HDMI-kabel og adapter. Skjermen gjorde det mulig å observere prøvematerialet i sanntid.



Figur 9. Lupe og kamera. *a) Canon EOS 80D speilreflekskamera. b) Leica Wild M8 stereolupe med montert kamera.*

2.5 Utvikling av et observasjonskammer

Det ble utformet en skisse over hvordan observasjonskammeret ville se ut (Figur 10). Det ble nødvendig å sikre fri flyt av prøvene, slik at prøvematerialet kunne samles opp og brukes på nytt. Videre måtte det bores hull i riktige dimensjoner for å passe ulike pumpeslanger. Pumpeslangene består av to, 15 cm lange polyesterarmerte (PVC) slanger. Slangene har en diameter på 2,5mm. Størrelsen på observasjonskammeret måtte samsvare med lupens objektbord. Som utgangspunkt ble det benyttet et tellekammers originale design og spesifikasjoner.



Figur 10. Skisse av design til utvikling av et observasjonskammer. Skissen illustrer de ulike spesifikasjonene som ble benyttet til utformingen. Kanalene måtte være åpne for sikre fri flyt av prøver, og innløpet til pumpeslangene måtte være tett.

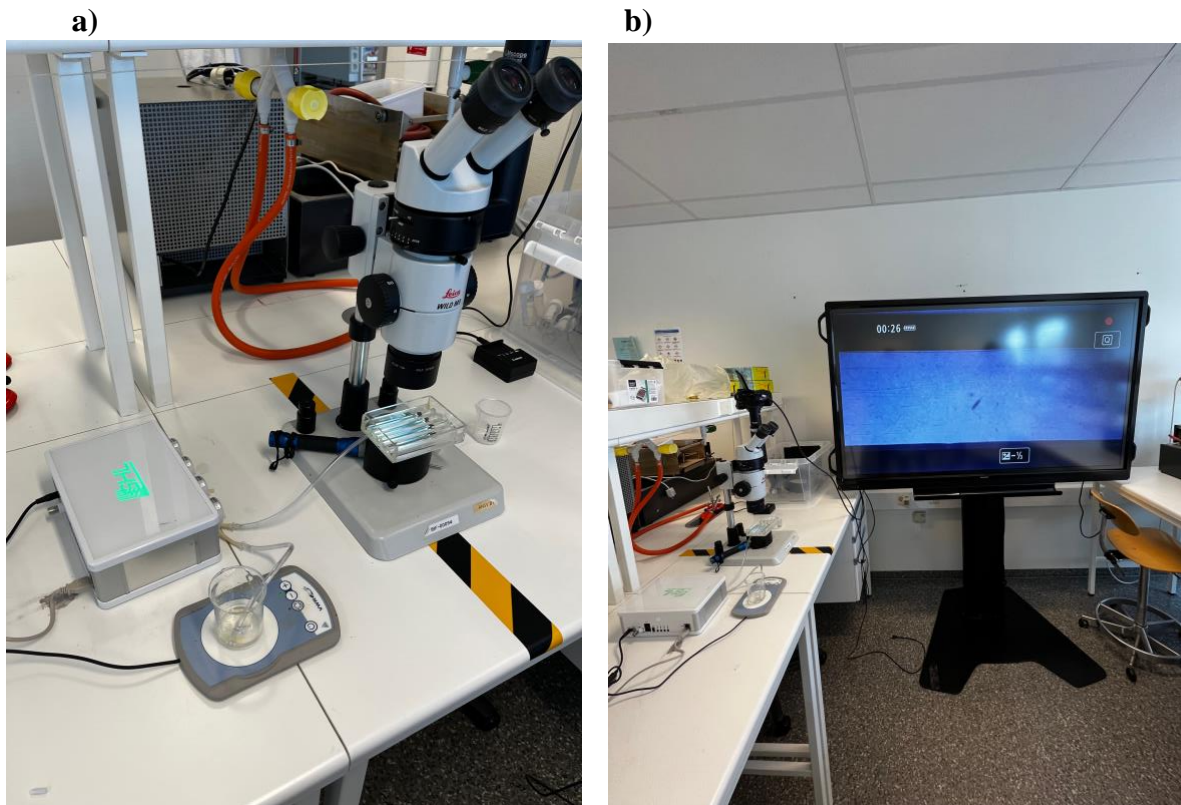
For å kunne benytte observasjonskammeret i et flow-system, ble kammeret modifisert. Atlanterhavsparkens fasiliteter ble benyttet til utformingen av kammeret. Kammeret består av en rektangulær form i plast med fem kanaler. Det ble boret to hull. Et 5mm innløp ble boret for å samsvare med pumpe slangens spesifikasjoner. For å sikre fri flyt av vann og prøver, ble et 7mm utløp boret i motsatt ende. Riper som fulgte av boringen, ble pusset bort ved bruk av sandpapir med høy korningsgrad. Utvikling av observasjonskammeret var en kontinuerlig prosess gjennom oppgaven, hvor justeringer og endringer ble utført etter behov.



Figur 11. Illustrasjon av utviklingen av observasjonskammeret. Bildene viser tre ulike steg ved utformingen av observasjonskammeret. Boring av hull, pussing av kanaler og tilpassing til pumpe slanger.

2.6 Beskrivelse av flow-systemet

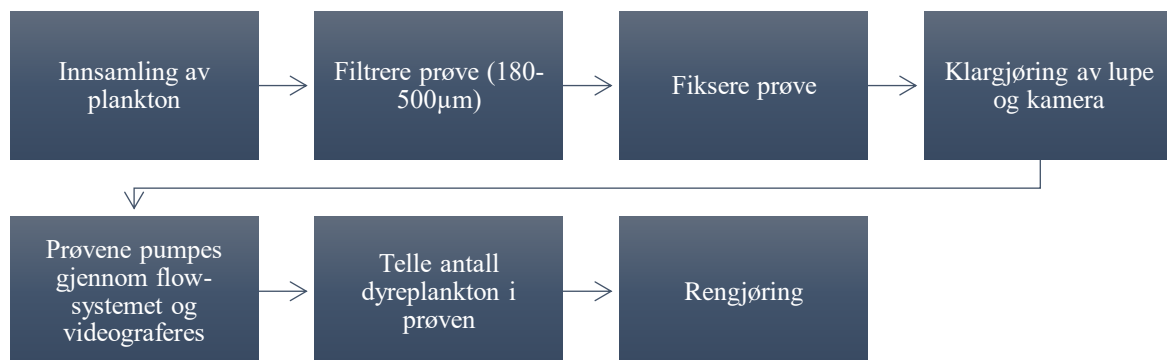
En datamaskin ble koblet til pumpen som tilførte planktonprøver til observasjonskammeret. Prøven sto plassert på en magnetrører, som sikret jevn tilførsel av plankton gjennom prosessen. En LED-lykt ble plassert under objektbordet. Kammersystemet tok bilder/videoer av prøvene som ble pumpet igjennom. I enden av observasjonskammeret ble det plassert en beholder, hvor prøvematerialet ble samlet opp. Systemet var viderekoblet til en 70'' LCD-skjerm hvor organismene ble observert i sanntid.



Figur 12. *a) Ferdig utviklet flow-system. b) Prøvemateriale ble vist på skjerm i sanntid.*

2.7 Metodikk ved telling av organismer i planktonprøver

For å avgjøre om flow-systemet var egnet til videreutvikling og implementering av AI-programvare, ble det utført en komplett gjennomgang av innsamling, filtrering og telling av organismer i en planktonprøve. Innsamlingsmetode, antall identifiserte plankton, prøvetetthet, og tidsbruk ble vektlagt. Det ble utført forsøk for å avklare hvilken hastighet som var best til telling av flest antall dyreplankton per minutt. En stoppeklokke ble benyttet til å ta tiden av hvert enkelt trinn i prosessen. Ferske planktonprøver ble innsamlet ved bruk av horisontal- og vertikal innsamlingsmetode. Prøvene ble fiksert og filtrert til å omfatte et størrelsessjikt på 180-500µm og fortynnet ut i 20 ml eksemplarer. Prøvene ble pumpet gjennom flow-systemet. Organismene ble observert på skjerm i sanntid, og telt ved bruk av en håndteller. Videre ble planktonprøve på 500 ml pumpet gjennom flow-systemet. Hensikten var å undersøke om GHL Doser 2 pumpet stabilt over tid. Overordnet for prosessen var å få innsikt i tidsbruken og kompetansen/presisjonen som trengs til telling og identifisering av dyreplankton i ferske prøver.

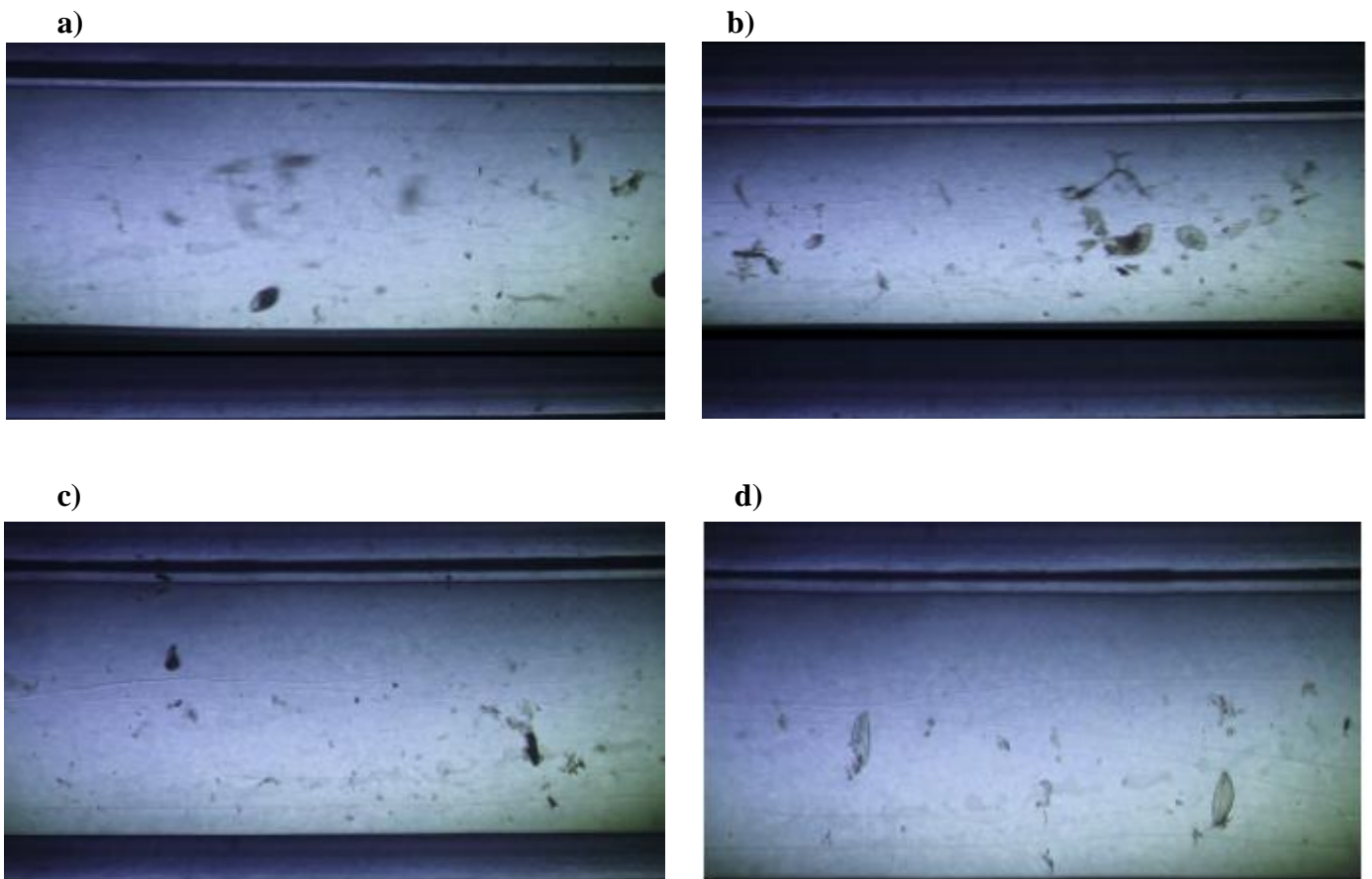


Figur 13. Et flowchart som viser en oversikt over metodikken benyttet ved bruk av flow-systemet. Flowchartet tok for seg prosedyren fra innsamling og behandling av planktonprøver, til ferdige videoer.

3.0 Resultater

3.1 Hastighet og bildekvalitet

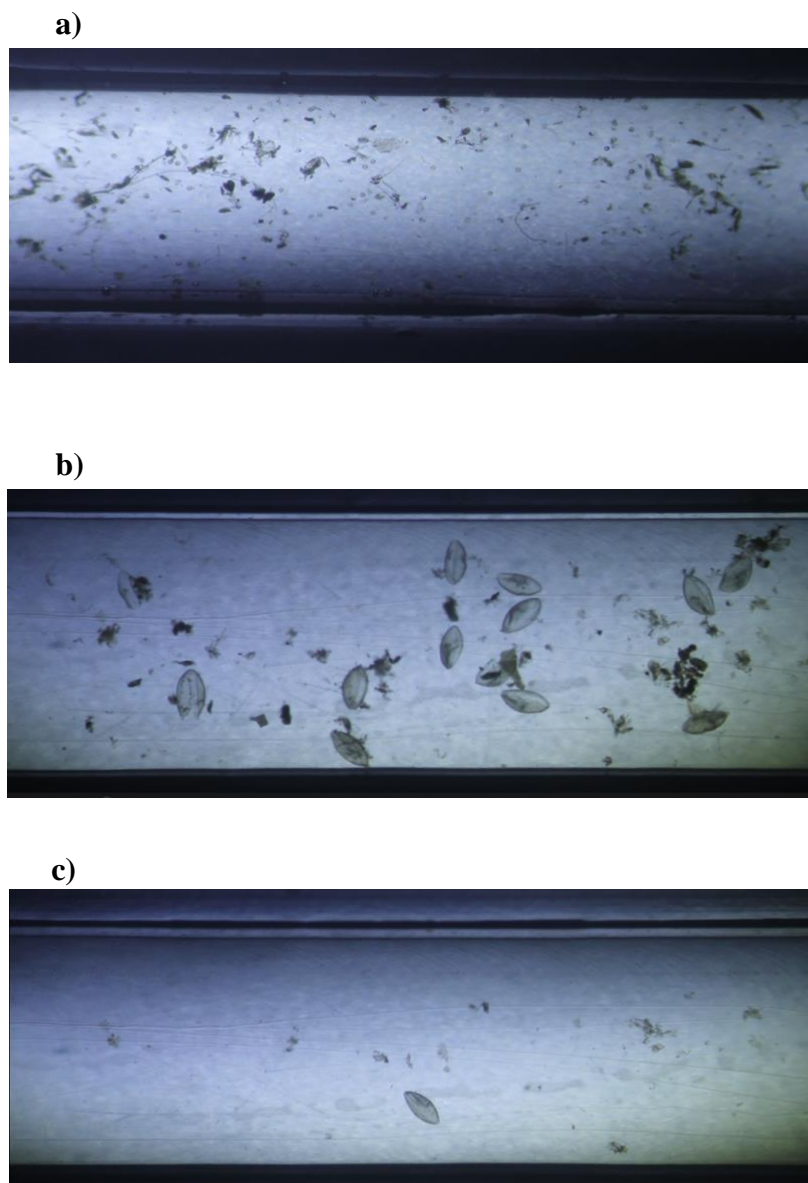
En pumpehastighet på 28 ml/min pumpet prøvematerialet for raskt. Hastigheten førte til redusert bildekvalitet og det var ikke mulig å fokusere på enkeltobjekter fra prøven. Det samme gjaldt med en hastighet på 16 ml/min. Med en hastighet på 9 ml/min ble bildekvaliteten bedre, og enkeltobjekter kunne identifiseres med relativt lav feilmargin. Hastighet på 5 ml/min resulterte i best bildekvalitet, og lengre observasjonstid. Dette førte til at enkeltobjektene kunne identifiseres før de forsvant ut av bildet.



Figur 14. *a) Pumpehastighet på 28 ml/min. b) Pumpehastighet på 16 ml/min. c) Pumpehastighet på 9 ml/min. d) Pumpehastighet på 5 ml/min.*

3.2 Prøvetetthet i planktonprøver

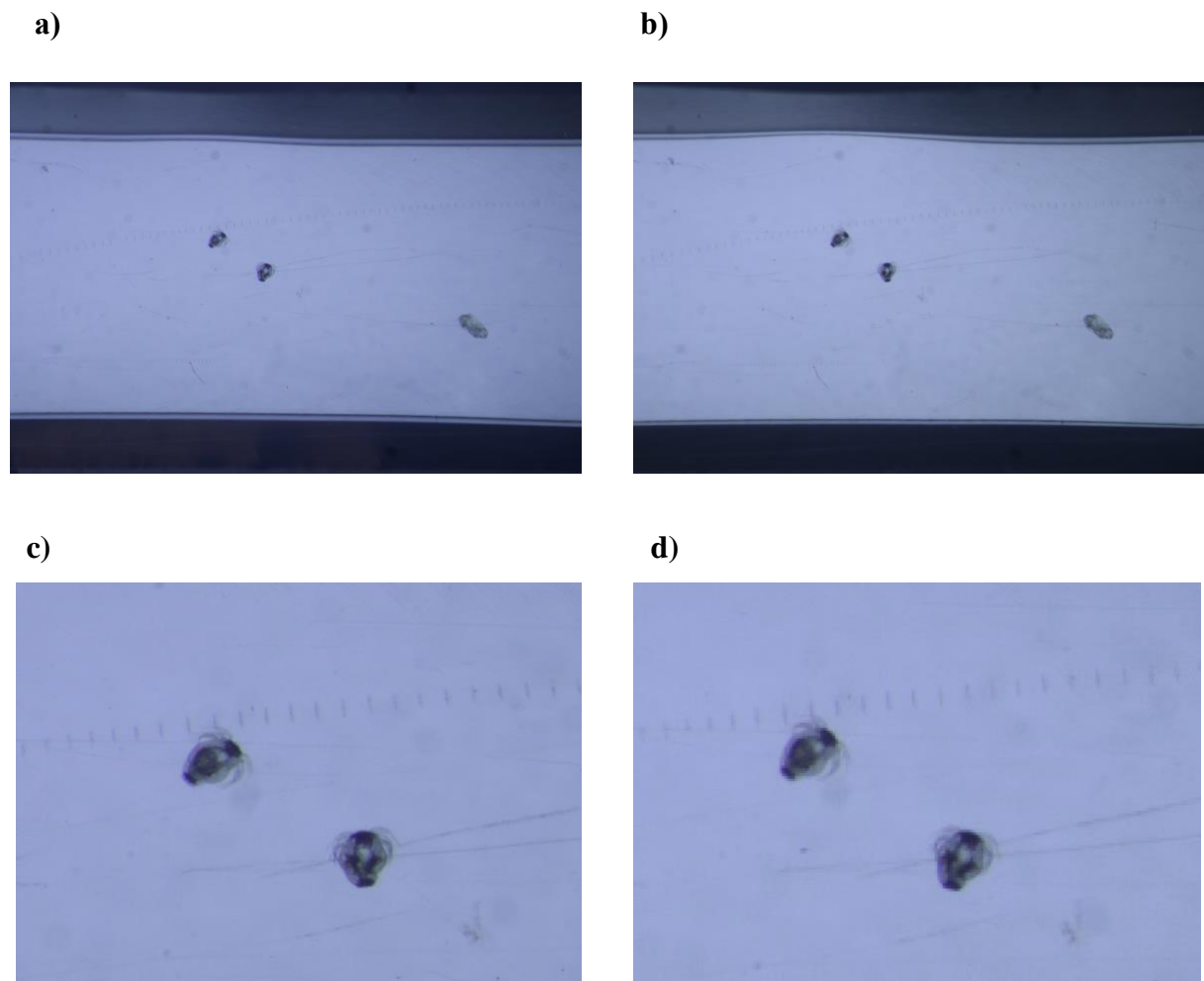
Bilde **a)** viser planktonprøve med høy tetthet. Mengden plankton i bildet gjorde det utfordrende å identifisere og skille organismer fra hverandre. Tettheten førte til at organismer bandt seg fast i hverandre. Store ansamlinger av plankton i kammerets inn- og utløp, førte til pulserende gjennomstrømning av vann. Bilde **b)** viser planktonprøve med moderat tetthet. Organismene var mulig å identifisere og skille fra hverandre. Færre organismer bandt seg sammen og den pulserende effekten ble redusert. Bilde **c)** viser en planktonprøve med lav tetthet. Lav tetthet forhindret organismene i å binde seg sammen, og organismene ble enklere å identifisere.



Figur 15. Prøvetetthet i planktonprøver $<500 \mu\text{m}$. **a)** planktonprøve med høy tetthet. **b)** planktonprøve med moderat tetthet. **c)** planktonprøve med lav tetthet

3.3 Kamerainnstillinger

Resultatene fra kamerainnstillingene viser forskjell i kvalitet ved billedtakning med ulike oppløsninger. Under presenteres to bilder tatt med kameraets høyeste oppløsning (Figur 16 a) og kameraets laveste oppløsning (Figur 16 b). Endringene i kvalitet tydeliggjøres når bildene forstørres, og man sammenligner antall piksler (Figur 16 c) og (Figur 16 d). Ved videotakning var kvalitetsforskjellene tydeligere. Kameraet var ikke stand til å filme med RAW-innstilling, noe som førte til redusert bildekvalitet sammenlignet med fotografering. Innstillingen «L24 M 6000 x 4000» gav best kvalitet til filming av organismer i bevegelse.



Figur 16. *Bildekvalitet ved kameraets ulike innstillinger. Bildene viser nauplier i 9x forstørrelse med hvit matt bakgrunn og lyskilde under objektbordet.*

a) *Kamerainnstilling RAW 24M 6000X4000 + L 24M 6000X4000*

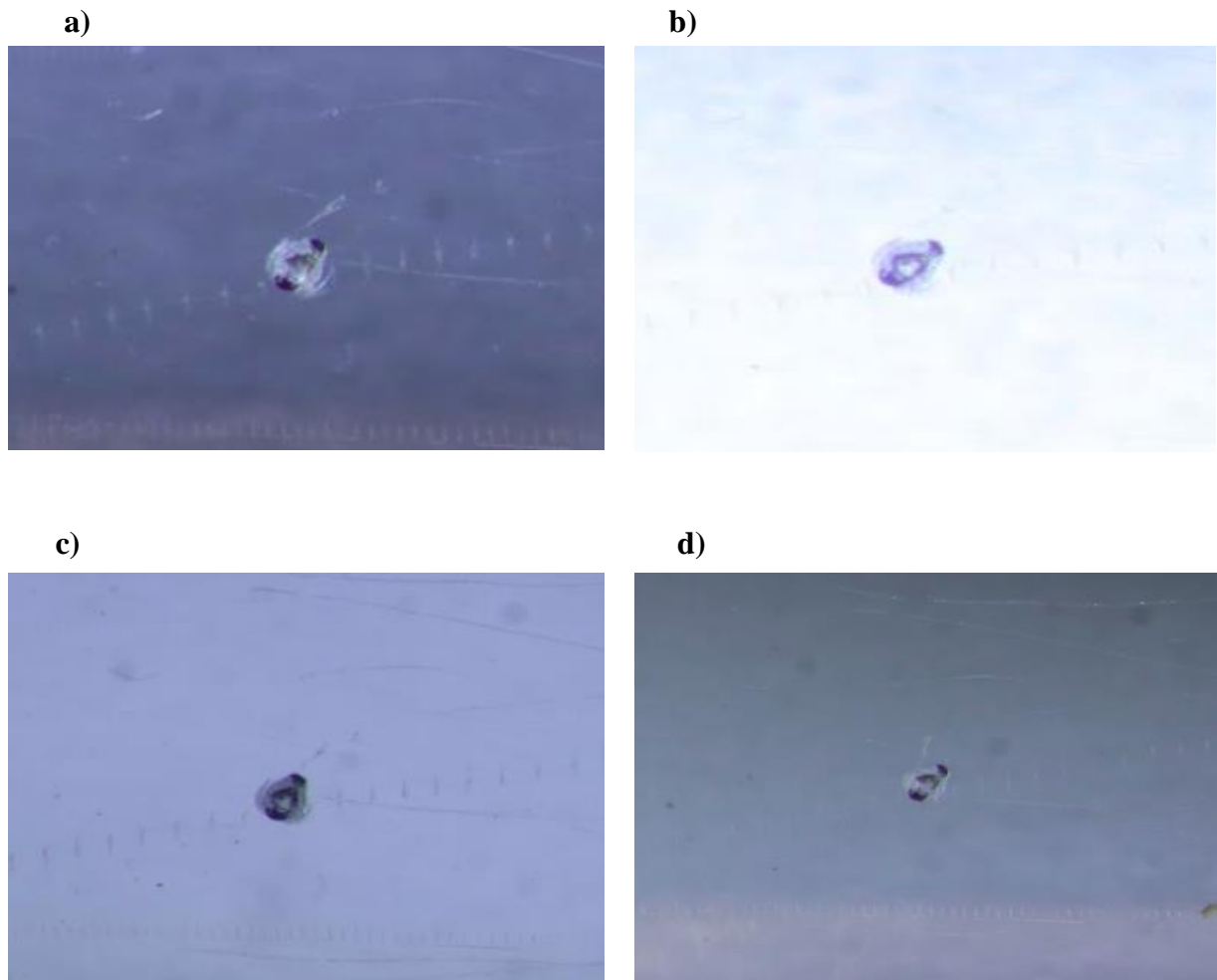
b) *Kamerainnstilling RAW 24M 6000X4000 + S3 0.3M 720X480*

c) *Kamerainnstilling RAW 24M 6000X4000 + L 24M 6000X4000 (forstørret bilde)*

d) *Kamerainnstilling RAW 24M 6000X4000 + S3 0.3M 720X480 (forstørret bilde)*

3.4 Ulike lyskilder

Bilde **a)** viser bilde av en naupliuslarve med matt bakgrunn, i 9x forstørrelse og med lyskilde ovenfra. Ved bruk av lyskilde ovenfra kunne larven enkelt identifiseres. Bilde **b)** viser bilde av en naupliuslarve i 9x forstørrelse, med reflekterende bakgrunn og lyskilde ovenfra. Ved bruk av denne kombinasjonen var det for mye lystilførsel, og bildene ble utydelige. Bilde **c)** viser bilde av en naupliuslarve med matt bakgrunn, 9x forstørrelse og lyskilde under objektbordet. Lyskilde under objektbordet fremhevet silhuetten, og larvens struktur var lett gjenkjennelig. Bilde **d)** viser bilde av en naupliuslarve med reflekterende bakgrunn, i 9x forstørrelse og med lys under objektbordet. Dette resulterte i at farger ble fremhevet, men bildekvaliteten ble redusert.



Figur 17. Lakseluslarve i 9x forstørrelse. Bilde av Nauplius I tatt med lyskilde ovenfra med matt bakgrunn (a) og reflekterende bakgrunn (b). Bilde av Nauplius I tatt med lyskilde under objektbordet med matt bakgrunn (c) og reflekterende bakgrunn (d).

3.5 Planktoninnsamling og testing av flow-system

Resultatene knyttet til innsamling og testing av flowsystemet tar for seg innsamling av plankton utført ved Sandvika den 24.04.23. Antall dyreplankton estimeres til å være høyere enn ved tidligere innsamlinger. Filtrert mengde sjøvann viste til å være forholdsvis likt ved begge innsamlingsmetodene. 8 vertikale trålinger i et dybdeintervall på 0-15 meter, filtrerte 24 120 liter sjøvann. Horisontal gjennomstrømming med strømhastighet på 0,1 m/s på 2 meters dybde, i en periode på 20 minutter, filtrerte 23 550 liter sjøvann. Metodene viste til et tidsbruk på 9 minutter og 30 sekunder ved 8 vertikale trålinger, og 24 minutter ved horisontal innsamling. Med antatt strøm- og trekkhastighet ved vertikale trålinger, viser resultatene til at vertikal innsamling er en mer effektiv metode. Vertikal innsamling viste til en høyere tetthet i innsamlet prøvemateriale.

Tabell 1. Nøkkelverdier ved innsamling av plankton. Tallene representerer tidsbruk ved de to ulike innsamlingsmetodene, prøvetetthet etter innsamling, og et anslag over antall kubikk filtrert.

Planktoninnsamling			
Metode	Estimert kubikk filtrert	Tidsbruk	Mengde dyreplankton
Vertikal innsamling (8 trål) ⁱ	24,12 m ³	9 min 30 sek	Høy
Horisontal innsamling (0,1 m/s) ⁱⁱ	23,55 m ³	24 min	Moderat

3.5.1 Observerte dyreplankton

I prøvematerialet fra vertikal innsamling, ble det telt 83 dyreplankton. I prøvematerialet fra horisontal innsamling ble det telt 31 dyreplankton. Prøvene hadde lik fortynningsgrad, men ulik tetthet (Tabell 1).

Tabell 2. Tallene viser antallet identifiserbare dyreplankton som ble telt i prøvene fra vertikal og horisontal innsamling..

Observerte dyreplankton			
Metode	Tetthet	Mikrometer	Antall
Vertikal innsamling	20 ml prøve (1/19)	180 - 500 my	83 x 10 ³ ⁱⁱⁱ
Horisontal innsamling	20 ml prøve (1/19)	180 - 500 my	31 x 10 ³

¹ Anslag over filtrerte liter ved utgangspunkt i planktonhåvens spesifikasjoner (dybdeintervall 15-0 meter)

² Anslag over strømhastigheten ved horisontal innsamling (0,1/ms)

³ Ganges i 10³ for å få et estimat over totalt antall plankton i prøven

3.5.2 Tidsbruk og observerte dyreplankton ved ulike hastigheter

Med en pumpehastighet på 5 ml/min gjennom observasjonskammeret, ble det observert 20 dyreplankton per minutt, og 83 dyreplankton i hele prøven. Med en hastighet på 9 ml/min ble det observert 25 dyreplankton per minutt, og 61 dyreplankton i hele prøven. Høyere hastigheter førte til færre identifiserbare dyreplankton. Med en hastighet på 28 ml/min ble det ikke mulig å gjenkjenne eller identifisere organismer.

Tabell 3. Tallene representerer antallet identifiserbare dyreplankton i prøven fra vertikal innsamling, observert per minutt ved ulik hastighet.

Observerte dyreplankton per minutt (Vertikal innsamlingsmetode, 20 ml prøve)			
Pumpehastighet	Tidsbruk (minutter)	Antall identifiserbare dyreplankton	Antall dyr per minutt
5 ml/min	4 min 9 sek	83	20
9 ml/min	2 min 23 sek	61	25
16 ml/min	1 min 17 sek	12	9
28 ml/min	46 sek	0	0

3.5.3 Tidsbruk ved bruk av flow-systemet

Tidsbruk ved flow-systemet viste til 4 minutter og 9 sekunder ved gjennomkjøring av en 20ml prøve, med en hastighet på 5 ml/min (Tabell 4). Gjennomkjøring av 500 ml prøve med lik hastighet viste til et tidsbruk på 1 time og 43 minutter. Behandling av planktonprøve viste til et tidsbruk på 15 minutter og 19 sekunder.

Tabell 4. Nøkkelverdier ved bruk av flow-systemet. Tabellen viser oversikten over tidsbruk ved filtrering og fiksering, - gjennomkjøring av prøvemateriale, og rengjøring av utstyr.

Tidsbruk ved flow-systemet		
Metode	Tidsbruk	Tidsbruk rengjøring
Filtrering og fiksering av prøver (180-500um)	15 min og 19 sek	1 min
Gjennomkjøring av 20 ml prøve	4 min og 9 sek	1 min
Gjennomkjøring av 500 ml prøve	1 time og 43 min	1 min

4.0 Diskusjon

4.1 Innsamling og behandling av planktonprøver

Prøvetakningen benyttet i denne oppgaven var ved bruk av planktonhåv. For å få et anslag over mengde filtrert sjøvann med horisontal innsamlingsmetode, må det tas utgangspunkt i strømhastighet. Strømhastighet kan variere i det gitte tidsintervallet håven ligger i sjøen, og beregningene påvirkes av uforutsigbare variabler som endringer i sjø eller værforhold (De Bernardi, 1984). Anslaget blir ytterligere påvirket av ansamlinger av plankton som tetter håven (Smith et al., 1968). Vertikale trålinger er i mindre grad påvirket av uforutsigbare variabler. Vertikale trål er ikke avhengig av jevn strømhastighet for å oppnå et mer nøyaktig anslag over filtrert mengde sjøvann. Likevel, vil håvens utforming skyve vann og plankton til sides på vei til overflaten, og påvirke estimatet. Antallet uforutsigbare variable kan reduseres ved å benytte et digital flow meter³. Vertikale trålinger viser til høyere prøvetetthet og kortere tidsbruk ved innsamling av plankton. I prøvematerialet ble det observert de hyppigste organismene av dyreplankton som opptrer i epipelagisk sone. Ved utvikling av et videosystem er det ønskelig å bruke prøvemateriale med stor variasjon både i- og mellom arter, for å kunne sammenligne anatomiske forskjeller (Schmid et al., 2016). Variasjoner i anatomiske forskjeller i- og mellom arter kan benyttes av en AI-programvare til treningsdata og valideringsdata. Eksempelvis har både *Nauplius I* og *Nauplius II* forholdsvis lik anatomisk oppbygging. *Nauplius II* har derimot flere antenner og det vil være vesentlig for AI-programvare å kunne skille mellom små, men betydelige detaljer.

Til videreutvikling av flow-systemet vil det være fordelaktig å automatisere innsamlingsprosessen. Omfattende forskning krever større mengder prøvemateriale, hvor de overnevnte metodene antageligvis vil fremstå som ineffektive. Ved automatisk pumping og innsamling av prøvemateriale vil uforutsigbare variabler og tidsbruk reduseres. Bruken av planktonpumpe støtter ideen om et fastmontert system eller oppsett, hvor ferske planktonprøver kan pumpes direkte fra sjø og til flow-systemet. En ekstern planktonpumpe må imidlertid ta høyde for organismer som kan påvirke innsamlingsprosessen. Gelèplankton er gelatinøse organismer som kan opptre i store ansamlinger (Lucas et al., 2014). Gelèplanktons anatomiske oppbygning kan føre til at store ansamlinger vil tette pumpens filter. For å forhindre dette bør det inkluderes et ekstra filter ved bruk av en ekstern Pumpe.

³ Utstyr som benyttes for å gi et mer nøyaktig estimat over antall kubikk filtrert ved bruk av planktonhåv.

4.1.1 Filtrering og tetthet av prøvemateriale

Ved filtrering av prøvemateriale er det ønskelig å oppnå et representativt utvalg dyreplankton⁴ som befinner seg i det samme størrelsessjiktet som lakselusens planktoniske og infeksjose stadier (nauplius, copepoditt). Lakselusens planktoniske utviklingsstadier varierer i størrelser mellom 200 til 600 µm (Schram, 2004). For å oppnå ønsket tetthet i prøvemateriale ble planktonet fortynnet til en tetthet som ga oversiktlige bilder sammen med et representativt utvalg plankton. Analysing av resultatene viste til at en moderat prøvetetthet ga gode bilder. Organismene kunne enkelt identifiseres samtidig som det viste til et representativt utvalg. En jevnere tetthet i prøvematerialet sørget for at ingen partikler og organismer ble hengende igjen kammerets bunn og vegger. Prøvematerialet opprettholdt en jevn hastighet gjennom flow-systemet. Tetthetsgraden i planktonprøven må sees i sammenheng med prøvens tetthet ved innsamling. Dyreplankton utfører vertikalvandring fra øvre vannlag om dagen, til dypere vannlag på natten (Bruus Pedersen, 2015). Tetthet ved innsamling vil dermed variere etter når på døgnet det tas planktonprøver, med mindre vertikale planktontrålinger utføres dypt nok til å omfatte dyrene som utfører vertikalvandring.

4.2 Dyrking av lakseluslarver

Lakselusens utviklingsstadier er sensitiv til endringer i både temperatur og salinitet (Johannessen, 1975). Ved første dyrking døde kjønnsmoden lus av forhøyet saltholdighet, som følge av utilstrekkelig oppfølging. Klekking fant likevel sted før salinitetsnivået tok livet av larvene. Klekking av luselarver ble forbedret etter at dyrking ble flyttet til Atlanterhavsparken. Ved dyrking på 15°C, klekket larvene seks dager etter mottaket av eggstrenger. Imidlertid utgjorde bruken av levende eller døde luselarver ikke vesentlig forskjell ved utvikling av flow-systemet. Det ble i hovedsak benyttet nauplier til å bestemme gunstige lyskilder og bildekvalitet. I tilfellene hvor det ble benyttet levende lus, så man lite/ingen tegn til bevegelser i prøvene. De små bevegelsene som oppstod, var i form av rykninger av naupliers antenner. Bilde og videokvaliteten av eksemplarene forble den samme, uavhengig av luselarvenes tilstand.

⁴ Representativt utvalg dyreplankton: Et dekkende bilde over utvalget av dyre- og gelèplankton observert i prøvematerialet. Sammensetningen av ulike arter og deres anatomiske forskjeller ble benyttet til sammenligninger og vurderinger av hensiktsmessige lys, lupe og kamerainnstillinger.

Ulik atferd hos lakseluslarver har blitt observert i laboratorie-eksperimenter, hvor copepoditt-stadiet viser til mer aktiv atferd enn nauplius-stadiet (Sandvik et al., 2016). Nauplier og copepoditter viser til endringer i atferd hvis utsatt for abiotiske faktorer som lys og strømhastighet (Boxshall & Defaye, 1993). Hvis utsatt for høy lysintensitet, svømte copepoditter direkte mot lyskilden uten tegn til laterale bevegelser. Ved lav lysintensitet beveget copepoditter seg mot lyskilden i et intervallpreget svømmemønster. Svømmingen ble mindre direkte og omfattet flere laterale bevegelser (Boxshall & Defaye, 1993).

Til videreutvikling og bruk av AI-programvare, vil det forholdsvis være ønskelig med levende eller nylig-døde eksemplarer av nauplier og copepoditter. Flow-systemet som denne oppgaven presenterer benytter seg av både strømhastighet og lyskilder. Lyskilder med høy lysstyrke kan påvirke larvens atferd i flow-systemet. Hyppige og aktive bevegelser kan bli en utfordring for et AI-system. Treningsdata i form av bevegelige organismer vil være avgjørende til utforming av et fungerende flow-system. I et teoretisk oppsett hvor ferske planktonprøver pumpes inn i flowsystemet, vil det være vesentlig at AI klarer å skille mellom ulike typer levende organismer. Videre må AI-systemet være i stand til å tolke bevegelser for å ikke registrere falske positive/negative.

4.3 Lyskilder og kamerainnstillinger

Tilsvarende til innstillingene benyttet til pumpen, ble kamera- og lupe innstillingene valgt på bakgrunn av de grunnleggende kravene til bildegjenkjenning (Cheng et al., 2019).

Innstillingene tok i hovedsak for seg oppløsningsgrad og lukketid. Lukketid på kamera beskriver hvor lenge kameraets sensor er åpen for lys. Lang lukketid resulterer i mer lys som slippes inn i linsen. Kort lukketid fryser bevegelse, mens lang lukketid fanger bevegelsen til objektet som fotograferes (Scandinavian Photo, 2019).

Resultatene fra forsøket av kameraets ulike innstillinger viser til endringer i bildekvalitet ved fotografering. Endringer i kvalitet ble tydeliggjort ved å forstørre bildene i ettertid. En mulig årsak til at endringene i kvalitet ikke sees i det originale bildet, er at innstillingene for ISO, lukketid og exposure comp/AEB var det samme på alle forsøkene. En ytterligere årsak kan være at luselarvene okkuperer en liten del av det fullstendige motivet, og at de ikke kreves høy bildeoppløsning for å se detaljer i bildet. I 9x forstørrelse kunne alle organismene

observeres innenfor kameraets observasjonsareal. Ved økt forstørrelse risikerer man at interesseobjekt flyter gjennom observasjonskammeret utenfor kameraets synsvinkel, og kan dermed ikke identifiseres. Ved bruk av en smalere kanal i observasjonskammeret, kan imidlertid forstørrelsen økes, uten at organismene forsvinner fra kameraets observasjonsområde. En fordel med fotografering er at bildene fanger opp detaljer som gjør det lettere å identifisere organismer i prøvene. Imidlertid har fotografering en begrensning, ettersom det baserer seg på stasjonære objekter. Dersom deler av interesseobjektet ligger utenfor kameraets synsvinkel, eller flere objekter overlapper hverandre, kan detaljer bli skjult. Dette kan føre til utfordringer i henhold til gjenkjenning og identifisering av objektet. En annen svakhet med gjenkjenning med bruk av bilder, er at samme interesseobjekt kan bli fotografert flere ganger.

Kameraoppløsning viste seg til å ha en betydelig påvirkning på bildekvaliteten ved opptak av video, sammenlignet med fotografering. Ved å analysere resultatene fra filming av prøvemateriale med de ulike oppløsningene, ble det observert endringer i kvalitet. Filming med høy oppløsning ga muligheten for å fryse video og forstørre enkeltobjekter, uten at bildekvaliteten ble redusert. Ved forstørring av enkeltobjekt på de lavere oppløsningene ble bildene kornete og gjorde det utfordrende å gjenkjenne anatomiske forskjeller i planktonet. Innstillingen *L 24M 6000 x 4000* ga video med best kvalitet. Imidlertid krever filming i høy oppløsning mer lagringsplass. Et videoeksemplar med varighet på 4 minutter og 40 sekunder med kameraets høyeste oppløsning, krever minnelagringsplass på 1061 MB. Et videoeksemplar med kameraets laveste oppløsning og lik varighet, krevde derimot 647 MB lagringsplass. Fordelen ved bruk av video er at objektene er i konstant bevegelse, noe som gjør det mulig å følge hvert enkelt interesseobjekt. Ved en konstant observasjon av objektet unngår man at samme objekt blir identifisert flere ganger. Opptak av video med 50 bilder per sekund (FPS) viste til god bildekvalitet, mindre hakking, og en jevnere flyt i videoen. Med en pumpehastighet på 5 ml/min tar det ca. ett sekund fra et enkeltobjekt blir fanget innenfor synsvinkelen til kameraet, før det forsvinner. Videoopptak på 50 FPS vil resultere i 50 bilder av interesseobjektet. Dette er en av grunnene for at treningsdata i form av video er mer hensiktsmessig å bruke fremfor bilder, ved utvikling av AI-programvare (Colin et al., 2017).

4.3.1 Lyskilder

Resultatene viser til en kombinasjon mellom den matt hvite siden av vendespeilet og en lyskilde i bunnen av objektbordet ga bilder av best kvalitet. Detaljer ble fremhevet og silhuettene til organismene ble synliggjort, noe som gjorde det mulig å gjenkjenne strukturen til organismene. Utfordringen med en lyskilde i bunn er at det kan oppstå skyggedannelse over organismene, noe som kan føre til usikkerhet rundt identifisering (Huang et al., 2014). Bruk av den reflekterende overflaten i vendespeilet ga et mer naturlig bilde av interesseobjektene. Lyset reflekterte opp mot organismene og ga en tydelig visualisering av dets mørke og transparente deler. En ulempe med vendespeilets reflekterende side, er at det ikke fremviste antennene til naupliene. Lyskilde over objektbordet ga bilder med store kontraster mellom naupliens mørke og lyse sider. Naupliens struktur ble tydelig fremstilt. Imidlertid ble bildene for lys, noe som fører til at detaljer kan bli oversett.

Det ble ikke benyttet andre lyskilder enn en LED-lykt. Lykten var ikke utstyrt med en lysjusteringsfunksjon. Dette førte til forholdsvis svak belysning. Ved bruk av flere eller sterkere lyskilder vil man kunne redusere lukketiden. Lang lukketid fører til at bevegelige objekter fremstår skurrete (Mansurov, 2022). Flow-systemet baserer seg på objekter i bevegelse, og kort lukketid fører til klarere bilder av organismer i bevegelse. Ved for kort lukketid, vil imidlertid kameraet ha problemer med å slippe inn tilstrekkelig mengde lys. Dette vil resultere i mørke og undereksponerte bilder/videoer. For å oppnå god bildekvalitet, må man finne riktig balanse mellom lukketid og lys. Til videreutvikling bør flere belysninger utprøves. Ved testing av flere belysninger får man muligheten til å utforme flere datasett til maskinlæring. AI-programvare kan bruke datasettene til opplæring av modeller til gjenkjenning av lakseluslarver. Dette vil igjen føre til at programvaren får et bedre utgangspunkt.

4.4 Pumpehastighet

CNN bildegjenkjenningssystemet presentert i rapporten Cheng et al., (2019), bruker AI til å gjenkjenne objektets silhuett i bilder. Kravene til programvarens ytelse er lokale reseptive felt, delt vekt og skjevheter, aktivering og sammenslåing (Cheng et al., 2019). Programvarens krav er gjennomgående i flere AI systemer, og poengterer viktigheten av å fremstille bilder

med høy gjenkjenningsgrad. I planktonprøver med høy tetthet er det utfordrende å skille ulike organismer fra hverandre. Hastigheten prøven passerer kamera på, må vurderes opp mot bildekvaliteten. Med hastighet 28 ml/min ble planktonprøven effektivt pumpet ut, men bildekvaliteten var for utydelig til å kunne identifisere organismene. Med hastighet 16 ml/min ble bildekvaliteten bedre, men fremdeles for uklart til å kunne skille organismene fra hverandre. Med hastighet 9 ml/min var bildekvaliteten bedre, og enkeltobjekter kunne observeres. Feilmarginen økte ettersom det ikke var tilstrekkelig tid til å identifisere organismene før de forsvant ut av bildet. Dette gjenspeiles i resultatene, hvor antall identifiserte dyreplankton reduseres ved økt hastighet. Med hastighet 5 ml/min kunne flere organismer identifiseres. Tidsbruken ved hastighet 5/ml min var lengre enn de øvrige hastighetene. Likevel, var det denne hastigheten som ga best estimat over antall dyreplankton i prøven.

4.5 Tidsbruk ved flow-systemet

I nordiske havområder varierer planktonforekomst med sesong. Dette skyldes sesongbaserte variasjoner i temperatur, sollys, vind og havstrømmer. Ved våroppblomstring, kan antallet planktonalger nå flere millioner per liter sjøvann (Naustvoll & Kleiven, 2022). Grunnen for dette er økning i lys og temperatur, samtidig som at smeltevann fra land bidrar til å stabilisere den vertikale sirkulasjonen. Dette fører til at planktonalgene holder seg i den eufotiske sonen, og kan dermed gjennomføre fotosyntese og formere seg (Naustvoll & Kleiven, 2022). Kutti et al (2019) registrerte variasjonen av forekomst av plankton fra mars til september. Resultatene viser at perioden juni hadde høyest gjennomsnittlig antall plankton med 1.15 mg m^{-3} . Mars hadde lavest forekomst av plankton med 0.1 mg m^{-3} (Kutti et al., 2021). Det ble registrert 1.7 mg m^{-3} dyreplankton per liter⁻¹ vann i juni, og 0.2 mg m^{-3} dyreplankton per liter vann⁻¹ i mars (Kutti et al., 2021). Livssyklus og oppblomstringer av plankton tilsier at tidsbruken tilknyttet til innsamling av plankton vil variere med årstidene. Med utgangspunkt i studiet kan man anta at tidsbruken ved gjennomkjøring av flow-systemet, øker om lag åtte ganger fra mars til juni. Økningen skyldes av at tettheten i prøvene ikke kan være større enn hva et AI-program klarer å differensiere. Dette tilsier at det bør tilsettes åtte ganger mer fortykning i prøvene hentet i juni, enn prøvene hentet i mars for å opprettholde lik tetthet i

⁵ mg m^{-3} = milligram per kubikkmeter

prøvematerialet. Resultatene viser til at det tok 1 time og 43 minutter fra behandling av 500 ml planktonprøve til ferdigstilt video. Tar man utgangspunkt i at det er om lag åtte ganger mer plankton i havet i juni enn i mars, kan det antas at en fullstendig gjennomkjøring av en planktonprøve med lik tetthet vil ta 12 minutt og 36 sekunder i mars. Fortynning vil måtte reguleres etter behov. Ved bruk av en pumpe som kan regulere mengden vann og plankton som pumpes inn i flow-systemet, vil tettheten automatisk reguleres.

Formålet med oppgaven sikter til å forenkle og effektivisere registreringsprosessen av organismer i planktonprøver. Dette kan diskuteres opp mot tiden pumpen bruker på å pumpe gjennom en bestemt mengde plankton på de ulike hastighetene. Hastighet og antall dyreplankton per minutt/sekund, vil fungere som inngangsverdi for AI-systemer.

Resultatene viser til at 25 dyreplankton i minuttet pumpes gjennom flow-systemet med en hastighet på 9/ml i minuttet. I et ferdig system er dette tallet for lavt til å kunne gi nøyaktig data rundt påslaget av ulike dyreplankton og lakseluslarver i et gitt område. Tidsbruken ville også vært for høy til at systemet kan regnes som effektiv. Et AI-system vil være i stand til å telle flere organismer i minuttet/sekundet, enn hva et menneske er i stand til (González et al., 2019). Videre må prøvetetthet reguleres etter AI-systemets preferanser. Høyere prøvetetthet fører til at flere dyr passerer gjennom flow-systemet i minuttet. Pumpehastigheten vil også kunne reguleres. De øvrige hastighetene (>9 ml/min) gjorde det utfordrende å identifisere organismene. Dette er imidlertid en menneskelig begrensning som et AI-system vil kunne overkomme. Med et utgangspunkt om 0-5 copepoditter per m² kreves det filtrering av store mengder sjøvann (Bui et al., 2021). Et dekkende bilde over anslaget av lakseluslarver i et gitt område, burde dermed omfatte planktonprøver på minimum 10 m³. Tidsbruken kan knyttes opp mot antall plankton som pumpes gjennom flow-systemet per minutt. Et estimat over ønsket antall dyreplankton i minuttet i et ferdig flow-system, vil være om lag 3000 dyr i minuttet, eller 50 dyr i sekundet. Et mer nøyaktig estimat kan oppnås gjennom regulering av pumpehastighet, prøvetetthet eller en kombinasjon av begge. Dette krever imidlertid en pumpe med høy nok kapasitet til å levere nok plankton, og et AI-system som kan registrere minst 50 dyr i sekundet.

4.6 Utvikling av observasjonskammer

Observasjonskammeret som skissen illustrerer, var ikke tilstrekkelig. Prøvemateriale med stor tetthet samlet seg i kammerets utløp. Oppsamlingen førte til at pumpens tilførsel av vann ble ujevn. Videre dannet det seg store ansamlinger av prøvemateriale ved kammerets innløp.

Utløpet i enden av observasjonskammeret måtte dermed utvides. Peristaltiske pumper (GHL Doser-2) leverer pulserende strøm. Ved å skape et større utløp i enden av kammeret, ble den pulserende effekten redusert. Videre, ble pumpeslangen som tilfører prøvemateriale gjennom kammeret, tettet igjen ved bruk av lim. Dette skapte et vakuum fra pumpeslangen og til kammeret, noe som forhindret oppsamlingen av plankton ved innløpet.

Observasjonskammerets dybde førte til at organismer som lå på bunnen av vannsøylen, ble mindre skarp enn organismer som befant seg på toppen av vannsøylen. Organismer som havner nederst i vannsøylen vil bli vanskeligere for et AI-program å identifisere. I prøvemateriale med lav tetthet, var imidlertid antallet organismer som befant seg i nederste lag i vannsøylen, forholdsvis lav. Det samme gjaldt for organismer som overlappet eller bindet seg fast i hverandre. Ved høyere prøvetetthet, vil imidlertid sannsynligheten for sammenbinding og overlapping av organismer øke. I et ferdig system hvor AI benyttes, er observasjonskammerets dybde en ulempe som må utbedres. Til utbedring av observasjonskammeret kan det oppnås mindre blenderåpning ved bruk av flere eksterne lyskilder. Mindre blenderåpning vil føre til mer dybdeskarphet, og dermed vil man kunne benytte et dypere kammer og fortsatt få alle organismene i fokus-sjiktet til kameraet.

Kamerainnstillinger, lyssetting og utforming av observasjonskammeret må sees i sammenheng og de ulike komponentene er gjensidig avhengig av hverandre for å skape gode bilder.

4.7 Oversikt over fordeler og ulemper ved utvikling av flow-systemet

Tabell 4. Skjematisk fremstilling av fordeler og ulemper forbundet med metodene benyttet til utvikling av flow-systemet.

Metode	Fordeler	Ulemper
Horisontal- og vertikal innsamling av planktonprøver	Planktonhåven er brukervennlig. Innsamlet prøvemateriale kan filtreres umiddelbart. Gir representativt utvalg av dyreplankton i området. Kan modifiseres etter behov. Kan tråles fra båt for å redusere abiotiske påvirkninger og uforutsigbare variabler	Utsatt for abiotiske faktorer og uforutsigbare variabler. Krever fordelaktige strømforhold for å oppnå ønsket volum filtrert av håven. Tidkrevende prosess. Utfordrende å gi anslag på antall liter som er filtrert. Ved vertikal tråling med håv "skyves" vann til sides.
GHL Doser 2 Pumpesystem	Intuitivt oppsett med detaljert programvare. Leverer nøyaktige prøver. Enkel å transportere.	Leverer prøvene pulserende, som fører til at video kan oppfattes som hakkende. Krever ekstern PC for å kjøre programvare. Ikke beregnet for store volum. Pumpehastighet kan ikke levere hastighet utenom dens gitte innstillinger.
Lupe- og kamerasystem	Leverer skarpe bilder. Silhuetter fremheves. Gode muligheter for opptrening av AI-programvare. Intuitive løsninger, som er lett anvendelig.	Utfordrende å tilpasse innstillinger til ulike dybder i observasjonskammeret. Fullstendig oppsett opptar mye plass og kan være vanskelig å transportere. Begrenset levetid på batteriet. Videofiler opptar stor lagringsplass.
Observasjonskammer	Prøvematerialet sitter seg ikke fast i kammeret. Lett å transportere, og modifisere. Lys slippes gjennom og blir ikke fordreid av kammerets ulike dybder og vinkler. Kammerets utforming presenterer et representativt utvalg plankton innenfor kameraets observasjonsareal.	Observasjonskammerets dybde fører til at vannsøylen ikke er jevnt fordelt, noe som påvirker fokusområdet til kameraet. Krever et jevnt underlag.

4.8 Videreutvikling av flow-systemet

Til videreutvikling bør elementer ved flow-systemet utbedres. Ved innsamling av plankton bør planktonhåv erstattes med en planktonpumpe. Pumping gir et bedre estimat på antall liter vann som blir filtrert. Videre tilrettelegger det for et automatisert flow-system hvor ferske planktonprøver kan pumpes direkte fra sjøen. Kameraet som ble benyttet gjennom bacheloroppgaven hadde en batterilevetid på om lag 60 minutter ved aktiv filming, noe som ikke vil være tilstrekkelig ved omfattende prøvetagning. Det oppfordres til bruk av ekstern strømtilførsel. Observasjonskammerets dybde fører til at kameraets fokusområde skifter mellom objekter fra topp til bunn. I et ferdig flow-system bør det benyttes et jevnere kammer, hvor fokusområdet ikke påvirkes. Eventuelt, må det benyttes flere eksterne lyskilder, eller et alternativ med bedre lysstyrke. Skal flow-systemet videreutvikles anbefales det å teste de tekniske innstillingene som har blitt presentert i oppgaven, opp mot et AI-system. Kvalitetsvurderingene som har blitt analysert gjennom denne oppgaven, samsvarer ikke nødvendigvis med kvalitetsvurderingene til et AI-system. Likevel, er antageligvis det man ser med egne øyne, et godt grunnlag til kunstig intelligens.

5.0 Konklusjon

Bacheloroppgaven har tatt for seg utviklingen av et flow-system som skal fungere som et støttende ledd i innsamling og registrering av lakseluslarver. Resultatene viser til at ved bruk av de selekterte innstillingene kan man oppnå video med god nok kvalitet til å kombinere med AI. Med bruk av AI vil man effektivisere prosesser for identifisering og registrering av lakselusens planktoniske stadier. På denne måten vil flow-systemet bidra til å gi konkret data av antall lakselus i et gitt område. Mer nøyaktige estimater vil validere datagrunnlaget som benyttes i trafikkløssystemet. Innsamlet data kan også bidra til mer forståelse av lakselusens vertikale vandringsmønstre. Dette vil bidra til mer detaljerte fjordmodeller. Flow-systemet kan også benyttes til analyse og registrering av andre planktoniske arter.

Bibliografi

- Andersen, L. B., Grefsrud, E. S., Svåsand, T., & Sandlund, N. (2022). Risk understanding and risk acknowledgement: a new approach to environmental risk assessment in marine aquaculture. *ICES Journal of Marine Science*, 79(4), 987–996.
<https://doi.org/10.1093/ICESJMS/FSAC028>
- Arne Bjørn, P., Finstad, B., Asplin, L., Skilbrei, O., Nilsen, R., & Maria Serra Llinares og Karin Boxaspen, R. K. (2011). *Metodeutvikling for overvåkning og telling av lakselus på villlevende laksefisk*. www.imr.no
- Boxshall, G., & Defaye, D. (1993). *Pathogens Of Wild And Farmed Fish: Sea Lice - Google Bøker*.
https://books.google.no/books?hl=no&lr=&id=e9KP0mkBuTAC&oi=fnd&pg=PR9&dq=boxshall+defaye+salmon+lice&ots=tPB0Clsq30&sig=c5EVE6eY63_fTGlmKGotzjF5C-8&redir_esc=y#v=onepage&q=boxshall%20defaye%20salmon%20lice&f=false
- Bruus Pedersen, C. (2015). Vertical distribution of zooplankton with emphasis on variation in lipid content and stable isotope signatures in *Calanus finmarchicus* in the deep part of Skagerrak [Master]. In *Department of bioscience* . Aarhus university.
- Bui, S., Dalvin, S., Vågseth, T., Oppedal, F., Fossøy, F., Brandsegg, H., Jacobsen, Á., á Norði, G., Fordyce, M. J., Michelsen, H. K., Finstad, B., & Skern-Mauritzen, R. (2021). Finding the needle in the haystack: Comparison of methods for salmon louse enumeration in plankton samples. *Aquaculture Research*, 52(8), 3591–3604.
<https://doi.org/10.1111/ARE.15202>
- Cheng, K., Cheng, X., Wang, Y., Bi, H., & Benfield, M. C. (2019). Enhanced convolutional neural network for plankton identification and enumeration. *PLOS ONE*, 14(7), e0219570. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0219570>
- Colin, L., Flynn, M. D., Vidal, R., Gregory, R., & Hager, D. (2017). Temporal Convolutional Networks for Action Segmentation and Detection. *Computer Vision Foundation* , 156–165.
- Copeland, B. J. (n.d.). *Artificial intelligence (AI) | Definition, Examples, Types, Applications, Companies, & Facts | Britannica*. Retrieved May 21, 2023, from <https://www.britannica.com/technology/artificial-intelligence#ref219078>
- Dalvin, S. (2018, December 17). *Generell biologi | Havforskningsinstituttet*. Havforskningsinstituttet. <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/lakselus/generell-biologi>
- De Bernardi, R. (n.d.). *Chapter 3. Methods for the Estimation of Zooplankton Abundance 1*.
- Dommasnes, A., Meeren, V. der, Gro, I., & Arefjord, H. (2008). Helhetlig forvaltningsplan for Norskehavet . *Fisken Og Havet* , 6, 1–158.
- Forskrift om bekjempelse av lakselus i akvakulturanlegg - Lovdata*. (2016, March 16). <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2012-12-05-1140>
- Fossum, S. (2021). *PCR – polymerasekjedereaksjon – Store medisinske leksikon*. https://sml.snl.no/PCR_-_polymerasekjedereaksjon
- Frank, K., Gansel, L., Myskja, A., & Oppdragsgiver, L. (2013). Permaskjørt A3–fullskala feltforsøk Dokumentasjon av skjørtets påvirkning på vannstrøm. 21.
<https://ntnuopen.ntnu.no/ntnu-xmlui/handle/11250/2465434>

- González, P., Castaño, A., Peacock, E. E., Díez, J., Del Coz, J. J., & Sosik, H. M. (2019). Automatic plankton quantification using deep features. *Journal of Plankton Research*, 41(4), 449–463. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbz023>
- Grimnes, A., Pål, B. F., & Bjørn, A. (n.d.). *Registreringer av lakselus på laks, sjørret og sjørøye i 1999 NINA NIKU NINA Norsk institutt for naturforskning*.
- Hamre, L. A., Eichner, C., Caipang, C. M. A., Dalvin, S. T., Bron, J. E., Nilsen, F., Boxshall, G., & Skern-Mauritzen, R. (2013). The Salmon Louse *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae) Life Cycle Has Only Two Chalimus Stages. *PLOS ONE*, 8(9), e73539. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0073539>
- Hamre, L. A., Glover, K. A., & Nilsen, F. (2009). Establishment and characterisation of salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer 1837)) laboratory strains. *Parasitology International*, 58(4), 451–460. <https://doi.org/10.1016/J.PARINT.2009.08.009>
- Harris, R., Wiebe, P., Lenz, J., Skjoldal, H.-R., & Huntley, M. (2000). *ICES Zooplankton Methodology Manual* (Vol. 1).
- Hassel, A., Endresen, B., Martinussen, M., Knutsen, T., & Johannessen, M. E. (n.d.). *HÅNDBOK FOR PRØVETAKING OG PRE-ANALYSE AV PLANKTON Prosedyrer for prøvetaking og pre-analyse av dyre-og planteplankton på forskningsfartøy og i laboratorium på land versjon 3.0 (mars 2013)*.
- Havforskningsinstituttet. (2023, May 21). *Hvordan spres lakselusa?* | *Havforskningsinstituttet*. <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/lakselus/hvordan-spre-lakselusa>
- Huang, X., Zong, W., Zhu, L., Chen, L., Zhang, C., Yuan, T., & Fan, M. (2014). Shadowless-illuminated variable-angle TIRF (siva-TIRF) microscopy for the observation of spatial-temporal dynamics in live cells. *Biomedical Optics Express*, Vol. 5, Issue 5, Pp. 1530-1540, 5(5), 1530–1540. <https://doi.org/10.1364/BOE.5.001530>
- Igboeli, O. O., Burka, J. F., & Fast, M. D. (2014). *Lepeophtheirus salmonis*: a persisting challenge for salmon aquaculture. *Animal Frontiers*, 4(1), 22–32. <https://doi.org/10.2527/AF.2014-0004>
- Ilaks. (n.d.). *Lakselusa kostet oppdretterne minst 5,2 milliarder kroner i 2018*. Retrieved May 21, 2023, from <https://ilaks.no/lakselusa-kostet-oppdretterne-minst-52-milliarder-kroner-i-2018/>
- Jensen, S. M. S., Nerverdal, V., & Vevelstad, A. (2021). *Utvikling av en effektiv metode for registrering av lakseluslarver i ferske planktonprøver* [Bachelor]. NTNU .
- Johannessen, A. (1975). *Lakselus, Lepeophtheirus salmonis Krøyer (Copepoda caligidae). Frittlevende larvestadier, vekst og infeksjon på laks (Salmo salar L.) fra oppdrettsanlegg og kommersielle fangster i vestnorske farvann 1973-1974. 114 s.* <https://imr.brage.unit.no/imr-xmlui/handle/11250/2394233>
- Johnsen, I. A., Fiksen, Ø., Sandvik, A. D., & Asplin, L. (2014). Vertical salmon lice behaviour as a response to environmental conditions and its influence on regional dispersion in a fjord system. *Aquaculture Environment Interactions*, 5(2), 127–141. <https://doi.org/10.3354/AEI00098>
- Karlsen, Ø. (n.d.). *Overvåking av lakselus* | *Havforskningsinstituttet*. Retrieved May 21, 2023, from <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/lakselus/overvaking-av-lakselus>
- Kierulf, P. (2022). *flowcytometri – Store medisinske leksikon*. <https://sml.snl.no/flowcytometri>

- Kutti, T., Mork, K. A., Chierici, M., Børsheim, K. Y., Bagøien, E., Knutsen, T., Broms, C., Klevjer, T. A., Strand, E., Gjørseter, H., Stenevik, E. K., Høines, Å. S., Windsland, K., & Frie, A. K. H. (2021). Pelagiske økosystem i De nordiske hav - grunnlagsstudie knyttet til åpningsprosess for utforskning og utvinning av havbunnsmineraler på norsk kontinentalsokkel. *129*. <https://imr.brage.unit.no/imr-xmlui/handle/11250/2825882>
- Lloret, L., Heredia, I., Aguilar, F., Debusschere, E., Deneudt, K., & Hernandez, F. (2018). Convolutional Neural Networks for Phytoplankton identification and classification. *Biodiversity Information Science and Standards*, *2*, e25762. <https://doi.org/10.3897/biss.2.25762>
- Lucas, C. H., Jones, D. O. B., Hollyhead, C. J., Condon, R. H., Duarte, C. M., Graham, W. M., Robinson, K. L., Pitt, K. A., Schildhauer, M., & Regetz, J. (2014). Gelatinous zooplankton biomass in the global oceans: Geographic variation and environmental drivers. *Global Ecology and Biogeography*, *23*(7), 701–714. <https://doi.org/10.1111/GEB.12169>
- Luo, J. Y., Irisson, J. O., Graham, B., Guigand, C., Sarafranz, A., Mader, C., & Cowen, R. K. (2018). Automated plankton image analysis using convolutional neural networks. *Limnology and Oceanography: Methods*, *16*(12), 814–827. <https://doi.org/10.1002/LOM3.10285>
- Mansurov, N. (2022, June 1). *Understanding ISO, Shutter Speed and Aperture - A Beginner's Guide*. <https://photographylife.com/iso-shutter-speed-and-aperture-for-beginners>
- Naustvoll, L. J., & Kleiven, M. R. (2022, June 1). *Tema: Planteplankton*. Havforskningsinstituttet .
- Nelson, E. J., Robinson, S. M. C., Feindel, N., Sterling, A., Byrne, A., & Pee Ang, K. (2018). Horizontal and vertical distribution of sea lice larvae (*Lepeophtheirus salmonis*) in and around salmon farms in the Bay of Fundy, Canada. *Journal of Fish Diseases*, *41*(6), 885–899. <https://doi.org/10.1111/jfd.12692>
- Nicholls, H. (2017). *Trafikklyssystemet Nytt system for kapasitetsjusteringer i lakse-og ørretoppdrett*.
- Oppdrettslaks til heile verda - SSB*. (2020, May 18). <https://www.ssb.no/jord-skog-jakt-og-fiskeri/artikler-og-publikasjoner/oppdrettslaks-til-heile-verda>
- PWC. (n.d.). *Hva er kunstig intelligens?* Retrieved May 21, 2023, from <https://www.pwc.no/no/teknologi-omstilling/digitalisering-pa-1-2-3/kunstig-intelligens.html>
- Ranger, C. B. (1981). Flow Injection Analysis. *Lachant Chemicals, Inc*, *53*(1), 2–13.
- Sandvik, A. D. (n.d.). *Beregning av smittepress* | Havforskningsinstituttet. Retrieved May 21, 2023, from <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/lakselus/beregning-av-smittepress>
- Sandvik, A. D., Asplin, L., Albretsen, J., Bjørn, A., Johnsen, I. A., Skarøhamar, J., Myksvoll, M. S., & Ådlandsvik, B. (n.d.). *Hydrodynamisk spredningsmodell for lakselus og konsentrasjon av smittsomme kopepoditter*. Retrieved May 21, 2023, from www.imr.no
- Sandvik, A. D., Bjørn, P. A., Ådlandsvik, L., Asplin, J., Skarøhamar, I. A., Johnsen, M., Myksvoll, M., & Skogen, D. (2016). Toward a model-based prediction system for salmon lice infestation pressure. *Aquaculture Environment Interactions*, *8*, 527–542.
- Scandinavian Photo. (n.d.). *Lukker og lukkertid – slik fungerer det!* | Scandinavian Photo. Retrieved May 21, 2023, from <https://www.scandinavianphoto.no/kunnskap/lukkertid>

- Schmid, M. S., Aubry, C., Grigor, J., & Fortier, L. (2016). The LOKI underwater imaging system and an automatic identification model for the detection of zooplankton taxa in the Arctic Ocean. *Methods in Oceanography*, 15–16, 129–160. <https://doi.org/10.1016/J.MIO.2016.03.003>
- Schram, T. A. (2004). *Practical identification of pelagic sea lice larvae*. 8, 103–110. <https://doi.org/10.1017/S0025315404008963h>
- Sjømat Norge. (n.d.). *Sjømatnorge.no - To røde soner, er to for mye - Sjømatnorge.no*. Retrieved May 21, 2023, from <https://sjomatnorge.no/to-rode-soner-er-to-for-mye/>
- Skogen, M., Gjørseter, H., Toresen, R., & Robberstad, Y. (2007). *Havets ressurser og miljø 2007* (Vol. 1).
- Smith, P. E., Counts, R. C., & Clutter, R. I. (1968). Changes in filtering efficiency of plankton nets due to clogging under tow. *ICES Journal of Marine Science*, 32(2), 232–248. <https://doi.org/10.1093/ICESJMS/32.2.232>
- Taggart, C. T., & Leggett, W. C. (1984). Efficiency of Large-Volume Plankton Pumps, and Evaluation of a Design Suitable for Deployment from Small Boats. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 41(10), 1428–1435. <https://doi.org/10.1139/F84-176>
- Thompson, C. R. S., Bron, J., Bui, S., Dalvin, S., Fordyce, M. J., á Norði, G., & Skern-Mauritzen, R. (2022). A novel method for the rapid enumeration of planktonic salmon lice in a mixed zooplankton assemblage using fluorescence. *Aquaculture Research*, 53(6), 2317–2329. <https://doi.org/10.1111/ARE.15750>
-