



NTNU

Kunnskap for en bedre verden

Bacheloroppgave

MB 301612

**Kartlegging av påvekst på biolegemer fra RAS-anlegg
for laksesmolt.**

Kandidatnummer eller kandidatnumre: 1305, 1315

Totalt antall sider inkludert forsiden: 52

Innlevert Ålesund, 02.06.2016

Obligatorisk egenerklæring/gruppeerklæring

Den enkelte student er selv ansvarlig for å sette seg inn i hva som er lovlige hjelpemidler, retningslinjer for bruk av disse og regler om kildebruk. Erklæringen skal bevisstgjøre studentene på deres ansvar og hvilke konsekvenser fusk kan medføre. **Manglende erklæring fritar ikke studentene fra sitt ansvar.**

Du/ dere fyller ut erklæringen ved å klikke i ruten til høyre for den enkelte del 1-6:		
1.	Jeg/vi erklærer herved at min/vår besvarelse er mitt/vårt eget arbeid, og at jeg/vi ikke har brukt andre kilder eller har mottatt annen hjelp enn det som er nevnt i besvarelsen.	<input checked="" type="checkbox"/>
2.	Jeg/vi erklærer videre at denne besvarelsen: <ul style="list-style-type: none">• ikke har vært brukt til annen eksamen ved annen avdeling/universitet/høgskole innenlands eller utenlands.• ikke refererer til andres arbeid uten at det er oppgitt.• ikke refererer til eget tidligere arbeid uten at det er oppgitt.• har alle referansene oppgitt i litteraturlisten.• ikke er en kopi, duplikat eller avskrift av andres arbeid eller besvarelse.	<input checked="" type="checkbox"/>
3.	Jeg/vi er kjent med at brudd på ovennevnte er å <u>betrakte som fusk</u> og kan medføre annullering av eksamen og utestengelse fra universiteter og høgskoler i Norge, jf. Universitets- og høgskoleloven §§4-7 og 4-8 og Forskrift om eksamen.	<input checked="" type="checkbox"/>
4.	Jeg/vi er kjent med at alle innleverte oppgaver kan bli plagiatkontrollert i Ephorus, se Retningslinjer for elektronisk innlevering og publisering av studiepoenggivende studentoppgaver	<input checked="" type="checkbox"/>
5.	Jeg/vi er kjent med at høgskolen vil behandle alle saker hvor det forligger mistanke om fusk etter NTNUs studieforskrift.	<input checked="" type="checkbox"/>
6.	Jeg/vi har satt oss inn i regler og retningslinjer i bruk av kilder og referanser på biblioteket sine nettsider	<input checked="" type="checkbox"/>

Publiseringsavtale

Studiepoeng: 22,5

Veileder: Stig Atle Tuene

Fullmakt til elektronisk publisering av oppgaven

Forfatter(ne) har opphavsrett til oppgaven. Det betyr blant annet enerett til å gjøre verket tilgjengelig for allmennheten ([Åndsverkloven §2](#)).

Alle oppgaver som fyller kriteriene vil bli registrert og publisert i Brage med forfatter(ne)s godkjenning.

Oppgaver som er unntatt offentlighet eller båndlagt vil ikke bli publisert.

Jeg/vi gir herved NTNU i Ålesund en vederlagsfri rett til å gjøre oppgaven tilgjengelig for elektronisk publisering:

ja nei

Er oppgaven båndlagt (konfidensiell)?

ja nei

(Båndleggingsavtale må fylles ut)

- Hvis ja:

Kan oppgaven publiseres når båndleggingsperioden er over?

ja nei

Er oppgaven unntatt offentlighet?

ja nei

(inneholder taushetsbelagt informasjon. [Jfr. Offl. §13](#)/[Fvl. §13](#))

Dato:

Antall ord: 9588

Forord

Oppgaven er formet av eget initiativ og interesse mot næringa og oppdrett av laks på land. Allerede i vintermånedene startet forberedelsene for oppgaven som resulterte i en god prosess som gav mye frihet i forhold til innhold.

Denne bacheloroppgaven vil beskrive hvilke organismer som lever i ulike RAS-anlegg (Resirculating Aquaculture System). Det er valgt ut 5 anlegg i Møre og Romsdal, hvor det ble samlet inn prøvemateriale som ble undersøkt våren 2016. Denne oppgaven tar for seg en problemstilling som det er gjort lite undersøkelser på, men som kan vise seg viktig i en næring i stor vekst. Oppgaven er gjort i samarbeid med NTNU i Ålesund, med hjelp fra hovedveileder Stig Tuene som alltid hadde døren åpen.

Vi vil også rette en stor takk til Marine Harvest som har gjort det mulig for oss å gjennomføre forsøket, samt Krüger Kaldnes for god hjelp.

Sammendrag

I denne oppgaven ble det gjennomført undersøkelser av biolegemer i RAS-systemet til fem forskjellige settefiskanlegg i Møre og Romsdal. Problemstillingen som ble undersøkt var: Finnes det mer avansert liv enn bakterier i RAS for produksjon av laksesmolt?

Forsøksmaterialet ble hentet på anleggene, og undersøkelsene ble gjort ved NTNU i Ålesund. Kartleggingen av organismene ble gjort i mikroskop. I tillegg til å kartlegge hvilke organismer som lever i biofilteret, ble vekten av biofilmen målt.

Det ble funnet mange ulike protozoa og metazoa i alle anleggene. Noen anlegg hadde stor diversitet, mens andre hadde et lavere mangfold. Av ciliater var det totalt sett flest av *Platycola* og *Carchesium*. Av metazoa var det en betydelig mengde nematode og rotatorie, men i forhold ciliatene, ble de observert sjeldnere. Vekten for anleggene varierte fra 0,5 til 2,4 mg. Resultatet beviste at det var forskjellige forhold for organismene.

I fremtiden kan en kanskje bruke sammensetningen av protozoa og metazoa i biofilterne for å beskrive og/eller forbedre produksjonen, lignende det som nå gjøres for vannrenseanlegg.

Nøkkelord: Biofilm, ciliater, RAS, mikroorganismer, Atlantisk laks, biolegeme.

Innholdsfortegnelse

1. INNLEDNING	1
1.1 RAS-ANLEGG.....	2
1.2.BIOFILTERET	3
1.2.1 Nitrifikasjon	4
1.2.2 Protoza og metazoa som bioindikatorer	5
2. MATERIAL OG METODE	7
2.1 BIOLEGEMER I ANLEGG	7
2.2 OPPSETT FOR Å HOLDE LIV I BIOFILTERET	7
2.2.1 Mikroskopobservasjon	8
2.3 INNLEDENDE FORSØK.	9
2.4 HOVEDFORSØK	10
2.4.1 Oppsett av biofilter.....	11
2.5 KARTLEGGING AV ORGANISMER	11
2.6 VANNKVALITET I ANLEGGET	13
2.7 ORGANISMER I SIRKULERENDE VANN	14
2.8 TOTAL VEKST PÅ BIOLEGEMET	15
2.9 DATABEHANDLING OG STATISTIKK	17
3. RESULTATER	19
3.1 ORGANISMENE.....	20
3.2 VEKTANALYSE.....	25
3.3 ORGANISMER I VANN.....	28
4. DISKUSJON	32
4.1 MATERIALE OG METODER	32
4.2 RESULTATER.....	34
5. LITTERATURLISTE	38
6. VEDLEGG	40
6.1 ULIKE VEKTER I GRAM PR BIOLEGEME	40
6.2 ANTALL ORGANISMER PR LITER VANN.	42

1. Innledning

Globalt sett har akvakultur hatt en enorm vekst siden 80 tallet med en total produksjon på 66,6 millioner tonn ved utgangen av 2012 hvor Kina står for 61,7% og Norge med 2% (1). Næringa er viktig for Norge, og det kommer den til å være i årene fremover. Laks (*Salmo salar*) er den desidert viktigste arten innenfor havbruk, hvor det kan vises til en omsetning på nesten 50 milliarder ved utgangen av 2015 (2). Det er estimert en årlig vekst i smoltproduksjonen på 5 til 7 % (3). Norsk laks er blitt en sterkt merkevare og på grunn godt kvalitetsarbeid, er prisen relativt høy. Det er estimert at havbruksnæringa vil fortsette å vokse, så lenge aktørene klarer å bekjempe de største truslene for næringa som lus, rømming og sykdommer (4). På 80- tallet var det stor etterspørsel og det ble derfor mer vanlig å etablere en rekke frittstående settefiskanlegg for produksjon av smolt (5). Dette ble på mange måter startskuddet på det norske eventyret med hvor flere kreative løsninger ble tatt i bruk for å forme en god produksjon av fisk (6). Næringa har hatt sine problemer men generelt sett har den hatt en positiv stigningskurve med tilførsel av ny resurser, FoU (Forskning og utvikling) samt gode priser (6).

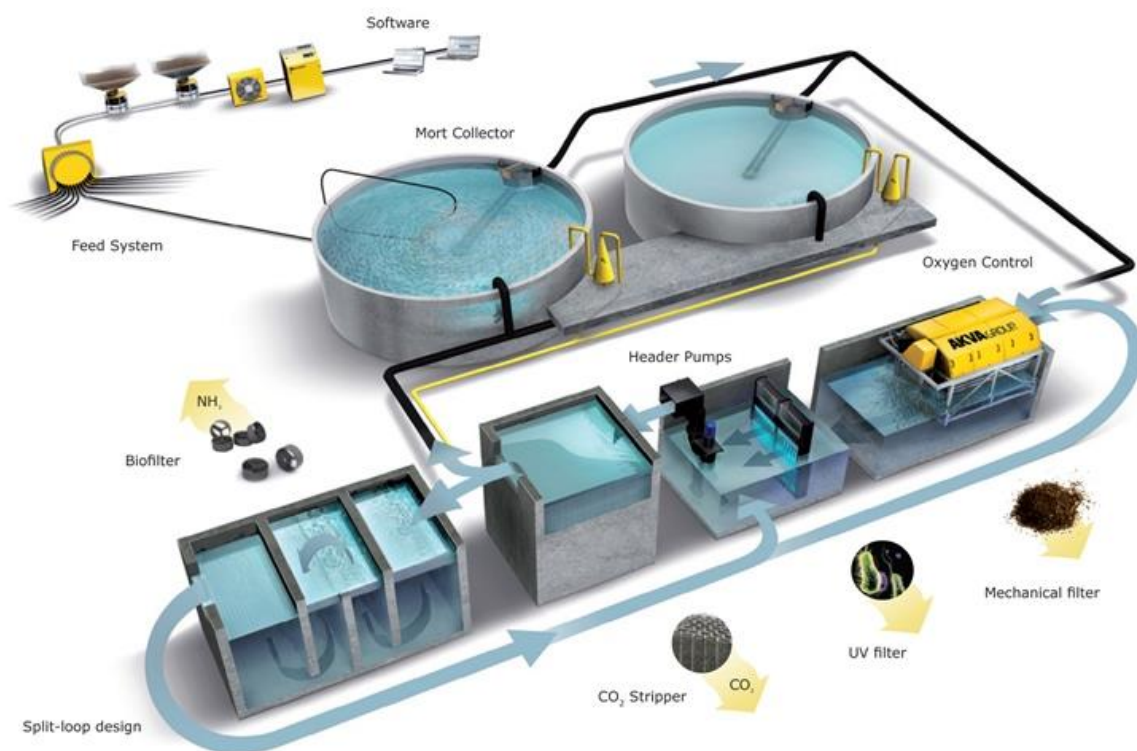
Før laksen kommer på middagsbordet, går den i igjennom en rekke stadier; fra rogn til slakt. Egne stamfiskanlegg produserer rogn som blir strykt ut fra stamfisken og sendt til settefiskanlegg. I settefiskanlegget går fisken gjennom en vekstperiode fra rogn til smolt. Smoltifiseringen er fasen før fisken skal tilvende seg et liv i saltvann. Før smoltifisering trenger fisken tilgang på ferskvann, og derfor blir settefiskanleggene lokalisert ved små elver, hvor anlegget kan ta ut en gitt mengde vann for å drive disse anleggene (7). Det er blitt stilt spørsmål om hvorvidt oppdrett av fisk er bærekraftig, og ikke helt uten grunn (8). Det er ikke noen tvil om at i denne næringa med så stor biomasse, forurenses faunaen i nærheten om avfallsvannet ikke blir behandlet på riktig måte, derfor vil et resirkuleringsanlegg være mer fremtidsrettet. RAS (Resirculating Aquaculture System) trenger en omfattende vannbehandling sammenlignet med gjennomstrømningsanlegg (8) I RAS-anlegg vil ammoniums-fjerning i biofilteret være avgjørende for hvorvidt fisken kan leve. Dette krever ett sett med velfungerende bakterier.

1.1 RAS-anlegg

RAS er et system som gjør oppdrett av saltvanns og ferskvannsfisk mulig i en tid hvor rent vann er en begrensende faktor. I et slikt anlegg har en større kontroll over hva som går inn og hva som går ut (6). I vanlig settefiskanlegg som ikke tar for seg resirkulering, vil ekskrementer og fôrspill pumpes ut i sjøen og vil påvirke resipienten. Med mulighet for å spare vann og energi, legger resirkulering til rette for en rask og effektiv produksjon av smolt (7). Avløpsvannet må gjennom forskjellige prosesser for at det kan brukes om igjen, en kan dele det inn i disse fasene (6);

- 1) Partikkel- fjerning.
- 2) CO₂ – fjerning.
- 3) Justering av pH.
- 4) Biofilter.
- 5) UV-filtersystem.
- 6) Varmebehandling.
- 7) Fjerne nitrogenovermetning.
- 8) Oksygentilsetning.

Figur 1 viser et eksempel på hvordan et resirkuleringsanlegg er satt sammen.



Figur 1: Oversikt over hvordan et RAS anlegg kan se ut. Denne figuren viser de ulike prosessene som er nødvendig for at et resirkuleringsanlegg vil fungere. (9)

1.2. Biofilteret

En avgjørende faktor for drift av RAS er den ammoniumfjerningen som blir løst av biologiske filtre. Disse filtrene har som hovedoppgave å gjøre om toksisk ammonium til nitrat hvor nitrifikasjonsprosessen er en nøkkelfaktor. Som regel befinner disse filtrene seg i sylindriske bioreaktorer fylt med et medium (10). Mediumet kan bestå av: sand, grus, stein eller plast. Slike medium gir gode forutsetninger for bakterievekst (11).

Den perfekte modellen for et biofilter ville fjernet all ammonium, ikke produsere nitritt, gi store populasjoner av nitrifiserende bakterier og lave kostnader (12).

I Norge er det i all hovedsak plastmedium i form av typen Krüger Kaldnes type K1, K2, og K3 (12). Disse bærerene er lagd av polyetylen (PEHD) med en tetthet på $0,95\text{g/cm}^3$, og blir brukt i moving bed biofilm bioreactors (MBBR)(12).

For å oppnå god funksjon i fra disse systemene er det blitt anbefalt å ha en maksimumsandel av biogemer på 70% av volumet bioreaktoren, men det kan også benyttes en mindre prosentfraksjon (12). Som nevnt brukes typen K1, K2 og K3 biogemer i norske anlegg, disse danner en mye større overflate enn selve bioreaktoren (12). Med høyere overflate er det gitt at flere nitrifiserende bakterier fester seg i hulrommene i biogemet og skaper et naturlig filter mot ammonium og til dels for partikler (10).

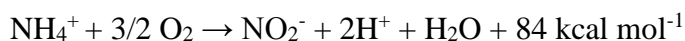
1.2.1 Nitrifikasjon

Den viktigste prosessen i biofiltret er omdanningen fra det toksiske kjemikalie ammonium til det mindre farlige nitrat via nitritt, dette kalles den nitrifiserende prosessen (10). Ammonium er et akkumulerende stoff som gir alvorlige, strukturelle og biokjemiske endringer på fisken når nivået ammonium i vannet er 2,4 $\mu\text{mol/l}$ (mikro mol pr liter). Dødelige konsekvenser ved et ammoniumnivå pr liter vann ved 9,4 – 64,7 $\mu\text{mol/l}$ NH_3 (13).

Bakteriene som omdanner ammonium til nitrat er festet til biogemet i biofiltret og i selve biofilteret. Disse kalles nitrifiserende bakterier og er enten aerobisk-autotrofe eller miksotrofiske mikroorganismer (14). Høyere tetthet av de nitrifiserende bakterier gir derfor høyere omsetting av ammonium til nitrat (10).

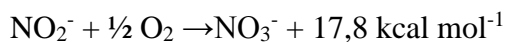
Nitrifikasjonen foregår i to faser (10).

I den første fasen blir ammonium oksidert til nitritt av ammoniums oksiderende bakterier. Disse er klassifisert i to fylogenetiske grupper: *Nitrococcus* i gruppe en og *Nitrosospira* og *Nitrosomonas* i gruppe to. Begge gruppene er undergrupper av proteobakteriene (15). Selve oksidasjonen er gitt i:



Hvor: Ammonium oksideres til hydroksylamin og videre til nitritt (10, 14)

I den andre fasen blir nitritt oksidert til nitrat av flere nitritt oksiderende bakterier (7). To marine arter av *Nitrobacter*, *Nitrococcus mobilis* og *Nitrococcus gracilis*, underklasser av proteobakteriene. Samt to arter av *Nitrospira*, *Nitrospira marina* og *Nitrospira moscoviensis*, underklasser av proteobakteriene (14). Selve oksidasjonen gitt i (10):



Hvor: Nitritt blir autotrofisk oksidert til nitrat ved hjelp av enzymet nitritt oksidoreduktase(14).

1.2.2 Protoza og metazoa som bioindikatorer

I naturen finnes det protozoa og metazoa (16). Disse er viktige bestanddeler i det akvatiske økosystemet, i sedimentet, i vannet og på organismer. Noen av disse avhenger av næringsrik mat, mens andre spiser bakterier. I økosystemet har de en viktig rolle som forbruker av oppløst oksygen, de resirkulerer næring, og som en matkilde for større organismer (16). De vokser fort i biomasse, og replikasjonskapasiteten kan være stor. De er også veldig allsidig og tallrike, fordi de kan feste seg til all slags underlag(16).

Amøber, flagellater og ciliater er hovedgruppene av protozoa. Protozoa er encellede dyrelignende protister. Generelt fins det protozoa i ferskvann, saltvann og jord og som parasitter. Variasjonen i størrelsen er stor, men vanligst finner man dem med størrelse 10 – 50 mikrometer, selv om man kan finne dem opp til 6 cm (17). Det som skiller flercellede organismer fra protozoa i kolonidannede former, er at protozoene er veldig like, og uavhengig av hverandre. Protozoa består av en celle, og i denne cellen er det noen få organeller. Det er gjort mange undersøkelser av vannbehandlings- system, hvor en har sett på funksjonen og effektiviteten til protozoa og metazoa. Disse brukes ofte som indikatorer for behandlingskvaliteten, fordi de er følsomme for biologisk, kjemisk og fysiske prosesser (18). SBI (Sludge Bionic Index) blir brukt for å identifisere, klassifisere og telle arter. Dette må gjøres manuelt, som gjør dette til en tidkrevende og faglig krevende prosess (18).

Ciliater (Cilophora) er encellede dyr med små flimmerhår kalt cilier. Cellekjernene kalles makro og mikronukleus. De har også cellemunn, og her blir næringen tatt opp. Denne næringen vil til slutt ende opp i cytopharynx som er en næringsvakuole hvor næringen blir fordøyd ved hjelp av enzymer (17). I akvakultur har ciliater vært fokus for arbeid ved sykdommer og parasitter (19). For eksempel er *Epistylus* sp. ofte registrert på finner eller gjeller, som kan gi økt forekomst av saprolegniosis og bakteriesykdom *Vorticella* sp. har samme potensial (19). Nematoder blir sett på som en positiv faktor for mikro-faunaen i biofilteret, på grunn av sin tiltrekning til anaerobe bakteriekolonier (19). Rotatorier er en viktig bidragsyter som levende fôr for mange typer fisk, men tidligere ble den sett på som et skadedyr. Rotatorier kan også bidra med å redusere bakteriekolonier i et resirkuleringsanlegg, samt samle opp suspenderte stoffer (19) Studier har vist at protozoa kan skille ut materialer for å akkumulere bakterier, og suspenderte faste stoffer. Det er ved denne sammenhengen det

er påvist at protozoa har en direkte rolle ved avløpsrensing, hvor de har mulighet til å hindre bakterier til å nå et selvbegrenset antall (20). Det meste av litteraturen støtter opp teorien om at protozoa spiller en viktig rolle i vannbehandling ved å redusere de suspenderte bakteriecellene som igjen fører til bedre kvalitet i avløpsvannet (21).

SBI kan brukes som et verktøy for å kunne vurdere og forutsi avløpskvaliteten til renseanlegg (18). Det komplekse nettverket (økosystemet) av bakterier, protozoa og metazoa forandrer seg hurtig ved store forandringer i miljøet. Et anlegg har sin spesielle fauna, som gjør at overvåking er nødvendig for at en skal kunne forutse resultatene. De optimale forholdene viser seg å være når det oppstår en riktig balanse mellom bevegelige ciliater, fastsittende ciliater og metazoa. Om det eksisterer en større andel av flageller, amøber eller frittsvømmende ciliater, viser det en høy F: M (Food to microorganism ratio). Om det hovedsakelig er fastsittende ciliater og metazoa vil det bety en lav F: M (18). Det eksisterer en brukervennlig guide for å identifisere ciliater i ferskvann (22).

Det er ikke publisert resultater om protozoa eller metazoa fra norske resirkuleringsanlegg, og heller ikke for utenlandske RAS-anlegg for laksefisk, men det finnes en rekke publiseringer for internasjonal akvakultur (16, 19) For laks og rekeoppdrett viser det seg at mikroorganismer spiller en stor rolle (16).

1.3 Problemstilling

Finnes det mer avansert liv enn bakterier i norske RAS-anlegg for produksjon av laksesmolt?

2. Material og metode

2.1 Biologemer i anlegg

I anleggene ble utvalgte anlegg blir det brukt 2 typer biologeme, Anoxtm K5 og BiofilmChiptm P i anlegg 1 og 2, 3, 4, 5.

Tabell 1: Oversikt over nøkkeltall for biologemene

	Type biologeme	
	K5	BiofilmChip P
Diameter (mm)	25	45
Tykkelse (mm)	3,75	3
Beskyttet overflate for biofilmvekst (m ² /m ³)	800	900
Antall pr m ³	331 000	132 000

2.2 Oppsett for å holde liv i biofilteret.

Et eksperimentelt oppsett for oppbevaring av biofilter ble satt sammen på NTNU i Ålesund på F&U-laboratoriet. I småskala med temperaturkontroll ved hjelp av et kjøleskap (13,1 – 14,9°C).

Bestanddeler i forsøket:

- Kjøleskap av typen, Bosch
- Luftbobling fra, Tetra; APS 400
- Silikonlange for luftføring og næringsføring
- Fordeler for sammensveising av silikonlanger
- 1,5 liters flaske fylt med vann for fordeling av temperatur
- 5 liters dunk fylt med vann for fordeling av temperatur
- Plastic Biofilm Carriers (PBC) fra Krüger Kaldnes type K5 fra Moving Bed Biofilm Reactors (MBBR).
- Næringsmedium for nitrifiserende bakterier bestående av C-kilde, P-kilde og Stockløsning. Sammensetning av mediet ble bestemt ut fra tabell 2.

Tabell 2: Næringsmedium for nitrifiserende bakterier. Sammensetning av mediet.

Tilsatt pr. 5 liter: (23) .

50 mg/l NH₄-N N- og energikilde 11,8 g (NH₄)₂SO₄

P-kilde 20 g K₂HPO₄

C-kilde 50 g NaHCO₃

Spormetaller 500 ml av stockløsning*

*Spormetall-stockløsning, 100 x (denne er ferdig laget):

Komponent Tilsatt pr. 1 liter

MgSO₄ \cong 7 H₂O 2,5 g

CaCl₂ \cong 2 H₂O 1,5 g

FeCl₂ \cong 4 H₂O 0,2 g

MnCl₂ \cong 4 H₂O 0,55 g

ZnCl₂ 0,068 g

CoCl₂ \cong 6 H₂O 0,12 g

NiCl₂ \cong 6 H₂O 0,12 g

EDTA; Titriplex III 2,8 g

** innveid i separat stockløsning og tilsatt fortynnet.

Alt løses i springvann, pH justeres til 7,5.

2.2.1 Mikroskopobservasjon

Bestanddelene til forsøk.

Mikroskop, LEICA BA310

Zoom på mikroskop, 10x /0,25

Linse på mikroskop, HC plan 40x /20

Petriskål

Biologeme

Fremgangsmåte

Et biolegeme ble hentet fram i 5 liters bøtta og lagt på langs på glasset og bragt under mikroskopet.

2.3 Innledende forsøk.

Som start for prosjektene ble det gjennomført innledende forsøk for å finne egne, gode løsninger på hvordan dette skulle gjøres. Primært samtaler med personer som jobber med forskning og rådgivning innen feltet samt samtaler med veileder, har ført fram til løsninger som ble utprøvd. Mange av de løsningene som ble foreslått og utprøvd, viste seg å fungere og dermed ansett som aksepterte for prosjektet.

Av forsøk ble det tatt i bruk F&U (forskning og utvikling) labben på NTNU i Ålesund hvor prøvemateriale ble oppbevart i et kjøleskap med en etasje til prøvemateriale og en etasje til å holde temperaturen konstant, totalt 2 etasjer. Større volum (1,5 til 5 liter) fylt med vann ble benyttet for å holde en stabil temperatur i kjøleskapet. Kjøleskapet holder mediet og væsken i en temperatur som tilsvarer et RAS-anlegg for laks, temperaturen, næringstilførsel og O₂ tilførselen skapte et klima som gav gode levevilkår for organismene i biolegemet.



Figur 2: Innledende forsøk, kjøleskap med sirkulerende biolegemer i plastbeholderne på midtre hylle.

Fremgangsmåte i innledendeforsøk.

Det ble hentet inn K5 biogemer i vann fra anlegg 1. En porsjon ble fraktet i en 5 liters bøtte i naturlig temperatur, gitt 9 – 15 °C (figur 2).

Enhetene av biogemer ble plassert i kjøleskapet som på det tidspunkt holdt 14,6°C. For betaforsøket ble det valgt å lage en aerobisk MBBR som sørger for god omrøring av biogemene hvor agitasjon er forårsaket av lufttilførsel fra egne pumper (12). Et biogemevolum volum på ~70% ble opprettholdt for å sikre fri flyt i vannmiljøet (12). Lufttilførselen i karene hadde en effekt på 4,5 W, med en kapasitet på 400 l/t (liter i timen). Det ble ikke tatt hensyn til å tilføre partikler i systemet som ellers ville vært en normal selvfølge i kommersielle RAS anlegg(8). Disse partiklene kommer blant annet fra ekskrementer og fôrspill.

For å holde live i de nitrifiserende bakteriene ble det tilsatt medium som beskrevet i tabell 2. Mediet ble tilsatt i mengden 100 ml om dagen fordelt på to enhetene. Forsøket ble fulgt opp i en uke hvor biogemene ble undersøkt for groing mikroorganismer.

2.4 Hovedforsøk

Som en fortsettelse fra innledendeforsøk ble det fokusert på identifisering og kvantifisering av vekst på biogeme, vekten av biofilm på biogemet samt hvorvidt de mikrobielle organismene kan finnes i det sirkulerende vannet i kar og biofilter.

I hovedforsøket ble det brukt åtte mindre beholdere for å kunne få plass i kjøleskapet. Fire av beholderne inneholdt biogemer (øvre) og fire inneholdt kun væske fra RAS-anlegget (nedre). Pumpa som ble brukt, var lik den som var med på betaforsøket, men med små modifiseringer pumpet den til fire beholdere. Kretsen i nedre del av kjøleskapet, ble tilført luft fra en ny ekstern pumpe. Det var viktig at det var mest mulig væske i beholderne under forsøket, slik at organismene ikke døde ut. Volumet til disse beholderne var 5 dl. Nytt av hovedforsøket var beregningene av vekten til biogemet og vannanalyse av biofilteret og karene til de aktuelle anleggene.



Figur 3: Kjøleskap for hovedforsøk med MBBR og vann fra anlegg

2.4.1 Oppsett av biofilter

2.5 Kartlegging av organismer

Kartleggingen av innholdet til biolegemet sto som den primære oppgaven for dette prosjektet. Totalt ble det hentet ut biolegemer fra fem biofiltre fra resirkuleringsanlegg i fylket Møre og Romsdal på disse datoene:

Anlegg 1.	09.02.2016
Anlegg 2	30.03.2016
Anlegg 3	30.03.2016
Anlegg 4	30.03.2016
Anlegg 5	30.03.2016

Analysematerialet ble fraktet til skolen og satt i kjøleskapet.

Bestanddelene i forsøket.

Øse

Tellekammer, Bürker

Skalpell

Mikroskop av typen, Leica BA310

Zoom på mikroskop, 40x /0,25

Linse på mikroskop, HC plan 10x /20

Petriskål

Biologeme

Tannbørste

Pinsett

Hansker

Telleklokke

Fremgangsmåte:

Biologeme ble hentet ut av sitt miljø i kjøleskapet og ble videre lagt i en petriskål.

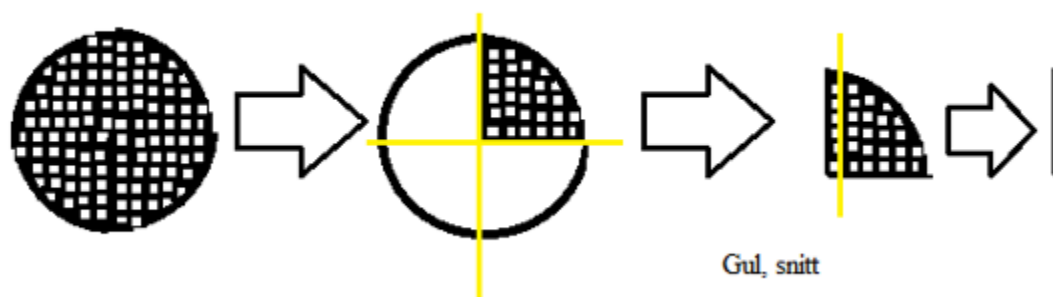
Kjøleskapet holdt en temperatur som strakk seg mellom 13,1-14,9°C. På anleggene varierte temperaturene fra 5°C til 15°C (observasjon fra loggbøker) på grunn av forskjellig årstider.

Biologemet sitt særegne design gjorde det tilnærmet umulig å se sidene ovenfra og kvantifisere antall organismer. Problemet ble løst ved å skjære opp biologemet for så skrape av en side som ble avlest via mikroskop. For hver chip som ble undersøkt, ble det brukt samme metode. På den endelige avkuttet delen, ble en tilfeldig side av en rute skrapet av, for så å bli lagt på ett mikroskopglass.

Først ble det tatt bilder av de ulike organismene som ble funnet. Etter at det ble kartlagt hvilke organismer som levde på hver chip, ble det telt hvor mange av hver som fantes. For å få det mest reelle tallet ble en flate telt på biologemet og ganget opp med antall sider for det aktuelle tallet (fire), deretter ble dette tallet ganget med antall ruter på de respektive biologemene. Det ble brukt to forskjellige typer under forsøket. Det ene anlegget brukte Anox K5 og de resterende fire brukte BiofilmChip P. Siden det er ulik størrelse på disse, ble det regnet ut i cm². For Anox K5 var tallet en skulle dele på 24,17 cm², og for P var tallet 68,18 cm².

Denne prosedyren ble foretatt fem ganger fra hvert anlegg, for å få et mål på variasjonen for det aktuelle anlegget.

Biologemer fra hvert anlegg ble også lagt horisontalt på petriskålen. Mikroskopet ble justert i zoomen for å dekke biologemet ovenfra og ned. Det ble tatt bilder, men antall organismer ble ikke telt. Dette ble brukt for å beskrive hvordan samfunnet så ut.



Figur 4a: Hvordan snittene ble utført



Figur 4b: Hvordan snittene ble utført i praksis

2.6 Vannkvalitet i anlegget

Hvert anlegg fører sin egen logg for verdier av ammonium, nitritt, nitrat pH, °C, antall fisk og fôring. Sammenligningen av disse tallene vil gi en indikasjon på hvilke verdier anleggene hadde, samt hvilke forskjeller det var i vannkvaliteten. I de aktuelle anleggene, ble det daglig registrert og loggført. Disse dataene ble tatt bilde av, og ført i egne tabeller

2.7 Organismer i sirkulerende vann

Ettersom egne studier i betaforsøket viste til flere frittsvømmende ciliater i biolegemet ble det interessant å undersøke hvorvidt disse organismene var å finne i andre deler av anlegget enn biofilteret.

Bestanddelene i forsøket:

Pipette 1000 ml

Vann fra anlegg, minimum 20 ml

Lupe

Mikroskop av typen, Leica BA310

Zoom på mikroskop, 10x /0,25, 40x/0,25

Linse på mikroskop, HC plan 10x /20

Petriskål

Fremgangsmåte:

For å fastsette et tall på organismer i sirkulerende vann fra anlegg ble det hentet en prøve fra ett fiskekar samt en vannprøve fra biofilteret. Prøvene ble fraktet til lab på NTNU i Ålesund, En milliliter ble hentet ut fra prøvematerialet og tilført i petriskål i små dråper for enklere observasjon av mikroorganismer. Det mest hensiktsmessige er å lete etter organismer med egenbevegelse ettersom det gir tegn på liv. Resultatet ble et antall pr milliliter av mikroorganismer. Ettersom en milliliter er 1/1000 av en liter ble antallet mikroorganismer ganget opp med 1000 for å finne antall mikroorganismer pr liter.

Blant prøvematerialet er det også mulig å finne ekskrementer og fôrrester, derfor ble det viktig med nøye observasjon og kun se etter egenbevegelse.

Forsøket ble gjennomført 10 ganger pr prøve for å finne gjennomsnittet og spredning.

Hvilke arter som forekommer mest under observasjonene ble registrert. Artene ble observert i lupe og flyttet til mikroskopet, Leica BA310 som har fotograferingsfunksjon. Fotografiene ble tatt under optikk 10x og 40x alt ettersom hvor fort artene beveget seg.

2.8 Total vekst på biolegemet

For å fastsette vekten av biofilmen ble det veid og tørket 10 eksemplarer fra hvert forsøk.

Bestanddelene i forsøket:

Biolegeme

Kaffepapir

Pinsett

Veier

Excel

Klor, 5 % Natrium Hypochlorit

Petriskål

Inkubasjonsmaskin

Fremgangsmåte:

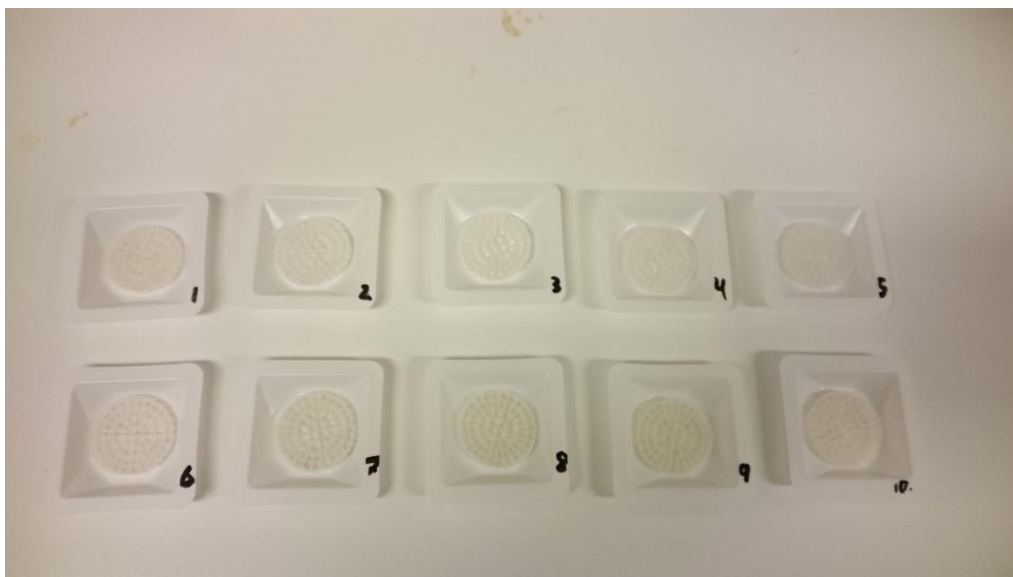
For å fastsette total vekt av biofilm på biolegemet måtte eksemplaret bli behandlet og veid i flere stadier. I dette tilfellet ble biolegemet behandlet i tre trinn.

1. Biolegeme ble hentet ut av kjøleskap og tørket av på et kaffefilter. Pinsett ble brukt i overføring for å hindre kontaminering og vektpåvirkning. Filteret absorberte vannet fra biolegemet og skapte et produkt med tørrhetsgrad hvor det våte elementet lå i de organiske enhetene. Dette produktet ble veid og notert.

2. I neste steg ble biolegemet inkubert i 60 °C over en dag. De inkuberte enhetene ble ført til veierommet for å veie ny verdi. Igjen ble pinsett brukt for overføring. Det tørkede produktet ble veid og notert.

3. I det siste steget ble biolegemet badet i klor, 5% natrium hypochlorit, for å fjerne alt biologisk materiale fra plastikken. På den måten ble det mulig å veie plastikken uten noen groing og ville derfor fungere som den "originale" vekten for det aktuelle biolegemet. Biolegemet lå i klorbadet i 15 minutter og lagt i inkubator i 2 timer.

Med disse tre verdiene er det mulig å finne ut hvor mye groing som totalt fins på biolegemet. En verdi for våtvekt og en for tørrvekt.



Figur 5: Bilde av klorrenset biolegemer fra anlegg 1.

Med verdiene gitt i gram pr biolegeme kan gi et misvisende overblikk over alle anleggene ettersom anleggenes biolegeme varierer mellom to typer: BiofilmChiptm P og Anoxtm K5, gitt i disse produktspesifikasjonene:

BiofilmChiptm P benyttet i anlegg 2, 3, 4, 5.

900 m²/m³ beskyttende overflate.

132 000 biolegemer pr m³

Anoxtm K5 benyttet i anlegg 1.

800 m²/m³ beskyttende overflate.

331 000 biolegemer pr m³

Med disse verdiene kan en regne om enheten biolegeme til en fastsatt enhet gitt i kvadratcentimeter.

BiofilmChip™ P

$$1 \text{ m}^3 = 10\,000 \text{ cm}^3$$

$$900 * 10\,000 = 9\,000\,000 \text{ m}^2/\text{cm}^3$$

$$132\,000 / 9\,000\,000 \text{ m}^2/\text{cm}^3 = 68,18 \text{ cm}^2$$

Anox™ K5

$$1 \text{ m}^3 = 10\,000 \text{ cm}^3$$

$$800 * 10\,000 = 8\,000\,000 \text{ m}^2/\text{cm}^3$$

$$331\,000 / 8\,000\,000 \text{ m}^2/\text{cm}^3 = 24,169 \text{ cm}^2$$

Dermed ble det mulig å bruke antall gram som ble funnet i forholdstallet som definerer antall gram pr biolegeme og dele det med enhetens kvadratcentimeter, altså 68,18 cm² eller 24,169 cm². Merk: 2,82 ganger så stor forskjell mellom anlegg.

Det nye forholdstallet ble vist i gram pr cm² og kunne videre gjøres om til mg pr cm² ved å gange opp med 1000 som er differansen mellom gram og milligram.

Det ble brukt T-test(Excel) for å se etter forskjeller i biofilm (målt som mg/cm²) mellom anlegg. P-verdien sier hvor signifikant forskjellen er mellom to anlegg. Metode som i 2.2.

Som en avslutning for denne delen av prosjektet skal standardavviket og gjennomsnittet for anlegget beregnes.

2.9 Databehandling og statistikk

Under bachelorprosessen ble det i all hovedsak benyttet Microsoft Word og Microsoft Excel. Microsofts One Drive system ble benyttet for å lagre dokumentene. For bildene av mikroorganismer ble Leica 200 D benyttet med programmet Leica Application Suite V4.

Gjennomsnitt og standardavvik ble beregnet i Excel ved å dra over alle resultater og benytte deskriptiv analyse i dataanalyse-verktøyet. I deskriptiv analyse er det mulig å lese ut flere faktorer for den gitte kolonnen, men kun gjennomsnitt og standardavvik ble brukt i denne oppgaven. Det ble brukt T-test(Excel) for å se etter forskjeller i biofilm (målt som mg/cm²)

mellom anlegg. Om P-verdien var under 0,05, altså under 5% anses forskjellen som signifikant. P-verdien ble funnet i analyseverktøyet i Excel under: Variansanalyse: en faktor.

3. Resultater

Tabell 3: Vannparametere, Fôring og fiskemengde for alle anlegg. Før MBBR er prosessen før biofiltret. Etter MBBR betyr etter biofilteret.


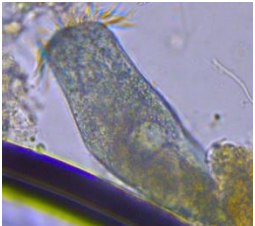
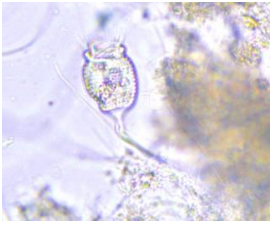



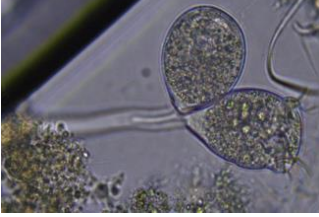
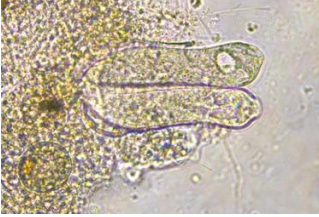

	Anlegg 1	Anlegg 2	Anlegg 3	Anlegg 4	Anlegg 5
Dato	09.03.16	30.03.16	30.03.16	30.03.16	30.03.16
Fôring (Kg/dag)	457,24	2500	1000	935	1100
Nytt vann l/min	Ca 500	106,45	310	820	1106
Antall fisk (tonn)	69,5	300	65	240	350
O2 %	90	90	91,2	99,4	90,7
Temp	5,3	6,6	11,9	6,6	6,3
pH	6,99	6,82	6,99	6,93	7,02
Sal ‰	4,0	0,0	0,0	4,2	11,0
Før MBBR					
NH ₄ ⁺ (Ammonium)	12,71		0,74	0,62	0,64
NO ₂ ⁻ -N (Nitritt)	0,00		0,55	0,36	1,00
Alk.	23,30		75	80	105
Etter MBBR					
NH ₄ ⁺	0,88	0,68	0,39		
NO ₂ -N	0,06	0,290	0,5		
NO ₃ -N (Nitrat)	8,4	19,7			

Tabell 3 viser de ulike parameterne for alle anleggene som ble undersøkt. I hovedsak gjaldt dette hva som ble tilført fiskekarene og biofilter effektiviteten. Fiskemengden strekker seg mellom 65 tonn og 300 tonn som kan vise stadiet i produksjon og/eller størrelsesforhold mellom anleggene. Ammonium etter MBBR er lav som betydde at biofilteret fungerte etter anleggets ønske. Blanke felt var data som bedriften ikke ønsket å dele eller ikke målte.

3.1 Organismene

Det ble funnet rikelige mengder av ciliater og flercellede dyr i biofiltrene fra alle anlegg . Det ble observert forskjellige sammensetninger av samfunn ved de forskjellige anleggene.

Ciliater

		
<i>Balantidium sp.</i> Størrelse: ca. 50 μm	<i>Stentor sp.</i> Størrelse: > 220 μm	<i>Vorticella sp.</i> Størrelse: ca. 80 μm
		
<i>Carchesium sp.</i> Kontrahert Størrelse: ca. 200 μm lang. Forskjellige størrelser.	<i>Suctorian sp.</i> Størrelse: ca. 225 μm	<i>Paramecium sp.</i> Størrelse: ca. 115 μm
		
<i>Epistylis sp.</i> Størrelse: ca. 90 μm	<i>Platycola sp.</i> Størrelse: ca. 120 μm	<i>Spirotrich sp.</i> Størrelse: ca. 40 μm

Figur 6: Noen av ciliatene som ble funnet i større antall på et/flere anlegg.

Av ciliater ble det funnet fastsittende og frittsvømmende (figur 6). Frittsvømmende som; Spirotrich, tøffedyr og Balantidium. Av de fastsittende; Stentor, Vorticella, Carchesium, Suctorian, Platycola og Epistylis. Størrelsesmessig var det noen variasjoner. På 400 x optikk,

ble det tatt gode bilder av objektene som ble studert. Stentor varierte fra 220 μm og oppover. Carchesium ca. 80 μm . Vorticella med størrelser mellom 80 μm - 120 μm . Sucotarian var ganske stor, 225 μm – 230 μm . De fritt svømmende ciliatene var små sammenlignet med de fastsittende. De varierte fra 40 μm – 115 μm .

Nematode



Størrelse: 250 μm

Nematode, størrelse på \pm 250 μm . Denne ble funnet mest hyppig på anlegg 4.

Bevegelsesmønsteret til denne arten gjorde det vanskelig å fastsi korrekt størrelse.

Hjuldyr



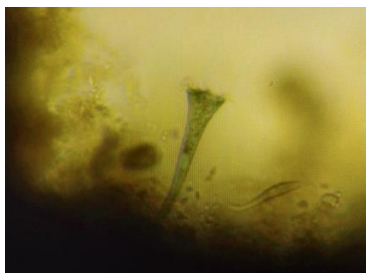
Rotifera sp.

Størrelse: >110 μm

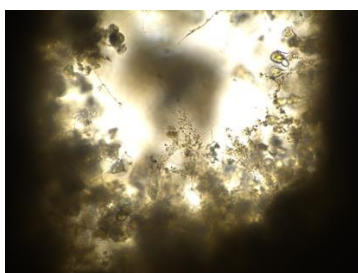
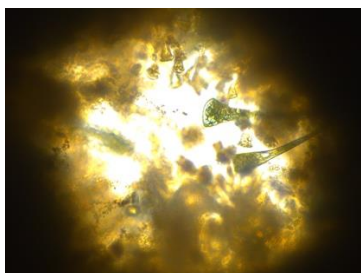
Hjuldyr. Størrelse på >110 . Denne ble funnet mest hyppig på anlegg 2.

Figur 7: Nematode og rotatorie fra de ulike anleggene.

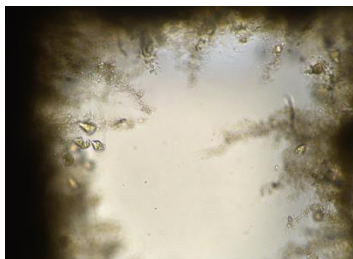
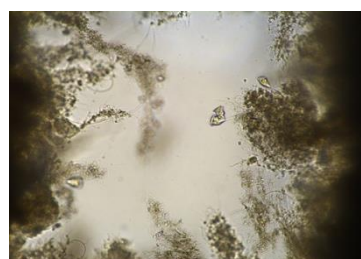
Anlegg 1:



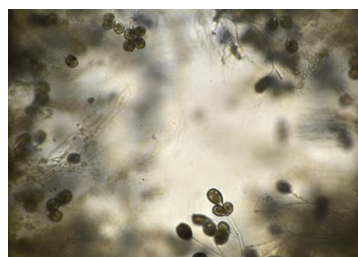
Anlegg 2



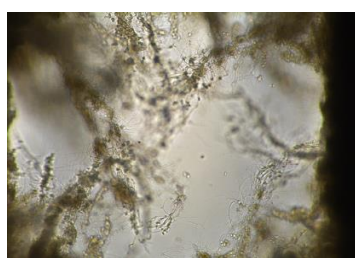
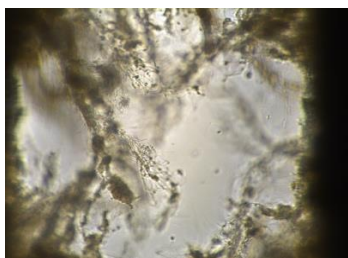
Anlegg 3



Anlegg 4



Anlegg 5



Figur 8: Bilder av urørte biologemer fra de ulike anleggene. Det er to bilder fra hvert anlegg.

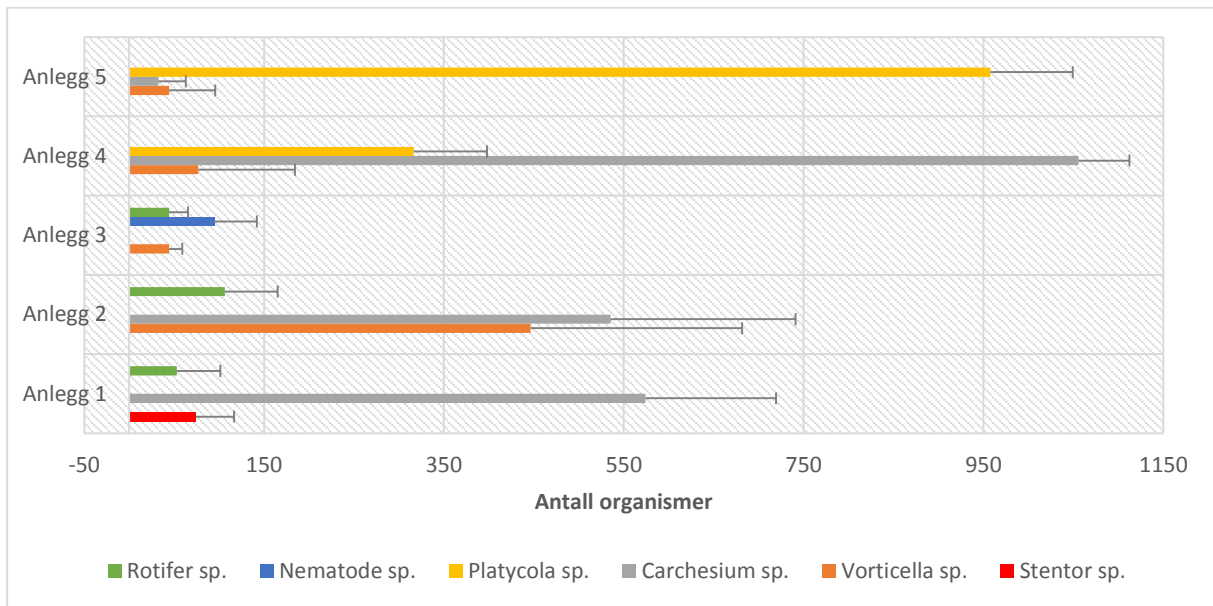
Bilder tatt fra ulike ubehandlet biolegemer (figur 8). I biofilm 1 ble det observert relativt mange Stentor, Carchesium og Rotifera (figur 6). Biofilm 2 viste et stort antall Vorticella, Carchesium og Rotifera. Biofilm 3 viste en relativt stor andel Nematode, Vorticella og Rotifera. Rotifera hadde en karakteristisk grønnfarge som lett kunne oppdages. Nematoden gjemte seg ofte litt lengre inn i veksten, det var derfor ikke så lett å få øye på denne fra dette perspektivet. Biofilm 4 består av en betydelig stor andel med Carchesium og Platycola. Carchesium er lett å se ut i fra oversiktsbildet. Biofilm 5 består for det beste av Platycola (Figur 7)

Tabell 4 Oversikt over organismene, og antallet på biolegemet. Tall er gitt antall pr. cm²

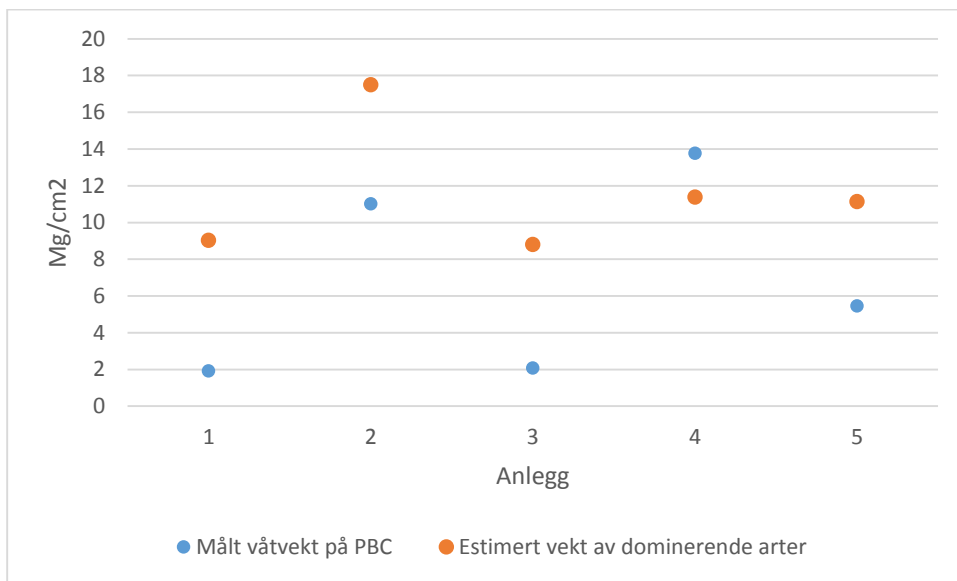
Navn	Anlegg 1	Anlegg 2	Anlegg 3	Anlegg 4	Anlegg 5
<i>Balantidium sp.</i>	19,06	26,61	0,00	0,00	14,78
Stentor <i>sp.</i>	74,14	44,35	0,00	0,00	0,00
Vorticella <i>sp.</i>	38,13	446,49	44,35	76,88	44,35
Carchesium <i>sp.</i>	574,07	535,20	14,78	1055,61	32,53
Sucotarian <i>sp.</i>	4,24	11,83	0,00	2,96	0,00
Paramecium <i>sp.</i>	2,12	5,91	0,00	0,00	11,83
Epistylis <i>sp.</i>	12,71	47,31	0,00	0,00	0,00
Platycola <i>sp.</i>	0,00	0,00	0,00	316,39	958,03
Spirotrich <i>sp.</i>	23,30	8,87	11,83	5,91	0,00
Nematode <i>sp.</i>	25,42	14,78	94,62	0,00	0,00
Rotifera <i>sp.</i>	52,96	106,45	44,35	0,00	0,00

Tabell 4 viser gjennomsnittlig antall organismer pr. cm²

Carchesium stakk seg mest ut på hele tre anlegg. Platycola var det mest av på anlegg 5, mens det var mest av Nematoder på anlegg 3. Det viser også en stor andel av fastsittende, fremfor fritt-svømmende.



Figur 9: De tre mest dominerende organismene i anlegg 1-5. Standardavvik er beregnet og kan ses på grafen. Det kommer tydelig frem at de fastsittende organismene dominerer.



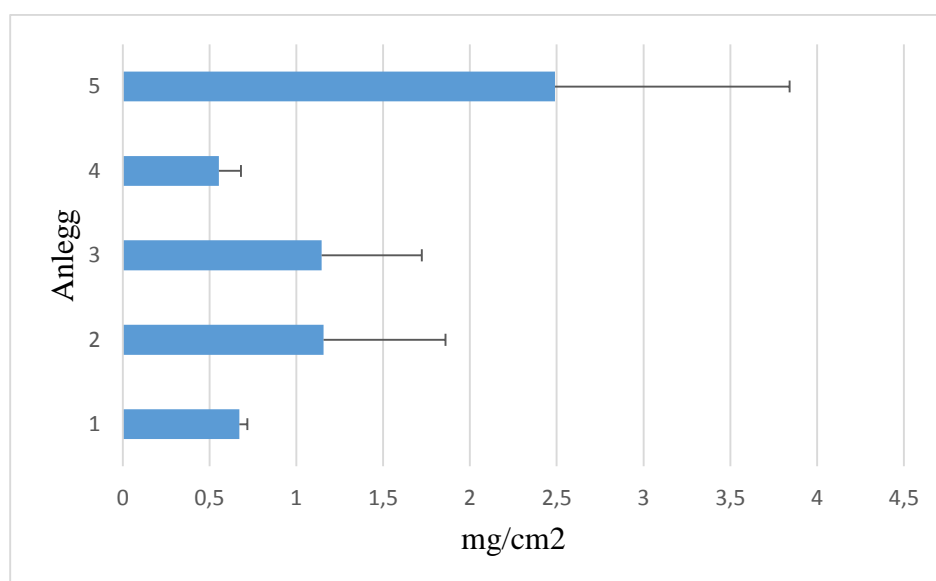
Figur 10: Antall gram organismer pr. m2 biolegeme. Utreget overflate til biolegeme i forhold til de forskjellige biofilterne. Utreget gjennomsnittlige verdier av vekt på de mest dominerende organismene i løpet av forsøket.

3.2 Vektanalyse

Tabell 5: Tørrvekt av biofilm på 10 chip fra hvert av de 5 anleggene i mg/cm².

Chip nr.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	Gj. Snitt.	Std. Avvik
A 1	0,674	0,711	0,703	0,745	0,678	0,641	0,628	0,583	0,678	0,674	0,671	0,045
A 2	0,164	2,2	0,948	0,94	0,99	2,582	0,922	0,903	0,943	0,982	1,157	0,7
A 3	1,223	1,723	1,479	2,097	1,542	0,514	0,58	1,227	0,498	0,573	1,146	0,575
A 4	0,519	0,519	0,538	0,368	0,425	0,538	0,576	0,607	0,838	0,616	0,554	0,125
A 5	2,71	1,56	3,35	3,3	3,68	0,75	4,94	2,31	1,04	1,25	2,489	1,352

Tørrvekten av biofilm, gitt i milligram, varierte mellom alle anleggene, tabell 5 figur 11. Av resultatene kom det fram at det var likheter og forskjeller mellom alle anleggene med unntak av anlegg 2, 3 og 1, 4 som viste relativt like verdier. Merk. Anlegg 1, 4 benyttet to forskjellige biologeme typer. Grunnlaget som gir uttrykk for forskjellene er gitt i vedlegg.

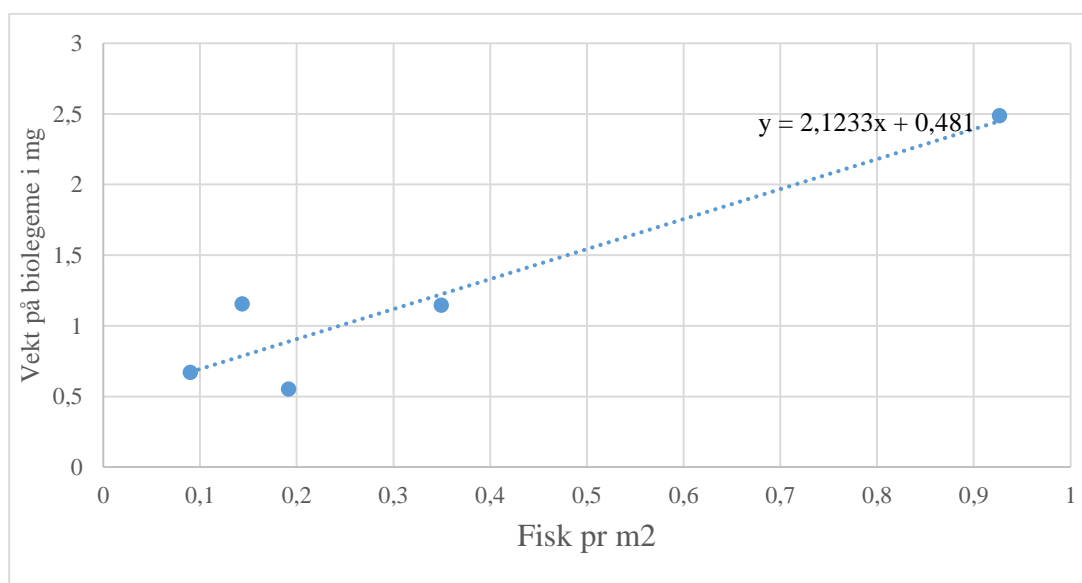


Figur 11: Tørrvekt av biofilm for 5 anlegg.

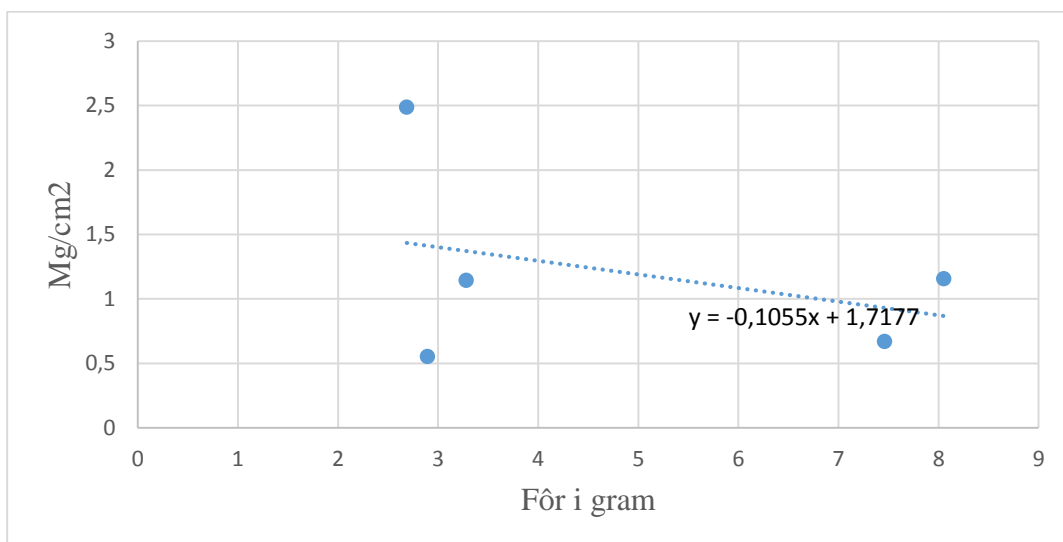
Anlegg 5 hadde høy påvekst samt en et høyt standardavvik, dette kom av et prøveresultat med mye høyere verdi enn de resterende 9. Anlegg 1 og 4 hadde lav vekst og lite standardavvik, altså mindre vekst pr cm² og nokså lik vekst blant alle prøvene. Tallene brukt i figur 11 er hentet fra tabell 5.

Tabell 6: Parvise sammenligninger av tørrvekt av biofilm fra de 5 anleggene viste at det ikke var signifikante forskjeller mellom anlegg 2 og 3. alle andre hadde signifikante forskjeller.

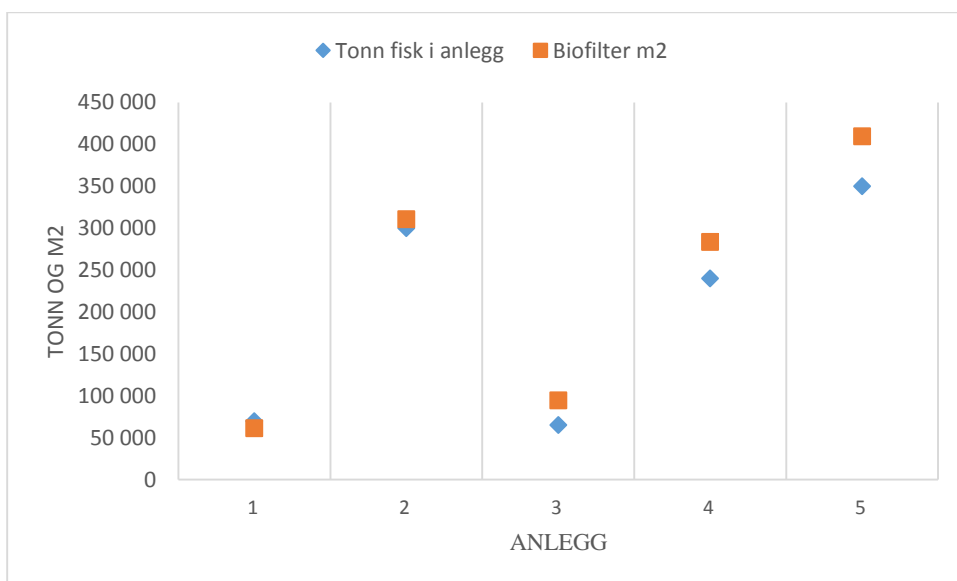
	1.	2.	3.	4.	5.
1.		P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05
2.	P < 0,05		P > 0,05	P < 0,05	P < 0,05
3.	P < 0,05	P > 0,05		P < 0,05	P < 0,05
4.	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05		P < 0,05
5.	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05	



Figur 12: Figuren viser forholdet mellom påvekst på biogeme og kilo fisk pr kvadratmeter biofilter. Verdi



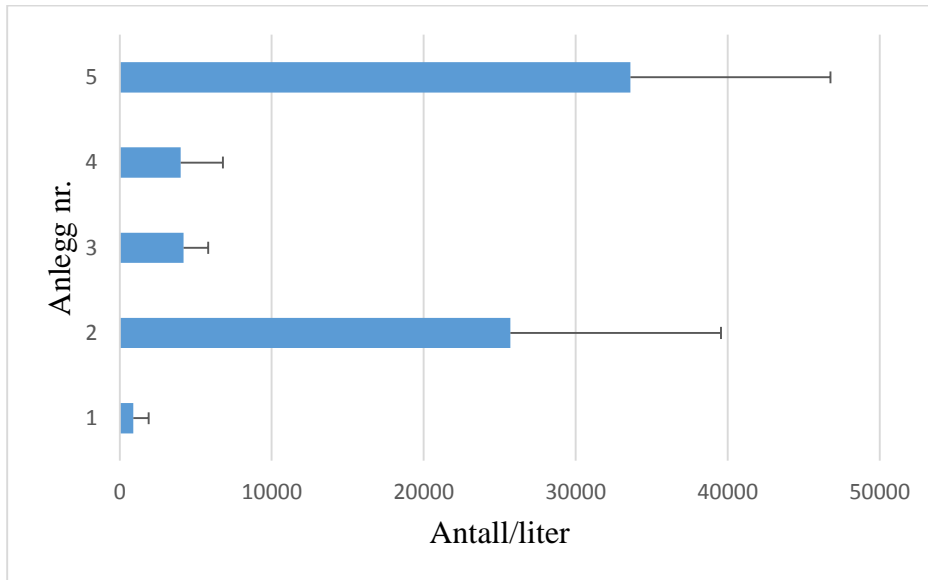
Figur 13: Figuren viser sammenhengen mellom fôring og påvekst.



Figur 14: Tallene viser hvordan forholdet er mellom total beskyttelse i biofilter og kg fisk i anlegg.

3.3 Organismer i vann.

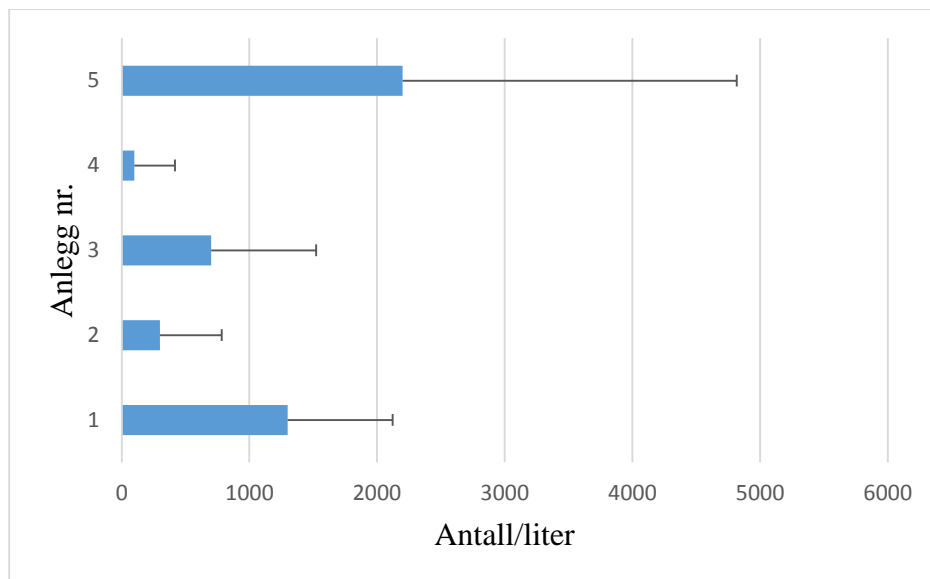
Biofilter



Figur 15: Antall frittsvømmende organismer i biofilter.

Av observasjonene av antall mikroorganismer i sirkulerende kom det fram at det var stort antall av frittsvømmende mikroorganismer i anlegg 2 og 5 og færre organismer i sirkulerende vann i anlegg 1, 3 og 4. Anleggene med relativt få observasjoner hadde mindre standardavvik enn anleggene med forholdsvis større mengder.

Kar



Figur 16: Antall frittsvømmende organismer i fiskekar.

Av observasjonene kom det fram at det var store forskjeller mellom anleggene. Flere av mikroorganismene som ble observert i karet var av samme sort som de som ble observert i biofilteret. Anlegg 5 hadde det største antallet av frittsvømmende mikroorganismer. Anlegg 4 og 2 hadde en relativ lav andel av frittsvømmende mikroorganismer, mens anlegg 1 og 3 hadde et mer gjennomsnittlig antall med frittsvømmende mikroorganismer. Alle anleggene hadde store standardavvik som vil si at det var store forskjeller mellom prøvene.

Frittsvømmende organismer i biofilter.

Tabell 7: Signifikansmodell, Gitt verdier under 0,05 er signifikante.

	1	2	3	4	5
1		P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05
2	P < 0,05		P < 0,05	P < 0,05	P > 0,05
3	P < 0,05	P < 0,05		P > 0,05	P < 0,05
4	P < 0,05	P < 0,05	P > 0,05		P < 0,05
5	P < 0,05	P > 0,05	P < 0,05	P < 0,05	

Flere av de parvise sammenligningene var ikke signifikante (2 av 10).

Frittstående organismer i kar.

Tabell 8: Signifikansmodell, Gitt verdier under 0,05 er signifikante.

	1	2	3	4	5
1		P < 0,05	P > 0,05	P < 0,05	P > 0,05
2	P < 0,05		P > 0,05	P > 0,05	P < 0,05
3	P > 0,05	P > 0,05		P < 0,05	P > 0,05
4	P < 0,05	P > 0,05	P < 0,05		P < 0,05
5	P > 0,05	P < 0,05	P > 0,05	P < 0,05	

Flere av de parvise sammenligningene ikke var signifikante (5 av 10).

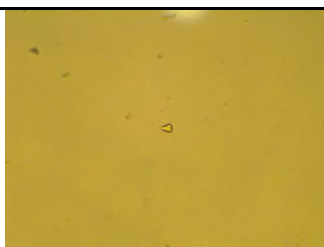
Under observasjonene ble det funnet flere typer arter som gikk igjen i alle anleggene. Flere av disse artene ble også funnet i biogemet nevnt i 3.1. Forekomsten varierte mellom alle anleggene.

Tabell 9

	Biofilter	Kar
Anlegg 1	Flest <i>Paramecium sp</i>	Flest <i>Carchesium sp</i>
Anlegg 2	Flere <i>Vorticella sp.</i>	Flere objekter
Anlegg 3	Flere <i>Nematoder sp.</i>	<i>Paramecium, Nematode</i>
Anlegg 4	<i>Rotifera sp</i> observert	Lite liv
Anlegg 5	Flere, mindre <i>Paramecium sp, Flere partikler</i>	<i>Paramecium sp, Nematode sp</i>

CiliaterTøffeldyr: *Paramecium sp*

Optikk: 10 x

*Vorticella sp*

Optikk: 10 x

*Rotifera sp.*

Optikk 40x

Nematode*Nematode sp*

Optikk: 40 x

Figur 17: Ciliater og Nematode observert.

Artene som ble observert under vannanalysen besto i hovedsakelig av artene vist i figur 17 i forskjellige mengder. Under observasjonene ble det også notert hvorvidt det var noe som gikk igjen eller om det var unormalt flere av en art i forhold til de andre. Anlegg 3 hadde høyest antall med *nematoder sp.* i prøvematerialet. Anlegg 2 hadde størst andel av *Vorticella sp.* i prøvematerialet. Anlegg 2 og 5 hadde størst andel av partikler i prøvematerialet.

4. Diskusjon

4.1 Materiale og metoder

Anleggene som ble benyttet i dette forsøket hadde store forskjeller i drift, noe som gir ulike forutsetninger for vekst på biofilteret. Det var stor spredning i, pH, levetid på Biofilteret, fôring, antall fisk og salinitet (0 ‰ til 11 ‰). To av anleggene (1 og 2) brukte et biofilter som hadde lang levetid, de var godt begrodd og fungerte etter forholdene bra. De resterende tre anleggene praktiserte desinfisering av hvert anlegg etter utsett. Dette minsket faren for overføring av smitte, og andre potensielle farer. Det store minuset med denne metoden var at biofilteret måtte bygges opp på nytt, og dette tar tid. Det kan ta opptil flere måneder å få et velfungerende system med bakterier (Pers. Komm. Stig Tuene, Runar Pedersen)

Undersøkelsen og observasjonen av organismene ble gjort på en spesifikk metode. Med skrapemetoden ble det skrapet av mest mulig uten å ødelegge prøvematerialet. Det krevde en god del øvelse før metoden ble såpass inndrillet at forsøket ble gjennomførbart. Det er vanskelig å si at resultatet er 100 % riktig, fordi det er så mange variabler som spiller inn; Begroinga på biologemene var ulik, derfor fikk en ulik materiale å analysere i mikroskopet. Noen ganger var det relativt store klaser med begroing. Denne kunne inneholde organismer og bakterier. Siden det ble brukt mye tid på øving, ble det allikevel så oversiktlig fra mikroskopet at det ikke var noen hindring.

For å kontrollere resultatene fra det observerte materialet via mikroskopet, ble det tatt kontrolltester med ubehandlet biologeme (Figur 8). Disse bildene ble tatt for å bekrefte/avkrefte om det som ble skrapet av og telt, kunne stemme overens med hva som ble sett ubehandlet. Bildene som ble tatt fra et oversiktlig perspektiv, viste at resultatene som ble funnet ved skrapemetoden stemmer rimelig bra.

Vet undersøkele av fritsvømmende organismer var mikroorganismene godt synlig i lupe, men mikroorganismer med høy egenbevegelse var vanskeligere å identifisere. Spesielt *Paramecium* sp. aldri stod stille. Lugol ble utprøvd for å drepe mikroorganismene, men det viste seg at lugolen gjorde det vanskelig å observere organismene igjen.

Sett i sammenheng med tørrvekten som beskrevet i 3.2.1 var differansen mellom våt vekt og tørrvekt stor og i noen tilfeller unaturlig stor, spesielt mellom våtvekten og tørrvekten til anlegg 4 hvor tørrvekten var 20 ganger lettere enn våtvekten. Standardavvikene var også store. Det er rom for å sette spørsmål rundt metoden for tørkemethoden av biolegemet, og vil være en oppgave for fremtiden for å finne en riktigere metode.

Anlegget med lavest tørrvekt hadde den høyeste andelen med dominerende arter i våt vekt (figur 10). En vekt som faktisk var høyere enn selve vekten av våt vekt. Tallene talte for seg og det kan settes spørsmål om metodene har vært riktige i vektanalysen av artene eller vekt analysen av våtvekten. Men selv om anlegg 4 gav unormale tall viste de anleggene til at de dominerende artene hadde en lavere vekt enn våtvekten. Disse resultatene sa at anlegg 2 og 5 hadde høyere enn 50% av våtvekten til dominerende arter mens anlegg 1 og 3 hadde lavere enn 50% av våtvekten til dominerende arter.

Sammenhengen mellom organismer på biolegemene og organismer i de frie vannmasser ble på mange måter vanskelig å avgjøre med tanke på det faktum at artene ikke ble identifisert på samme måte i vannanalysen. I en framtidig oppgave vil det være interessant å kvantifisere de ulike artene i vannmassene.

4.2 Resultater

Det ble tatt fem prøver fra hvert anlegg, og prøvene ble tatt mellom 9. februar og 30. mars. Alle anleggene hadde forskjellige vannkvaliteter hvor pH, salinitet, temperatur, ammonium og organisk materiale sikkert spilte en stor rolle for mikrofaunaen. I løpet av forsket ble det observert mange ulike protozoa og metazoa, noe som ikke er publisert for laksefisk eller for RAS i Norge. Disse organismene er nedbrytere i et komplekst samfunnet, og dette samfunnet eksisterer så vel i biofilteret som i fiskekarene (20).

For å diskutere resultatene må det være noe å diskutere mot, men i dette tilfelle finnes det lite tilgjengelig forskning. Aktører som drifter RAS- anlegg med Atlantisk Laks, fokuserer mest på de nitrifiserende bakteriene fremfor kartlegging av organismer. En kan dog trekke paralleller med et konvensjonelt renseanlegg for vann, der det finnes rikelig med forskning, men antall arter, mengden individuelt er langt større enn det som ble gjort i vårt forsøk. Forskning har kommet frem til at det finnes metoder som kan si noe om kartlegging og bestemmelse av vannkvalitet (18, 20). I følge resultatene som ble funnet i dette forsøket, stemmer det ikke helt overens. For eksempel ble det nevnt at et anlegg med en lang driftstid uten intervensjon, har blant annet størst andel av Nematoder. Andre arter er også selvfølgelig å finne, men det er typisk at Nematodene trives i disse omgivelsene. Resultatet fra dette forsøket viste ikke det samme, tvert imot. Det var en absolutt stor andel av Nematode i Anlegg 3. Disse anleggene har som tidligere nevnt, kort levetid. Driftslederne i disse anleggene har vektlagt desinfeksjon etter endt utsett, dette gjør at økosystemene ikke har lang tid til å sette seg, derfor vil driftstiden være relativt kort. *Platycola* og *Carchesium* dominerte for det meste i anlegg 1,2,4 og 5. Ut i fra filmer og forskning som ble undersøkt, var disse sjeldent rapportert. Dette kan ha sammenheng med at det er to vidt forskjellige kategorier. Fra tidligere forsøk ved vannbehandling, viste deg seg at det var mulig å forutsi vannkvaliteten ved å se på hvilke organismer som befinner seg i systemet (18, 22). I forsøket som ble gjort ved NTNU i Ålesund, ble fastsittende ciliater den typen som ble registrert med størst hyppighet. Ved sammenligning skal det da være en liten tilførsel av organisk materiale, noe som kan stemme.

Av resultatene kom det fram at det var ulik vekst på biolegemene for alle anleggene som ble testet. Det viste seg at det var ulike typer biolegemer som ble benyttet innenfor de forskjellige anleggene, og av intervju med ledere kom det fram at levetiden for biolegemene samt saliniteten i de ulike biofiltrene spanner fra 1-7 år, og 0-11‰. Med disse verdiene var det trygt å anslå på forhånd at det var store utslag av vekt på biolegemene i de ulike anleggene.

For biofilteret var det markante forskjeller mellom anlegg 2, 5 og 1, 3, 4 hvor de første hadde mye større antall med mikroorganismer enn de resterende. Dette kunne vise til at det var høy mikrobiologisk aktivitet i biofilteret for de aktuelle anleggene. Spesielt mellom anleggene med høye verdier var det ulik flora hvor anlegg to hadde flere av arten *Vorticella sp* og anlegg fem hadde flere mindre mikroorganismer som kunne minne om en *Paramecium sp* art, artene vist i figur 17. De resterende anleggene hadde færre registrerte arter som vist i figur 16, men med andre observasjoner det ble observert flere *Paramecium sp* i anlegg 1, *Nematode sp* i anlegg 3 og *Rotifera sp* i anlegg 4, artene vist i figur 17. De forskjellige observasjonene viste at det var forskjeller på miljøet i vannet ettersom det var stor spredning mellom dominante arter. Selv med varierte resultater var det store standardavvik. Under slike omstendigheter ville det i framtiden være nødvendig å gjennomføre flere målinger for et sikrere estimat

Først og fremst ble det vist at det var flest fastsittende organismer på biolegemene. Det var kun ved anlegg tre at det er en større andel av de frittlevende. Figur 8 viste at biolegemet var ganske begrodd på anlegg 2, og dette kan ha en sammenheng med en langvarig brukstid (7 år).

Resultatmessig ut i fra mg/cm^2 kom det fram at det var ulik snittvekt mellom alle anleggene. Av disse resultatene kom det fram at det var nokså lik snittvekt mellom de fire første anleggene og ett anlegg som skilte seg ut med over dobbelt så store verdier. Rent produksjonsmessig kom det fram at anlegg fem hadde størst salinitet med 11‰. Promillen kan være en faktor som påvirker total vekst fordi noen arter trives bedre i klima med høyere salinitet.

Av resultatet kom det fram i figur 12 at vekten på biolegemet sett mot vekten av fisken i kg. pr. kvadratmeter hadde stor sammenheng med hverandre. Anlegg 5 som totalt sett hadde størst vekt på biolegemet hadde også desidert høyest biomasse fisk pr. flate kvadratmeter i biofilteret. Dette kan antyde at det er større bakteriell flora, eller på grunn av saltholdighet fordi det er vanskelig å kontrollere. Høy flora av bakterier antyder at det var føde for bakteriene som igjen kan indikere at det var høye verdier av blant annet ammonium (15). De resterende resultatene ble sentrert sammen i et lavere sikt, men dette kom av at resultatene var relativt like.

Anlegget med lavest fôring hadde høyest vekt på biolegemet, og anleggene med høyest fôring hadde lavere vekt på biolegemet pr kvadrat milligram. Det var mulig å tolke grafen dithen at til mer fôr som blir gitt, desto mindre veier biolegemet. Resultatene som ble hentet fra grafen er vanskelige å tolke, spesielt med tanke på at kurven i en «normal» situasjon mest sannsynlig ville gått motsatt vei.

Det kom fram at det var gode vekstvilkår for mikroorganismene gitt i at gram pr kubikkmeter hadde en høyere verdi enn milligram pr kubikk centimeter. Av teorien (19, 21) vises det til at protozoa livnærte seg av fôrrester og andre bakterier. Gitt i den store fôrmengden er det grunn til å tro at ciliatene har rikelig tilgang til energi selv om mye av maten vil bli spist av fisken og omgjort til ekskrementer.

Resultatene ble flettet inn som en ekstra undersøkelse i oppgaven med tanke på hvordan mikroorganismene livnærer seg. Dersom Fôrmengden hadde vært mindre enn vekten av mikroorganismer kunne det indikert at mikroorganismene livnærte seg på bakteriene i biolegemet som igjen ville satt ned den nitrifiserende prosessen.

Det viste seg at antall kilo fisk i anlegget og total biofilter-overflate hadde en klar sammenheng. Dette viser til at anleggene legger opp sin produksjon i forhold til hva biofilteret kan tolerere. I slike tilfeller er det viktig at anlegget vet hvor mye fyllingsgraden er i deres biofilter med tanke på at potensiell lekkasje av biolegeme kan føre til store forandringer på den virksomme flaten.

Av resultatene kom det fram at det var store forskjeller mellom anleggene med varierende andel arter. Fra teorien er det gitt at UV behandling dreper all mikroorganismer, som kunne tyde på at det var mindre liv i karet enn i biofilteret (6). Dette viste seg å stemme til dels med de faktiske resultatene som ble undersøkt. Av alle prøvene som ble observert minsket alle resultatene med 80-99% med unntak av anlegg en som steg med 40%. Det siste anlegget hadde kanskje UV- problemer, men det er sannsynlig at organismer finnes på alle flater i anlegget, og reproducerer der i tillegg til i biofiltret.

Ut i fra forsøkene kom det frem interessante resultater som kan påvise at organismer som ikke er bakterier, men lever i samme mikrofauna, kan spille en viktig rolle. En kan for det første anslå hvilke kvaliteter det er i vannet ved å sammenligne art og antall, og for det andre kan en anslå hvordan kvaliteten kan justeres ved å se på hvilke organismer som lever i faunaen. I fremtiden kan dette være en metodikk som blir innført i settefiskanleggene for måle biofilterets helsetilstand. Biofilteret får i dag relativt liten ettertanke av lederne på anleggene. Så lenge nitrifikasjonen med hjelp av bakterier fungerer, er driftslederne fornøyde, men en kunne ønske mer innsats for å forske videre på det komplekse biologiske systemet et biofilter er. Allikevel er det et interessant felt, med et stort potensialet innen kvalitetssikringsarbeid for å forbedre resultatene i fremtiden.

5. Litteraturliste

1. **FAO.** World review of fisheries and aquaculture. *Food and Agriculture of the United Nations*. [Online] 2014. <http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf>.
2. **Aandahl, P.** Laks og ørret fo 50 milliarder i 2015. *Sjømat Norge*. [Online] 2016. <http://www.seafood.no/Nyheter-og-media/Nyhetsarkiv/Pressemeldinger/Laks-og-ørret-for-50-milliarder-i-2015>.
3. **Torrissen, O.** Forsking for verdiskapning. *Havforskningsinstituttet (IMR)*. [Online] Mars 2008. https://www.imr.no/filarkiv/2008/01/2008-3_hi-rapp_pdf_til_web.pdf/nb-no.
4. **Sunnset, B.** Havforskningsinstituttet (IMR). *Lus og rømming gir redusert bærekraft*. [Online] Oktober 3, 2011. http://www.imr.no/nyhetsarkiv/2011/oktober/lus_og_romming_gir_reduisert_berekraft/nb-no.
5. **Kittelsen, A, et al.** Nofima. *Tilgjengelige ferskvannsressurser til fremtidig produksjon av settefisk av laks og ørret*. [Online] 5 2006. http://www.nofima.no/filearchive/tilgjengelige-ferskvannsressurser_resirkrapport-arne.pdf.
6. **Bjerkestad, B, Bolstad, T and Hansen, S-J.** *Akvakultur - Havbruk i Norge*. 2. utgave. Drammen : Vett og Viten AS, 2013. Vol. 2013.
7. **Gebauer, R, et al.** *Oppdretts Teknologi, Vannkvalitet og vannbehandling i lukkede oppdrettsanlegg*. Trondheim : Tapir Akademiske Forlag, 2005. ISBN 82-519-2027-2.
8. **Rijn, J.** *Potential for intergrated biological treatment systems in recirculating fish culture-A review*. 1-2, s.l. : Aquaculture, 1996, Vol. 139.
9. **Akva Group.** Resirkulering. *Akva Group*. [Online] <http://www.akvagroup.com/produkter/landbasert-akvakultur/resirkulering>.
10. **Interdonato, F.** Recirculating aquaculture system (RAS). Biofilters focusing on bacterial communities complexity and activity. PhD thesis. *Archimer*. [Online] 2007. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00074/18516/16060.pdf>.
11. **SINTEF, Nofima, NTNU, Wageningen University, DLO-Imares.** Deliverable D8.3, Biofiltration model Including Validation. *Aquaexcel*. [Online] Desember 2014. http://www.aquaexcel.eu/images/Deliverables_2015/aquaexcel_d8.3.pdf.
12. **Rusten, B, et al.** *Design and operation of the Kaldnes moving bed biofilm reactors*. Oslo : Aquateam-Norwegian Water Technology Center, SINTEF Water and Enviroment, Biodesing, 2005.

13. **Randall, D and Wright, P.** *Ammonia distribution and excretion in fish*. Department of Zoology, University of British Columbia. Amsterdam : Fish Physiology and Biochemistry, Volume 3 No. 3, 1987. pp. 107-120.
14. **Michaud, L.** Microbial communities of recirculating aquaculture facilities: interaction between heterotrophic and autotrophic bacteria and the system itself, Thesis. *Archimer*. [Online] 2007. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/2682/>.
15. **Egli, K.** *On the use of anammox in treating ammonium-rich wastewater*. Zürich : Swiss Federal Institute Of Technology Zürich, 2003. DISS. ETH NO. 14886.
16. **Martinez-Cordoda, L, et al.** *Microbial-based systems for aquaculture of fish and shrimp: An updated review*. 2, s.l. : Reviews in Aquaculture, 2015, Vol. 7.
17. **Hågvar, E.** *Det zoologiske mangfoldet*. Oslo : Universitetsforlaget, 1998. 978-82-00-12739-0.
18. **Ginoris, Y.P, et al.** *Recognition of protozoa and metazoa using image analysis tools, discriminant analysis, neural networks and decisions trees*. Portugal : Analytica Chimica Acta, 2007. pp. 160-169.
19. **Awal, S og Campobasso, M.** *A study of biofilm ecology, development and dynamics in a recirculating aquaculture system as a possible vector for fish disease*. 2, Victoria, Australia : Trends in Fisheries Research, 2015, Vol. 4. 2319-474X (p); 2319-4758 (e).
20. **Dhunpath, K.** Presence of protozoa and metazoa in activated sludge during favourable and unfavourable conditions. *Ewisa*. [Online] <http://www.ewisa.co.za/literature/files/457%20Dunpath.pdf>.
21. **Grady, C, G, P, et al.** *Biological Wastewater Treatment, 3. edition*. Boca Raton : IWA publishing, 2011.
22. **Fossiner, W and Berger, H.** A user-friendly guide to the ciliates (Protozoa, Ciliophora) commonly used by hydrobiologists as bioindicators in rivers, lakes and waste waters, with notes on their ecology. *Freshwater Biology*. s.l. : Freshwater Biology, 1996, Vol. 35, pp. 375-482.
23. **Tveten, A.** *Biofilmer, Mikrobiell Økologi*. Ålesund : NTNU Ålesund, Biologisk Avdeling, 2016.

6. Vedlegg

6.1 Ulike vekter i gram pr biogeme

Tørrvekt
Anlegg 1, 4‰

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Gj. Snitt.
X	0,035	0,390	0,366	0,359	0,380	0,389	0,374	0,388	0,361	0,359	0,372
Y	0,337	0,373	0,349	0,341	0,364	0,374	0,359	0,373	0,345	0,342	0,356
Forhold	0,016	0,017	0,017	0,018	0,016	0,015	0,015	0,014	0,016	0,016	0,016

X = Tørket Anox K5, Y = Anox K5 uten vekst.

Alle enheter gitt i gram pr biogeme.

Anlegg 2, 0‰

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Gj. Snitt.
X	1,116	1,217	1,068	1,227	1,175	1,327	1,074	1,351	1,072	0,078	1,141
Y	1,105	1,067	1,003	1,163	1,107	1,151	1,011	1,289	1,008	0,721	1,062
Forhold	0,011	0,15	0,064	0,064	0,067	0,176	0,062	0,061	0,064	0,067	0,078

X = Tørket BiofilmChip P, Y = BiofilmChip P uten vekst.

Alle enheter gitt i gram pr biogeme.

Anlegg 3, 0‰

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Gj. Snitt.
X	1,161	1,168	1,06	1,057	1,05	1,168	1,054	1,224	1,214	1,268	1,142
Y	1,078	1,05	0,959	0,914	0,944	1,133	1,015	1,14	1,18	1,229	1,064
Forhold	0,083	0,117	0,1	0,143	0,105	0,035	0,039	0,083	0,034	0,039	0,078

X = Tørket BiofilmChip P, Y = BiofilmChip P uten vekst.

Alle enheter gitt i gram pr biogeme.

Anlegg 4, 4,2‰

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Gj. Snitt.
X	0,998	1,238	0,94	0,902	1,105	0,977	0,886	1,110	0,849	1,009	1,001
Y	0,962	1,203	0,903	0,877	1,076	0,94	0,847	1,068	0,792	0,967	0,964
Forhold	0,035	0,035	0,036	0,025	0,029	0,036	0,039	0,041	0,057	0,042	0,037

X = Tørket BiofilmChip P, Y = BiofilmChip P uten vekst.

Alle enheter gitt i gram pr biolegeme.

Anlegg 5, 11‰

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Gj. Snitt.
X	1,532	1,376	1,588	1,403	1,515	1,322	1,376	1,275	1,447	1,173	1,401
Y	1,347	1,27	1,36	1,178	1,264	0,985	1,219	1,204	1,361	1,122	1,231
Forhold	0,184	0,106	0,228	0,224	0,251	0,336	0,151	0,071	0,085	0,05	0,169

X = Tørket BiofilmChip P, Y = BiofilmChip P uten vekst.

Enheter i antall gram pr biolegeme.

Våtvekt:

Våtvekt pr biolegeme	0,2185 g/cm ²	1,1932 g/cm ²	0,60108 g/cm ²	0,77612 g/cm ²	0,75923 g/cm ²
/24,169 på anlegg 1 og 68,18 på anlegg 2 -5	0,0090 mg/cm ²	0,0175 mg/cm ²	0,0088 mg/cm ²	0,0113 mg/cm ²	0,0111 mg/cm ²
*1000 = Våtvekt	9,040506 g/cm ²	17,50048 g/cm ²	8,816075 g/cm ²	11,3834 g/cm ²	11,1356 g/cm ²

6.2 Antall organismer pr liter vann.

Anlegg 1, 4‰

Toalt pr liter	Biofilter, 1‰	
1.	2 000	
2.	2 000	
3.	0	
4.	0	
5.	0	
6.	0	
7.	2 000	
8.	2 000	
9.	1 000	
10.	0	
Gj. Snitt	900	Organismer pr liter

Toalt pr liter	Kar, 1‰	
1.	1 000	
2.	3 000	
3.	1 000	
4.	1 000	
5.	1 000	
6.	1 000	
7.	2 000	
8.	1 000	
9.	2 000	
10.	0	
Gj. Snitt	1 300	Organismer pr liter

Anlegg 2, 0‰

Toalt pr liter	Biofilter 0‰	
1.	19 000	
2.	56 000	
3.	42 000	
4.	33 000	
5.	20 000	
6.	21 000	
7.	15 000	
8.	22 000	
9.	12 000	
10.	17 000	
Gj. Snitt	25 700	Organismer pr liter

Toalt pr liter	Kar 0‰	
1.	1 000	
2.	1 000	
3.	0	
4.	1 000	
5.	0	
6.	0	
7.	0	
8.	0	
9.	0	
10.	0	
Gj. Snitt	300	Organismer pr liter

Anlegg 3, 0‰

Toalt pr liter	Biofilter 0‰	
1.	5 000	
2.	6 000	
3.	5 000	
4.	6 000	
5.	4 000	
6.	4 000	
7.	5 000	
8.	4 000	
9.	2 000	
10.	1 000	
Gj. Snitt	4 200	Organismer pr liter

Toalt pr liter	Kar 0‰	
1.	0	
2.	0	
3.	2 000	
4.	0	
5.	0	
6.	0	
7.	1 000	
8.	1 000	
9.	2 000	
10.	1 000	
Gj. Snitt	700	Organismer pr liter

Anlegg 4, 4,2‰

Toalt pr liter	Biofilter 10‰	
1.	6 000	
2.	1 000	
3.	7 000	
4.	2 000	
5.	10 000	
6.	3 000	
7.	2 000	
8.	8 000	
9.	3 000	
10.	3 000	
Gj. Snitt	4 000	Organismer pr liter

Toalt pr liter	Kar 10 ‰	
1.	0	
2.	1 000	
3.	0	
4.	0	
5.	0	
6.	0	
7.	0	
8.	0	
9.	0	
10.	0	
Gj. Snitt	100	Organismer pr liter

Anlegg 5. 11‰

Toalt pr liter	Biofilter 5‰	
1.	13 000	
2.	30 000	
3.	23 000	
4.	31 000	
5.	28 000	
6.	54 000	
7.	38 000	
8.	56 000	
9.	28 000	
10.	35 000	
Gj. Snitt	33 600	Organismer pr liter

Toalt pr liter	Kar 5‰	
1.	1 000	
2.	1 000	
3.	1 000	
4.	2 000	
5.	9 000	
6.	3 000	
7.	3 000	
8.	0	
9.	0	
10.	2 000	
Gj. Snitt	2 200	Organismer pr liter