

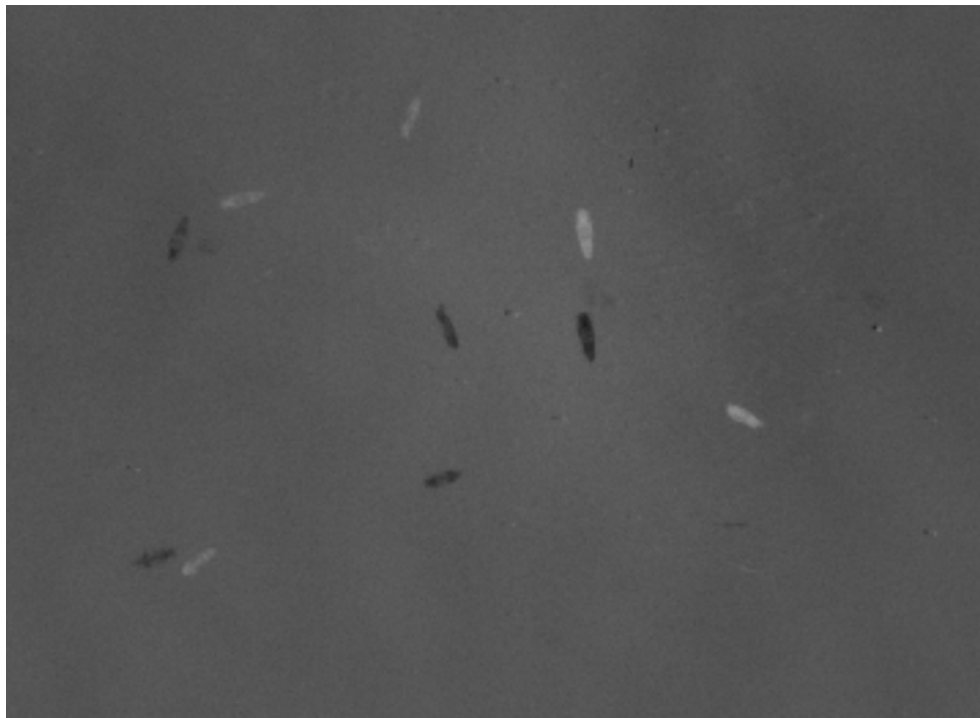
Rapport

Ultralyd mot lakselus: Kontrollert testing av effekt direkte på lakselus

Forfatter(e)

Torfinn Solvang-Garten

Andreas Hagemann, Eirik Svendsen



Rapport

Ultralyd mot lakselus: Kontrollert testing av effekt direkte på lakselus

EMNEORD:Lakselus, ultralyd,
akustikk**RAPPORTNR**

A28013

VERSJON

0.3

DATO

2016-12-22

FORFATTER(E)Torfinn Solvang-Garten
Andreas Hagemann, Eirik Svendsen**OPPDRAGSGIVER(E)**

Fiskeri- og Havbruksnæringens Forskningsfond FHF

OPPDRAGSGIVERS REF.

Kjell Maroni

ANTALL SIDER OG VEDLEGG:

32+ vedlegg

GRADERING

Unrestricted

GRADERING DENNE SIDE

Unrestricted

ISBN

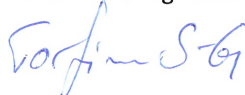
978-82-14-06209-0

SAMMENDRAG

(Se neste side)

UTARBEIDET AV

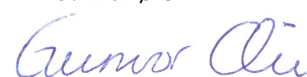
Torfinn Solvang-Garten

**KONTROLLERT AV**

Morten Omholt Alver

**GODKJENT AV**

Gunvor Øie



Sammendrag

Lakselus koster norsk oppdrettsnæringen milliarder årlig. For å kunne håndtere dette problemet må næringen skifte fokus fra behandling til forebygging (Iversen et. al, 2015). Bruk av akustikk (lyd og ultralyd) er foreslått som et tiltak mot lakselus. Formålet med dette prosjektet var å undersøke effekten av bruk av lyd (20-20kHz) og ultralyd (> 20kHz) på nauplier, kopepoditter og eggstrenger av lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) for å finne ut om teknologien kan benyttes for å hindre påslag av lakselus. Prosjektet ble delt opp i følgende oppgaver:

1: Undersøke morfologiske og fysiologiske effekter av utvalgte frekvenser av lyd og ultralyd på frittlevende stadier og eggstrenger av L. salmonis. Frekvenser fra 6 kHz til 54 kHz ble benyttet med lydtrykk fra 134 til 185 dB (re 1 μ Pa). Forsøkene ble gjennomført på levende lus i ulike stadier samt på eggstrenger. Lakselusa ble plassert i petriskåler og eksponert for ulike lydfrekvenser, hvorpå overlevelse og morfologiske endringer ble dokumentert via mikroskop. Eggstrenger ble etter eksponering fotografert og overført til en klekkerigg for klekking. Morfologi, klekkerate og utviklingssuksess til kopepodittstadiet ble dokumentert.

2: Undersøke effekten av lyd og ultralyd på atferd hos kopepoditter av L. salmonis

Forsøk ble gjennomført i en forsøksrigg hvor kopepoditter ble stimulert til å bevege seg i en bestemt retning basert på positiv fototaksis. Det ble her undersøkt om lyd og ultralyd (6 kHz - 54 kHz) hadde en effekt på den naturlige, fototaksiske atferden.

Det ble ikke påvist noen nevneverdig effekt av de benyttede lydfrekvensene i hverken oppgave 1 eller 2. Funnene gjort her antyder at akustiske lydbølger med bølgelengder mellom ca. 3 og 25 cm (54 til 6 kHz i saltvann) ikke påvirker eggstrenger av lakselus, eller lus i nauplie- og kopepodittstadiene, hverken morfologisk, eller på naturlig fototaksis.

I tillegg er det tilslutt i rapporten gjort en teoretisk vurdering av bruk av kavitasjon mot lakselus, samt hvordan kavitasjon eventuelt kan testes i eksisterende avlusingsutstyr som Hydrolicer-konseptet.

Abstract

Salmon lice cost the aquaculture industry billions each year. In order to handle this issue, the industry must change the focus from treatment to prevention (Iversen et. al, 2015). Underwater acoustics has been suggested as a measure against salmon lice. The purpose of this project was to investigate the potential of using sound (20 – 20 kHz) and ultrasound (> 20 kHz) on nauplii, copepodites, and egg-strings of salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*), in order to prevent or reduce host attachment. The project was divided into the following tasks:

1: Investigate morphological and physiological effects of selected acoustic frequencies on free swimming stages and egg-strings of L. salmonis. Frequencies ranging from 6 kHz to 54 kHz were used with sound pressure levels from 134 to 185dB (re 1μPa). The experiments were conducted on lice in different stages, as well as on egg-strings. The salmon lice were placed in petri dishes and exposed for the different frequencies, on which survival rate and morphological changes were documented through microscopy images.

2: Investigate the behavioural effects of selected acoustic frequencies on copepodites of L. salmonis. Experiments were conducted in an experimental setup where copepodites were stimulated to move in a given direction based on their positive phototaxis. The study investigated whether acoustic signals affected the copepodites natural attraction to light.

No notable effects were demonstrated on the selected frequencies, neither in task 1 or 2. The findings suggests that acoustic waves with wavelengths ranging from 3 to 25 cm (approximately 54 to 6 kHz in seawater) does not affect egg-strings, nauplius or copepodite stages of salmon lice, neither morphologically, or on natural phototaxis.

Additionally, a theoretical assessment of cavitation and how it may be utilised against salmon lice is included at the end of the report, as well as a case study of possible implementations of cavitation into existing de-lousing equipment such as the Hydrolicer concept.

Innholdsfortegnelse

Ultralyd mot lakselus: Kontrollert testing av effekt direkte på lakselus	1
Sammendrag.....	2
Abstract	3
1 Innledning	5
2 Problemstilling og formål	6
3 Prosjektgjennomføring og resultater	7
3.1 Undersøke morfologiske effekter av utvalgte frekvenser av lyd og ultralyd på fritt svømmende stadier og eggstrenger av <i>L. salmonis</i>	7
3.1.1 Effekt av lyd og ultralyd på <i>L. salmonis</i> nauplier	8
3.1.2 Effekt av lyd og ultralyd på <i>L. salmonis</i> kopepoditter	9
3.1.3 Effekt av lyd og ultralyd på klekkesuksess hos <i>L. salmonis</i> eggstrenger	10
3.1.4 Effekt av eksponering til lyd og ultralyd på <i>L. salmonis</i> eggstrengers suksessrate for utvikling til infeksiøst stadie (kopepoditt)	14
3.2 Atferdseffekter av lyd og ultralyd	17
3.3 Diskusjon	24
4 Konklusjon	27
5 Leveranser.....	27
6 Referanser.....	28
7 Vedlegg	29
7.1 Kavitasjon.....	29
7.2 Kavitasjonsutstyr og mulig anvendelse i Hydrolicer	29
7.2.1 Utstyrsleverandører.....	29
7.3 Kavitasjon til anvendelse i Hydrolicer-konseptet.....	30
7.3.1 Mulig implementasjon.....	30
7.3.2 Andre betraktninger	32

1 Innledning

FHF kontaktet SINTEF Fiskeri og havbruk høsten 2015 med ønske om en uforpliktende skisse til et prosjekt på grunnleggende studier av effekten lyd og ultralyd har på lakselus. Prosjekt 901160, *Ultralyd og lakselus – proof of concept*, ble innvilget og påbegynt vinteren 2015.

Lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*, Krøyer, 1838) er en hoppekreps som gjennomgår totalt 8 stadier før den blir voksen og kjønnsmoden (Figur 1). I sine tre første stadier er den frittsvømmende; de to første som nauplier og det tredje som parasittisk kopepoditt (Eichner et al.) I dette stadiet er den avhengig av å finne en vertsfisk og feste seg til denne for å overleve og utvikle seg videre. Lakselusa overlever bare noen få døgn uten en vert, avhengig av sjøtemperatur.

Bruk av ultralyd som et forebyggende, ikke-medikamentelt tiltak for å hindre påslag av lakselus er allerede testet i fullskala pilotforsøk hos flere oppdrettsbedrifter, men det har foreløpig gitt liten eller svært mangelfull dokumentasjon på om teknologien fungerer eller ikke. Det finnes lite dokumentasjon på effekt av lyd og ultralyd på lakselus fra kontrollerte labforsøk, og resultatene fra dette prosjektet vil bidra til å økt kunnskap om fysiologiske og atferdsrelatert respons til ultralydteknologi.

Prosjektets omfang

Prosjektet omfattet blant annet metodeutvikling, design og konstruksjon av en forsøksrigg med sektoriell, automatisk billedtaking for bruk i atferdsstudier, i tillegg til kontrollerte karforsøk med eksponering av frittlevende lakselus og eggstrenger til lyd og ultralyd for å vurdere morfologisk og fysiologisk effekt.

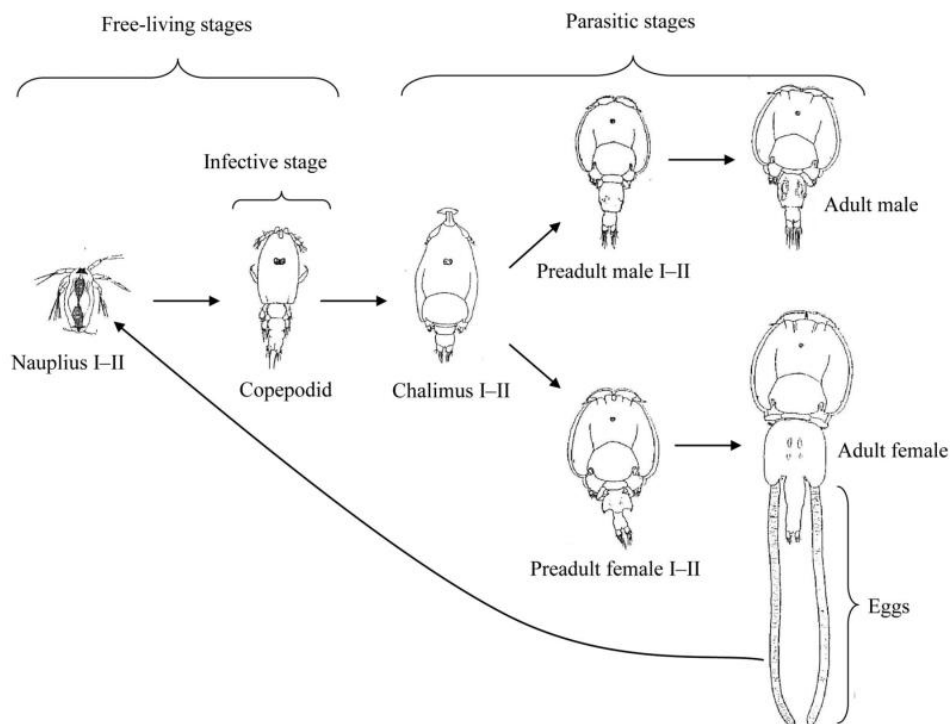
På oppfordring fra styringsgruppen ble det i tillegg lagt inn en bestilling på en beskrivelse av kavitasjon som konsept og bruksområder for kavitasjon i oppdrett. (Se kapittel 0 På oppfordring fra styringsgruppa ble det i tillegg lagt inn en bestilling på en beskrivelse av kavitasjon som konsept og bruksområder for kavitasjon innen avlusingsoperasjoner. Det ble også besluttet i styringsgruppa at det skulle tas utgangspunkt i Hydrolicer som case for vurderingen. Dette er utenfor det originale omfanget av prosjektet og er derfor vedlagt her. Det ble ikke gjennomført praktiske tester i dette prosjektet.

Kavitasjon.)

Prosjektet var organisert som følger:

Styringsgruppe: Kjell Maroni fra FHF, Henrik Trengereid fra Marine Harvest ASA, Per Gunnar Kvenseth fra Smøla klekkeri og settefisk AS, og Ken Rune Bekkeli fra Salaks AS.

Prosjektgruppe: Eirik Svendsen (kavitasjon), Andreas Hagemann, Torfinn Solvang-Garten (prosjektleder).



Figur 1: Lakselus livssyklus (fra Igboeli et al., 2014)

2 Problemstilling og formål

Målsettinger:

- Undersøke morfologiske og fysiologiske effekter av lyd og ultralyd på nauplie- og copepodittstadier av lakselus, samt eggstrenger.
- Undersøke effekt av lyd og ultralyd på atferd hos nauplie- og copepodittstadier av lakselus. Ulike frekvenser vil bli testet.

Lakselus er en miljøutfordring, i tillegg til en betydelig kostnad for norsk lakseoppdrett. Potensialet i en hindring eller begrensning av problemet er stort, både miljømessig og økonomisk. Dersom studiene indikerer at akustikk kan benyttes som et hinder for lusepåslag, kan det være et grunnlag for å utvikle dette videre til en viktig komponent i forebyggende, ikke-medikamentelle tiltak mot lakselus i havbruksnæringen.

3 Prosjektgjennomføring og resultater

3.1 Undersøke morfologiske effekter av utvalgte frekvenser av lyd og ultralyd på frittlevende stadier og eggstrenger av *L. salmonis*.

Lydfrekvenser på 6, 10, 20, 30 og 54 kHz ble benyttet i forsøkene som ble gjennomført på frittlevende utviklingsstadier av lakselus og eggstrenger. Frittlevende lakselus ble overført til plastsylindere med filterbunn (64 µm maskevidde) plassert på en høyttaler hvor de ble påført lydtrykk i ulike frekvenser (Fig. 2). Deretter ble overlevelse og morfologiske endringer dokumentert ved hjelp av billedtakning med et kamera (Lumenera INFINITY3) tilkoblet en stereolupe (Nikon SMZ1000, Japan). Etter eksponering ble individer observert i mikroskop over en periode på 5 minutter for registrering av svømmeaktivitet. Individer med liten egenbevegelse ble stimulert til å røre på seg med bruk av raskt blinkende lys.. Alle individer ble undersøkt på nytt 10-15 minutter etter første inspeksjon for å registrere eventuelle seneffekter av eksponeringen.

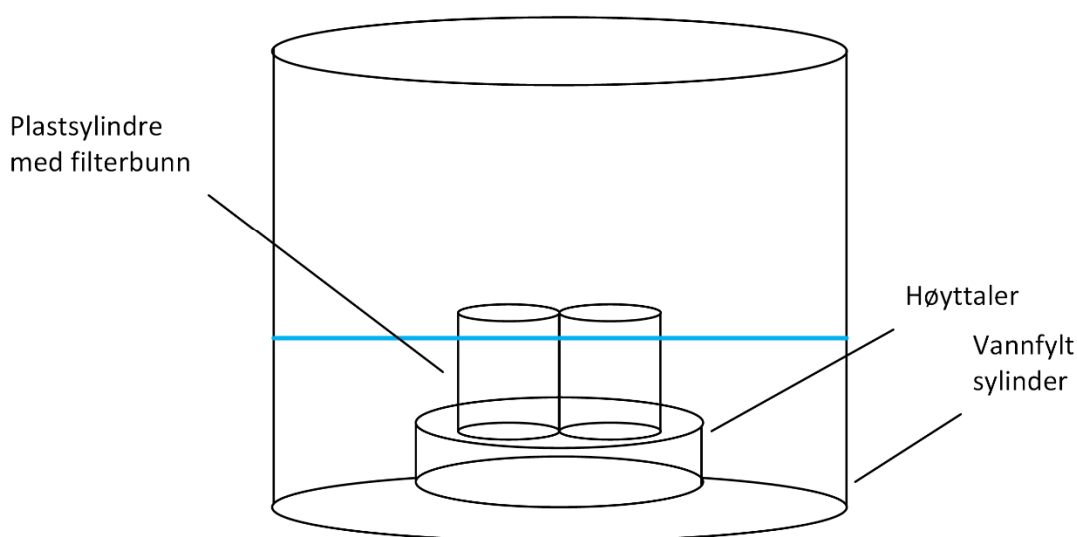
Eggstrenger ble fotografert før og etter lydtrykket ble påført for dokumentering av morfologiske effekter, og ble deretter satt til klekking. Antall egg i eggstrengene ble registrert før de ble satt til klekking, og klekkeraten ble kalkulert ved å dele antall klekte nauplier på antall egg.

Alle forsøksoppsett benyttet det samme systemet for å produsere lyd, som bestod av en signalgenerator (GW INSTEK GFG-82149A) koblet til en Harman Kardon forsterker (Signature 1.5) som igjen var koblet til enten:

A: En undervannshøyttaler (Ocean Engineering DRS-8) med impedanstilpasning (for frekvensene opp til 30 kHz)

B: En stempeltransducer (Benthowave BII 7506IM, for frekvensen 54kHz).

For alle forsøk ble det benyttet et vannivå over høyttaler på 88 mm.



Figur 2: Forsøksoppsett, fysiologiske effekter

3.1.1 Effekt av lyd og ultralyd på *L. salmonis* nauplier

Stadie 2 *L. salmonis* nauplier (n=5) ble eksponert for frekvensene 6, 10, 20 og 30 kHz over en periode på 15 minutter. Alle eksponeringer ble gjennomført med 4 replikater. Etter endt eksponering ble naupliene overført til en petriskål fylt med sjøvann og plassert under en stereolupe for visuell inspeksjon og fotografering. Overlevelse og morfologi ble undersøkt, og forsøksparametere og resultat er vist i Tabell 1. Det ble ikke observert noen dødelighet i forbindelse med eksponeringen, med unntak av i en av replikatene for 30 kHz-behandlingen hvor én nauplie ble registrert som død. Det ble ikke observert noen strukturelle skader på den døde nauplien. Det ble observert nedsatt svømmeaktivitet i 5-10 minutter etter eksponering for omtrent halvparten (42 %) av naupliene som ble eksponert for 30 kHz, men normal svømmeaktivitet ble gjenopptatt etter 10 - 15 minutter.

Tabell 1: Effekt av ulike lydfrekvenser og lydtrykk på *L. salmonis* naupliers morfologi og overlevelse. Hvert replikat hadde 5 individer, og overlevelse er vist som gjennomsnitt \pm standardavvik for 4 replikater.

Frekvens (kHz)	Eksponeringstid (min.)	Lydtrykk (dB)	Overlevelse (%)	Morfologi
6	15	154	100	Ingen endring
10	15	169	100	Ingen endring
20	15	153	100	Ingen endring
30	15	180	94 \pm 11	Ingen endring



Figur 3: Nauplier fotografert under stereolupe etter eksponering for 30 kHz. Naupliene viste normal morfologi men nedsatt svømmeaktivitet i 5-10 minutter etter eksponering.

3.1.2 Effekt av lyd og ultralyd på *L. salmonis* kopepoditter

L. salmonis kopepoditter (n=5) ble eksponert for frekvensene 6, 10, 20 og 30 kHz over en periode på 15 minutter. Samtlige behandlinger ble gjennomført med 4 replikater. Etter endt eksponering ble kopepodittene overført til en petriskål fylt med sjøvann og plassert under en stereolupe for visuell inspeksjon og fotografering. Overlevelse og morfologi ble undersøkt, og forsøksparametere og resultat er vist i Tabell 2/Tabell 1. Det ble ikke observert noen dødelighet eller morfologiske endringer (Figur 4) som følge av eksponeringen, og alle individer utviste normal svømmeaktivitet.

Tabell 2: Effekt av ulike lydfrekvenser og lydtrykk på *L. salmonis* kopepodittenes morfologi og overlevelse. Overlevelse er vist som gjennomsnitt \pm standardavvik for replikater (n=4).

Frekvens (kHz)	Eksponeringstid (min.)	Lydtrykk (dB)	Overlevelse (%)	Morfologi
6	15	175	100	Ingen endring
10	15	185	100	Ingen endring
20	15	176	100	Ingen endring
30	15	185	100	Ingen endring



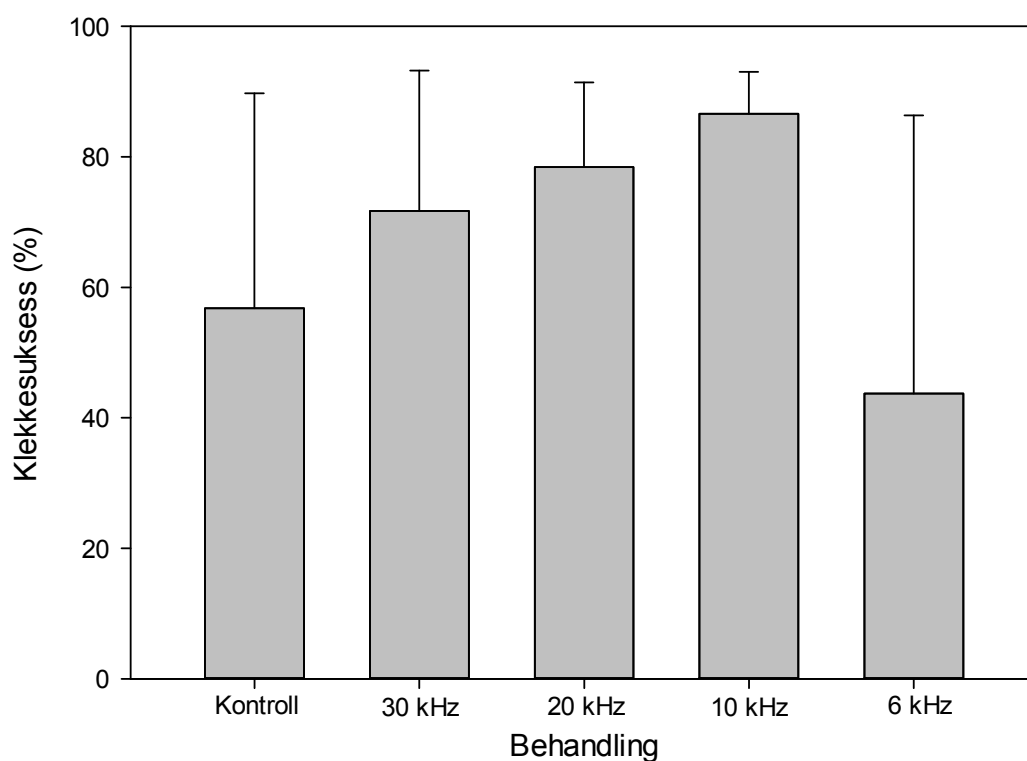
Figur 4: Kopepoditter fotografert under stereolupe før (øverst) og etter (nederst) eksponering for 30 kHz. Kopepodittene viste normal svømmeatferd og morfologi etter eksponeringen.

3.1.3 Effekt av lyd og ultralyd på klekkesuksess hos *L. salmonis* eggstrenger

Effekt av lyd og ultralyd på *L. salmonis* eggstrengers klekkesuksess ble undersøkt i to suksessive forsøk med ulikt forsøksoppsett. I det første forsøket ble hele eggstrenger (n=1) eksponert i triplikater. I det i andre forsøket ble eggstrenger (n=20) kappet i 3 like deler med en skalpell og blandet sammen før 3 deler ble tilfeldig plukket til hver eksponering. Årsaken til at det ble gjort på denne måten var at det ble registrert svært variabel klekkesuksess for kontrollbehandlingen i første forsøk, hvilket gjorde effekten av eksponeringen vanskelig å vurdere. På grunn av den individuelle variasjonen i levedyktighet, pigmentering og ubefruktede/skadete egg mellom eggstrengene, ble det derfor besluttet å bruke oppdelte og randomiserte deler av eggstrenger i det andre forsøket.

Forsøk 1 - Hele eggstrenger

Eggstrenger av *L. salmonis* (n=3) ble eksponert for maksimalt tilgjengelig lydtrykk for frekvensene 6, 10, 20 og 30 kHz i 15 minutter. Eggstrengene ble før eksponering plassert under en stereolupe med kamera for fotografering, størrelsesmål og registrering av antall egg. Ved endt eksponering ble eggstrengene på nytt fotografert og inspisert. Eggstrengene ble så plassert enkeltvis i begerglass (100 mL) fylt med sjøvann (33 psu, 12 °C) for klekking. Etter 4-6 dager, avhengig av når eggstrengene klekte, ble innholdet i begerglassene silt og overført til en petriskål. Antall klekte nauplier ble telt og uklekte eggstrenger fotografert før klekkeprosenten ble beregnet. Resultatene er vist i Figur 5. Det ble ikke observert skader på eggstrengene som følge av eksponeringer for noen av behandlingene.



Figur 5: Klekkesuksess for *L. salmonis* eggstrenger (n=3) etter eksponering for ulike lydfrekvenser og lydtrykk i 15 minutter, vist som gjennomsnitt ± standardavvik.

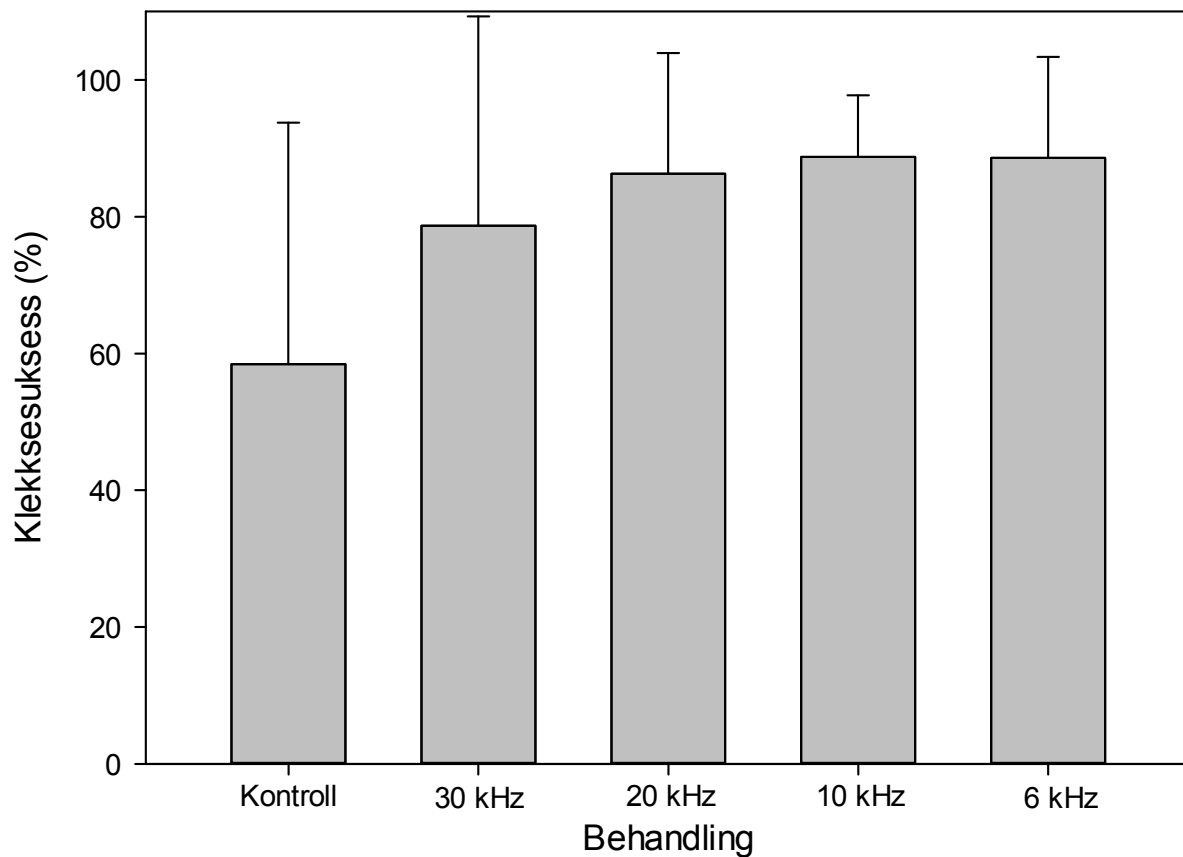


Figur 6: Bilder av eggstrenger før (venstre) og etter (høyre) eksponering for 6 kHz med et lydtrykk på 179dB i 15 minutter.

Forsøk 2 –Delte eggstrenger

Eggstrenger av *L. salmonis* (n=20) ble delt i tre og blandet i et begerglass. Deretter ble tilfeldig valgte biter (n=3) eksponert for maksimalt tilgjengelig lydtrykk for frekvensene 6, 10, 20 og 30 kHz i 15 minutter. Eggstrengene ble før eksponering plassert under en stereolupe med kamera for fotografering og måling, og antall egg per eggstreng ble telt (Fig. 8). Ved endt eksponering ble eggstrengene på nytt fotografert og undersøkt. Eggstrengene ble deretter plassert enkeltvis i begerglass (100 mL) fylt med sjøvann (33 ppt, 12 °C) for klekking. Etter 6 dager ble innholdet i begerglassene silt og overført til en petriskål. Antall klekte nauplier ble telt og uklekte eggstrenger fotografert, før klekkeprosenten ble beregnet. Resultatene er vist i Figur 7. Det ble ikke observert morfologiske endringer som følge av eksponering for noen av behandlingene.

Alle eggstrengene som ble benyttet i forsøket ble nøye målt, og eksakt antall egg per eggstreng ble telt. På bakgrunn av datagrunnlaget fremskaffet i Forsøk 1 og 2 ble antall telte og estimerte egg sammenliknet. *L. salmonis* eggene var i snitt $60,5 \pm 3,1$ μm brede. Bruk av gjennomsnittsverdi for eggbredden til estimering av antall egg sammenliknet med telt antall egg viste at avvik på $4,5 \pm 2,9$ % (n=14). Antall egg per eggstreng ble estimert i det siste forsøket.



Figur 7: Klekkesuksess for oppdelte og randomiserte *L. salmonis* eggstrenger (n=3) etter eksponering for ulike lydfrekvenser og lydtrykk i 15 minutter, vist som gjennomsnitt \pm standardavvik.



Figur 8: Oppdelt eggstreng fotografert med kamera tilkoblet et stereomikroskop. Alle egg ble telt manuelt på hver enkelt eggstreng. Breddemål for enkeltegg hos 14 eggstrenger ble brukt til å estimere antall egg per eggstreng i forsøk beskrevet i 3.1.4

3.1.4 Effekt av eksponering til lyd og ultralyd på *L. salmonis* eggstrengers suksessrate for utvikling til infeksjøs stadium (kopepoditt)

I forsøket ble eggstrenger av *L. salmonis* eksponert for ulike frekvenser av lyd og ultralyd ved maksimalt tilgjengelig lydtrykk i en periode på 15 minutter. I dette forsøket ble også lydfrekvens på 54 kHz inkludert, hvilket ikke var mulig for tidligere forsøk på grunn av ikke tilgjengelig utstyr. Antall eggstrenger i hvert replikat ble økt for å redusere effekten av varierende kvalitet på enkeltstrenger.

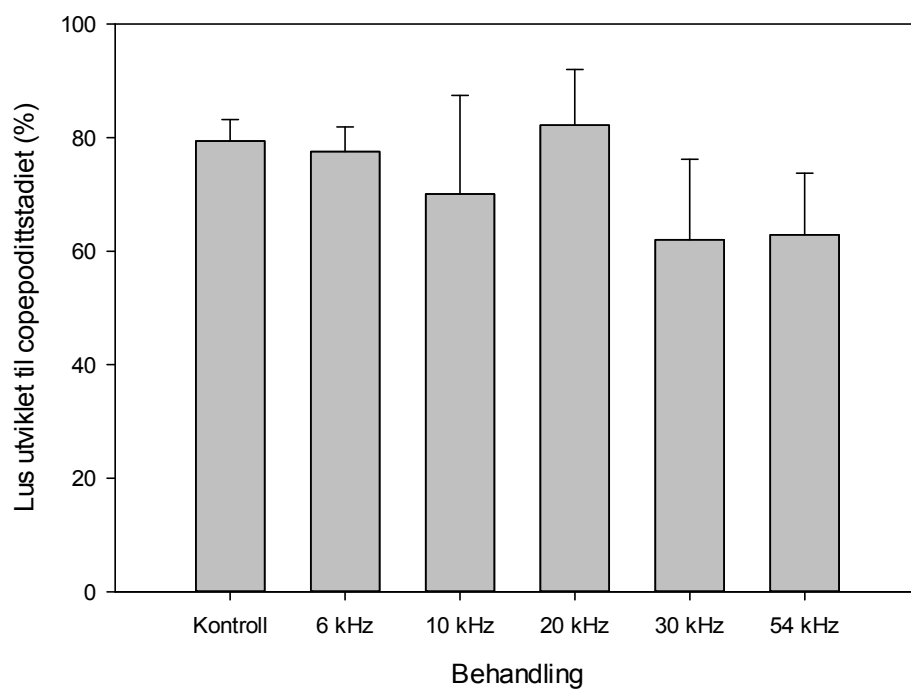
Eggstrenger av *L. salmonis* (n=90) ble lagt enkeltvis i en petriskål fylt med sjøvann og målt (lengde) med et digitalt skyvelære. Strengene ble deretter fordelt i grupper på 5 i begerglass fylt med sjøvann og oppbevart ved 10 °C frem til eksponering (<3 timer). Den totale lengden på samtlige eggstrenger i hvert begerglass ble registrert. Alle behandlinger ble gjennomført i triplikater. Etter eksponering ble eggstrengene umiddelbart overført til en klekkerigg (Fig. 9) som ble plassert i et klimarom (10 °C). Sjøvann (10 °C, 33 psu, 1 vannutskifting/time) ble tilført gjennom perforerte silikonslager plassert under sylindrene. På dag 6 etter at eggstrengene ble overført til klekkeriggen ble det tatt ut prøver av nauplier (n=16-28) fra samtlige replikater

for vurdering av eksternt morfologi og svømmeaktivitet. Alle behandlinger viste normal svømmeaktivitet og morfologi (Fig. 11).



Figur 9: Forsøksrigg som ble brukt til klekking av eggstrenger. Klekte individer ble holdt i samme beholdere frem til de var utviklet til kopepodittstadiet (dag 14).

Prøvetaking og telling av kopepoditter ble gjennomført på dag 14. Innholdet i hvert replikat ble silt og overført til en petriskål plassert på en stereolupe hvor antall kopepoditter ble telt manuelt ved å suge dem opp enkeltvis gjennom en glasspipette koblet til en peristaltpumpe (Watson-Marlow). Deretter ble utviklingsraten fra egg til kopepodittstadiet kalkulert ved å dele antall kopepoditter på estimert antall egg i replikatet. Figur 10 viser andel egg utviklet til kopepodittstadiet for eggstrenger etter eksponering for forskjellige lydfrekvenser i 15 minutter, vist som gjennomsnitt \pm standardavvik for triplikater. Hvert replikat bestod av 5 eggstrenger med en sammenlagt total lengde på $93,4 \pm 4,9$ mm for behandlingene.



Figur 10: Andel av lakselusegg som utviklet seg til copepodittstadiet. Resultater er vist som gjennomsnitt \pm standardavvik for triplikater med 5 hele eggstrenger per replikat.



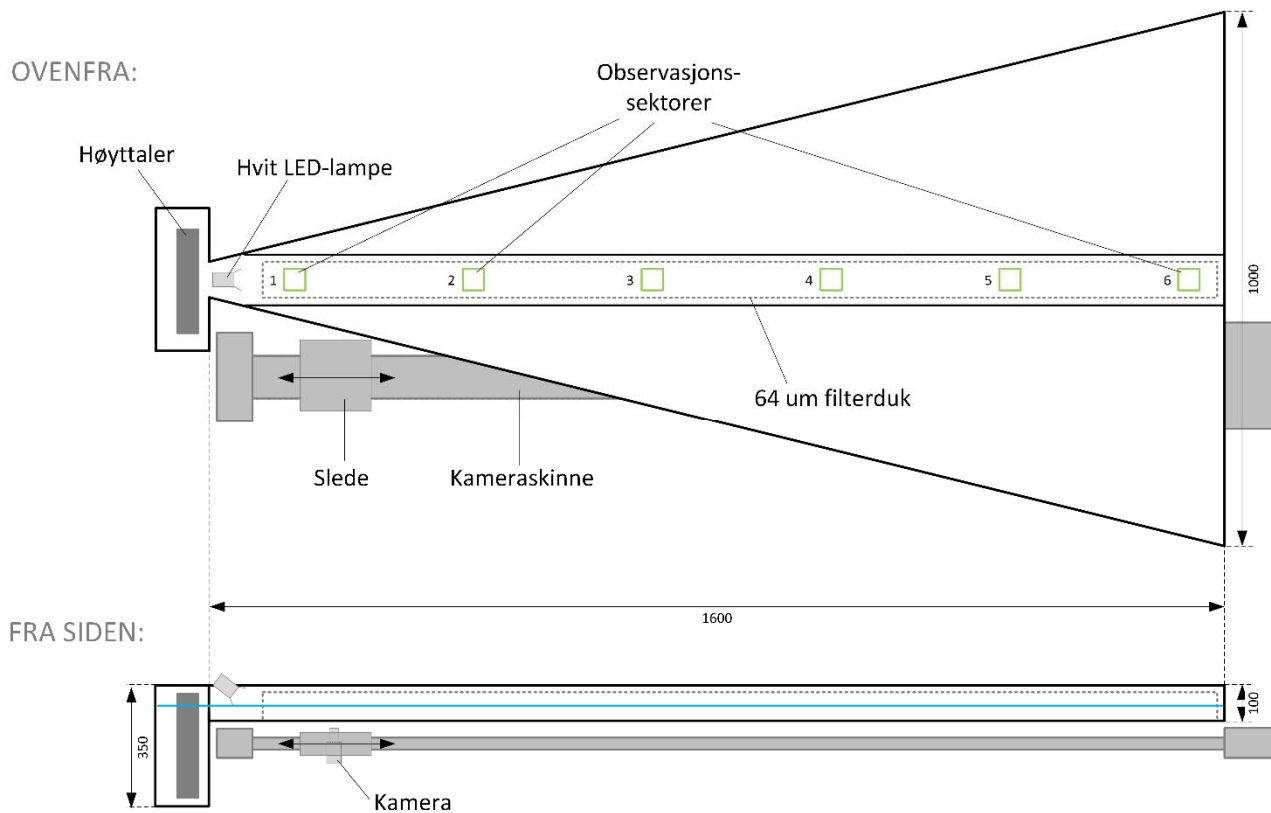
Figur 11: Utvalg av bilder av nauplier utviklet fra eksponerte eggstrenger tatt med omvendtmikroskop; 6 kHz (topp venstre, 10 kHz (topp høyre), 20 kHz (midt venstre), 30 kHz (midt høyre), 54 kHz (bunn venstre) og kontroll (bunn høyre)

3.2 Atferdseffekter av lyd og ultralyd

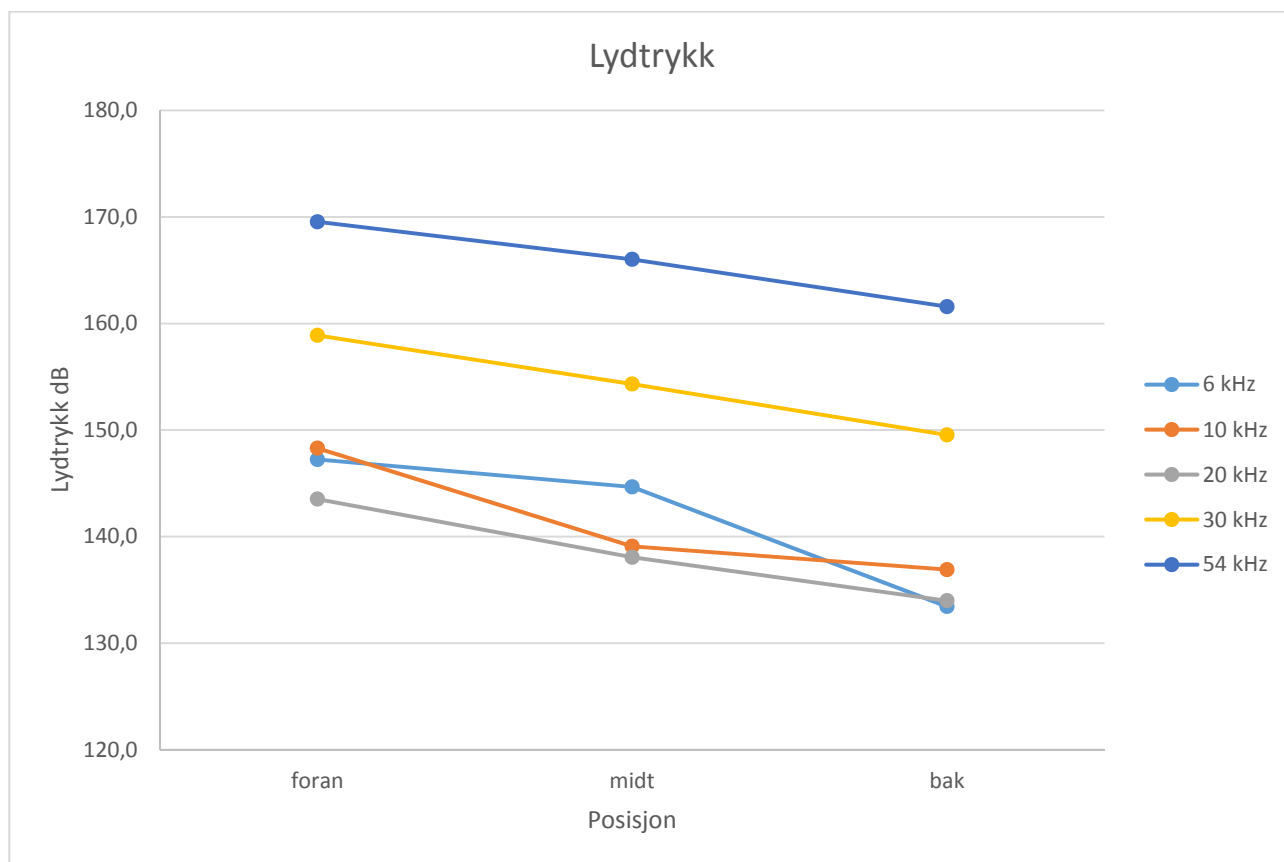
Forsøk ble gjennomført i en egenutviklet forsøksrigg hvor lus i kopepodittstadiet ble stimulert til å bevege seg i en bestemt retning basert på lusens positive fototaksis. Det ble undersøkt om lyd og ultralyd i frekvensene 6, 10, 20, 30 og 54 kHz hadde en effekt på den naturlige, fototaktiske atferden.

Eggstrenger fra I-Lab ble kjøpt inn og klekket. Når disse nådde fram til kopepodittstadiet ble de benyttet i forsøket. Figur 12 viser en skisse over testriggen. Riggeren ble bygget i syrefast stål, med et reservoar i enden for høyttaleren / elementet. Den trekantede formen ble lagd for å skape en gradient i lydtrykket relativt avstand fra elementet. Etter hvert som lydbølgene spres innover i tanken fra reservoaret, vil energien avta på grunn av det økte tilgjengelige vannvolumet. Dette forutsetter at spredningen av lydbølgene er tilstrekkelig, samt at virkningen ikke blir oppveid eller overgått av refleksjoner. I endebaffelen av det trekantede bassenget ble det montert en porøs gummimatte med tykkelse 20mm for å dempe refleksjoner. Dette var en utfordring siden de brukte bølgelengdene varierte relativt mye; fra omtrent 25cm (6 kHz) til omtrent 3 cm (54 kHz – forutsatt 1500m/s lyd hastighet i vannet). Figur 13 viser at dette designet fungerte tilfredsstillende.

Det ble benyttet sandfiltrert, naturlig sjøvann fra SINTEF SeaLabs sjøvannsinntak (inntak på 70m dybde). 500 kopepoditter ble talt opp i kopper for hvert forsøk og oppbevart i mørke før forsøkene startet. Koppene ble oppbevart utenfor forsøksrommet for å unngå eksponering av lyd på forhånd. I Figur 12 vises et stiptet rektangel rundt de seks observasjonssektorene. Dette indikerer en "inngjerding" laget av en tynn aluminiumsramme overtrekt med planktonduk (64 μ m). I bunnen av dette rektangelet er metallet erstattet med gjennomsiktige plastplater for observasjon nedenfra. Kopepodittene ble sluppet i sektor 3 i stillestående vann. Mellom hvert forsøk ble tanken grundig spylt ren og fylt på ny. Vannsøylen i observasjonsektorene var ved alle kjøringene 25mm.



Figur 12: Testrigg for del 2 – Atferdsforsøk



Figur 13 - Lydtrykk målt på tre punkter i testriggen

Lydtrykket ble målt ved hjelp av en Bruel & Kjaer hydrofon (type 8104) samt en Nexus 2692 forsterker. Det forsterkede signalet ble så tatt ut fra forsterkeren og inn på PC via et PICO-skop. Lydstyrken ble så målt ved å lese av et gjennomsnitt av målt AC True RMS og regnet om til lydtrykk ut fra hydrofonens kalibrering. Hydrofonen ble plassert på tre ulike posisjoner innenfor planktonduken; nært observasjonssektor 1 (foran), mellom sektor 3 og 4 (midt) og nært sektor 6 (bak.) Lydtrykket varierte fra 134 til 170 dB (re 1 μ Pa). Gjennomsnittlig differanse mellom lydtrykk i sone 1 og sone 6 var 10,4 \pm 2,3 dB.

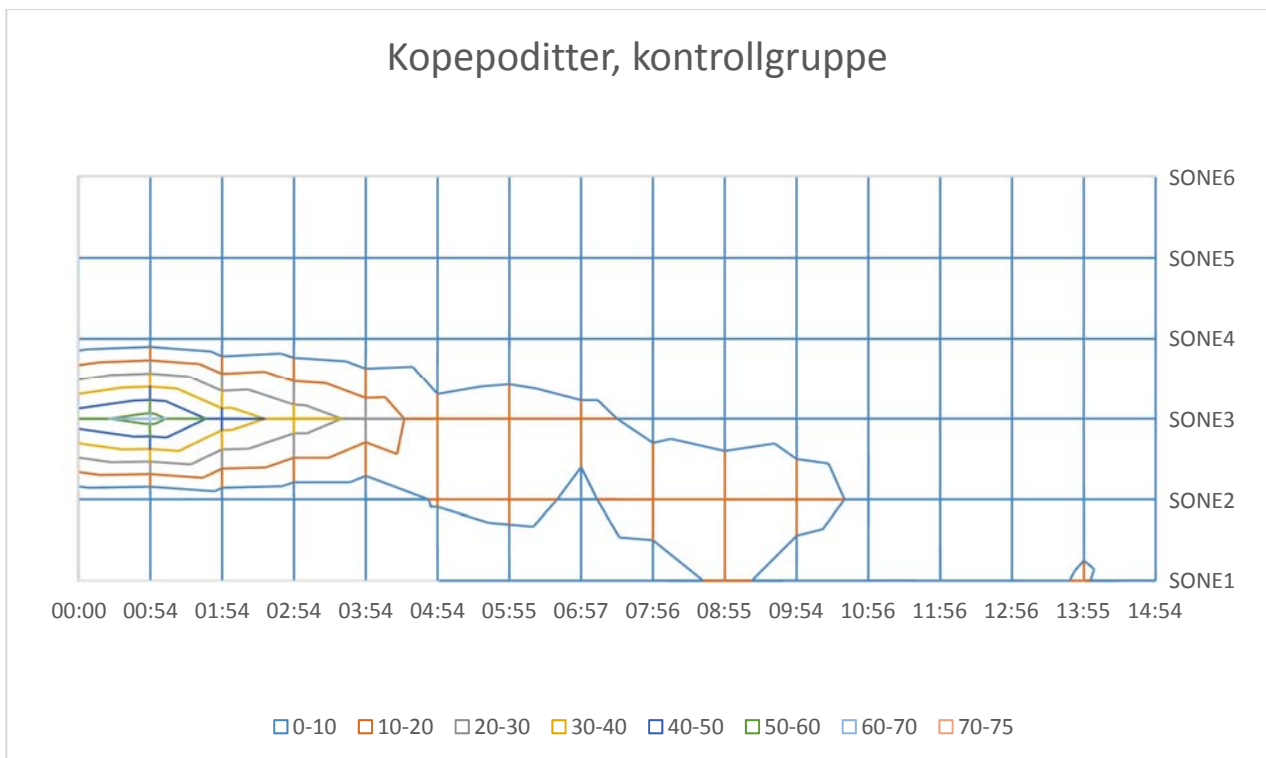
Det ble benyttet maskinsyn for automatisk innhenting av bilder fra observasjonssektorene ved gitte tidsintervaller gjennom forsøket. En 150 cm lang kameraskinne av typen Digislidder DS150 som vist i Figur 12 ble montert under det trekantede bassenget, med et Point Grey (2.8 MP Grasshopper3) USB-kamera montert på sleden med et 25mm objektiv. Kameraet var rettet oppover og observerte rektangelet midt i bassenget nedenfra. Kopepodittene søkte ofte til en fast overflate å følge, og fokus på kameraet ble satt til rett innenfor plastbunnen. Vannsøylen i observasjonssektoren var kun på 25mm, mens fokusdybden på kamerasystemet kun var på omtrent 3mm. Dermed var en god del av vannvolumet "usynlig" for kameraet. På grunn av gitte fysiske betingelser var det ikke mulig å oppnå en større fokusdybde med en så liten arbeidsavstand (avstand til fokuspunkt) uten autofokus.

Bildene ble hentet inn ved hjelp av en skreddersydd programvare utviklet i LabVIEW. Den samme programvaren koordinerte også kameraskinnens bevegelser mellom observasjonssektorene via en stepmotor. Motoren ble styrt via en Arduino (mikrokontrollerkort) med egenutviklet kode. Hver observasjonssektor ble dekket av to eksponeringer med kameraet, med en horisontal forflytning tilsvarende bildebredde. Deretter akselererte sleden til neste observasjonssektor der prosedyren ble gjentatt, inntil det 12. og siste bilde var tatt,

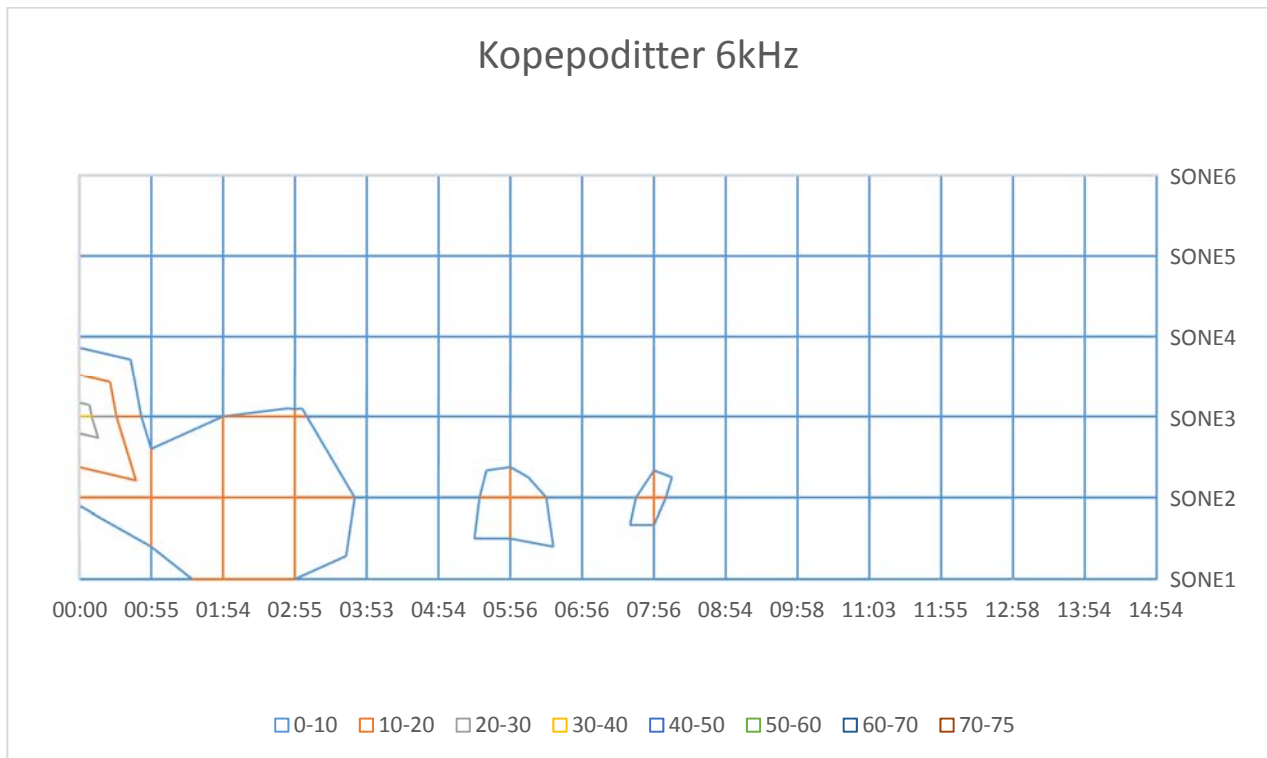
og sleden returnerte til første posisjon i påvente av neste kjøring. Denne prosedyren ble gjentatt hvert 60 sekund, og tok omtrent 30 sekunder å gjennomføre.

Bildene ble i ettertid analysert i egen programvare, også utviklet i LabVIEW. Denne programvaren sorterte bildene etter sektorplassering, og sammenlignet bildet til analyse med forrige bilde fra samme posisjon. Forrige bilde (fra samme posisjon) ble trukket fra bildet til analyse, for på denne måten lettere få fram passive partikler i vannet (skall, nauplier, forurensing) som ikke skulle telles som kopepoditter. Dersom en partikkel i siste bilde hadde en identisk partikkel i umiddelbar nærhet minuttet etter, ble den ikke telt med som en levende kopepoditt.

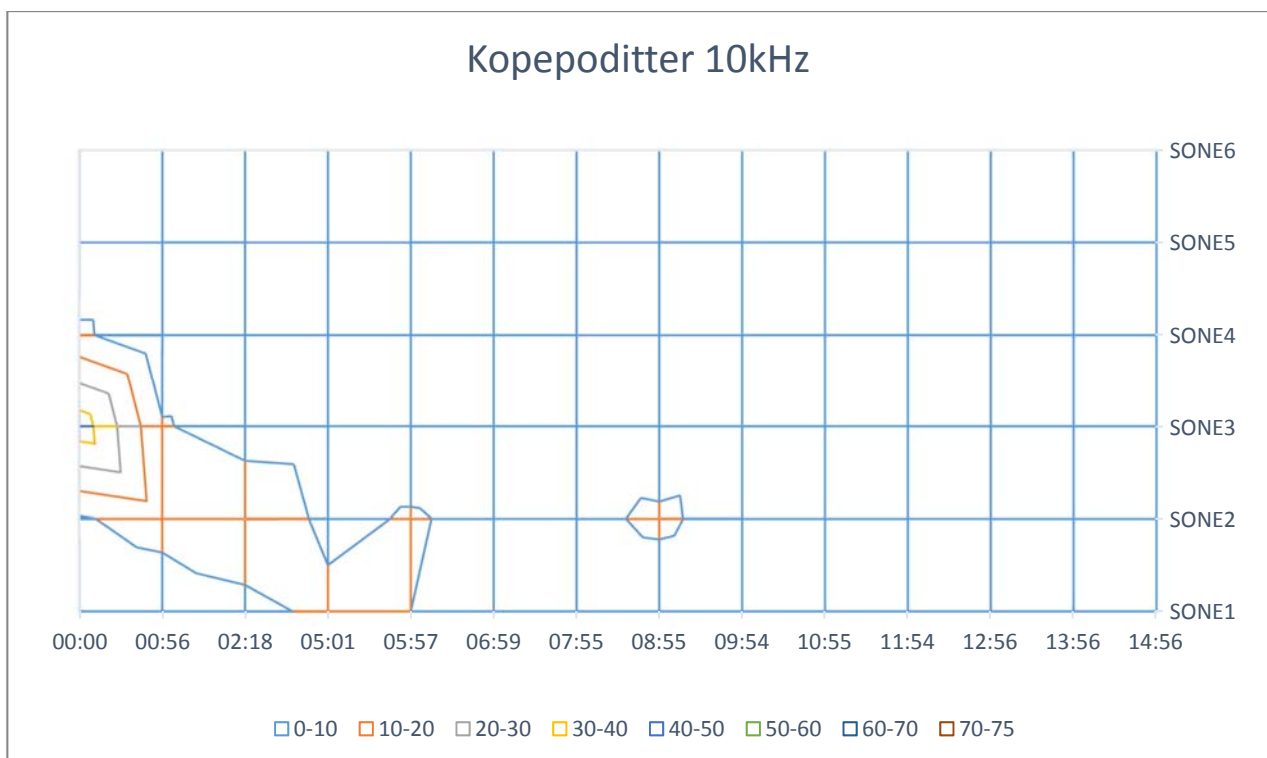
Resultatene fra tellingene er visualisert i konturplott i figurene under. Tidsinndelingen langs x-aksen er på omtrent 1 minutt, men sammenfalt ikke alltid perfekt med 60 sekunder. De ganger det er et lengre intervall enn 60 s kommer dette av en kortvarig teknisk svikt ved den aktuelle kjøringen.



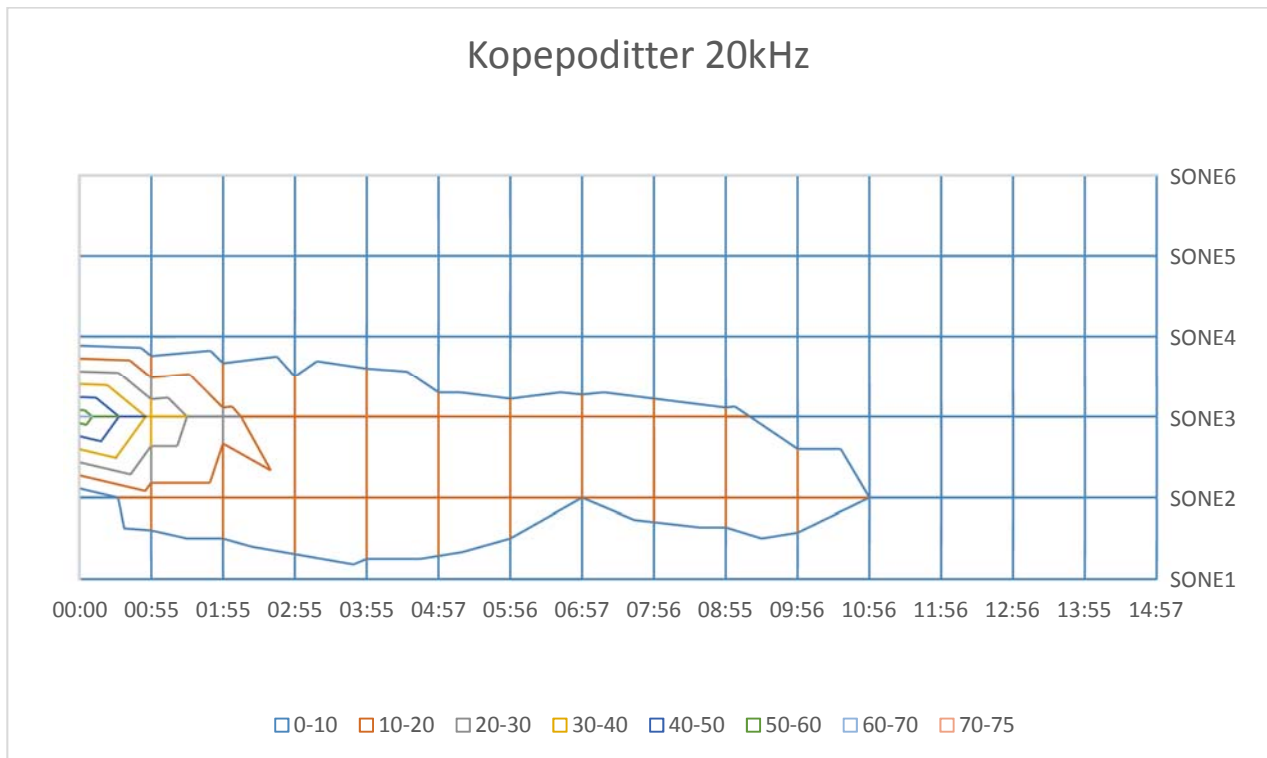
Figur 14: Konturplott, tetthet av kopepoditter, kontrollgruppe (uten lyd)



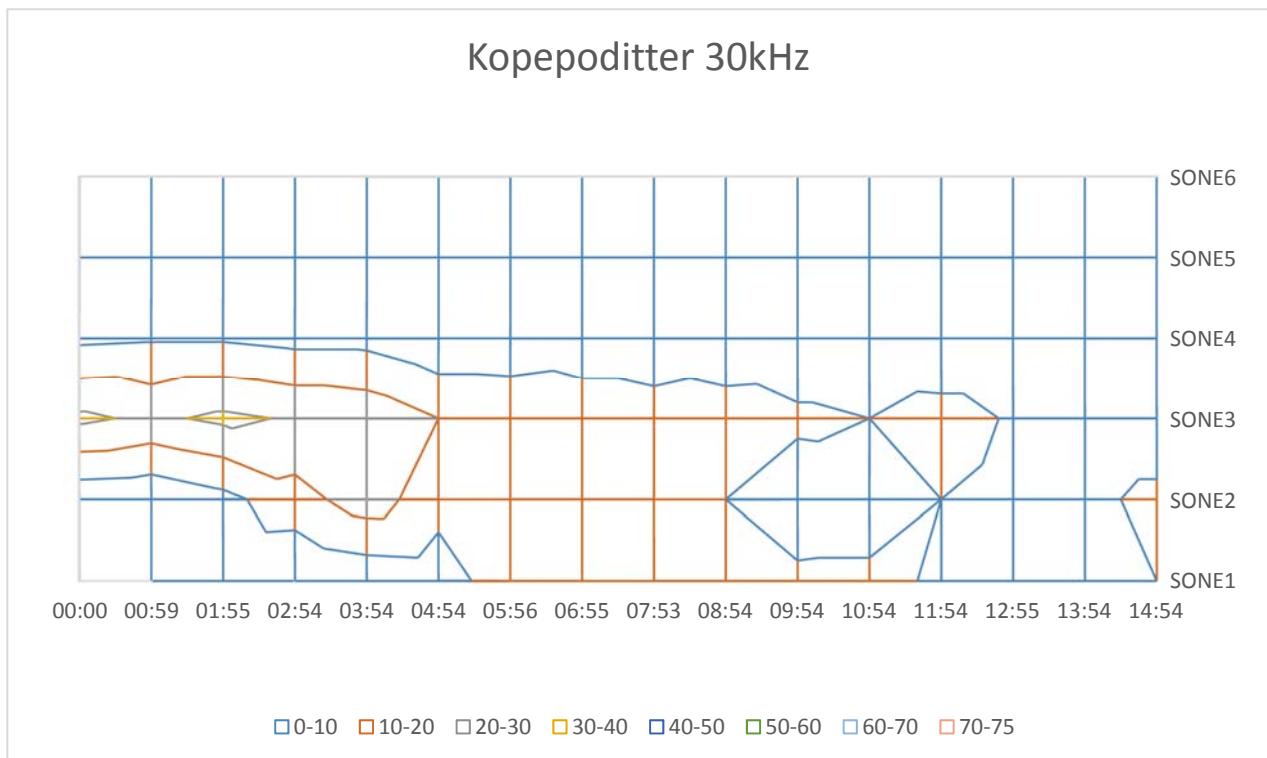
Figur 15: Konturplott, tetthet av kopepoditter, 6kHz



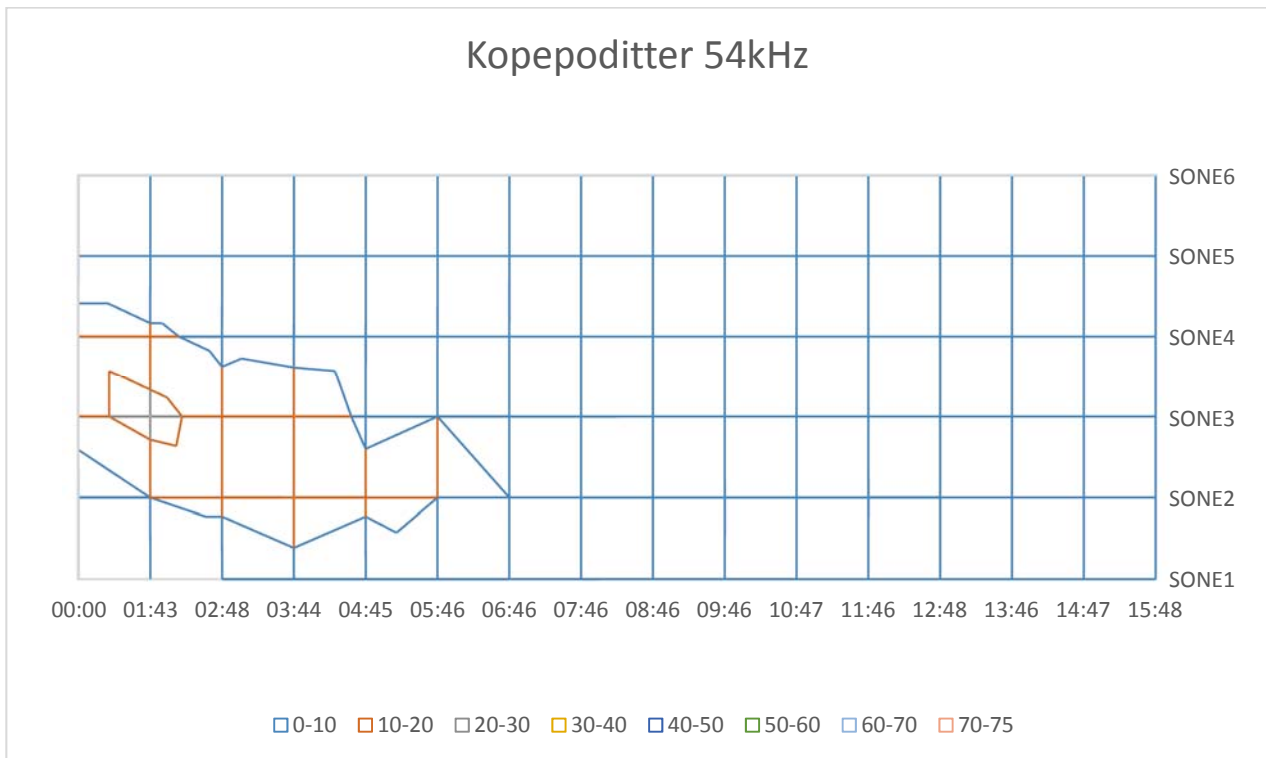
Figur 16: Konturplott, tetthet av kopepoditter, 10 kHz



Figur 17: Konturplott, tetthet av kopepoditter, 20 kHz



Figur 18: Konturplott, tetthet av kopepoditter, 30 kHz



Figur 19: Konturplott, tetthet av kopepoditter, 54kHz

3.3 Diskusjon

Til tross for at naupliene overlevde alle behandlingene, ble det registrert langt lavere svømmeaktivitet for flere av individene som ble eksponert for 30 kHz, sammenliknet med øvrige behandlinger. Det ble ikke observert liknende respons for kopepoditter, hvor svømmeaktiviteten var normal for alle behandlinger.

Det ble registrert høy variasjon i klekkesuksess mellom replikatene for forsøk på utviklingsrate fra egg til kopepoditter. Årsaken til dette var variasjon i vannstrøm og dermed vannkvalitet mellom replikatene, hvor det for enkelte av kamrene ikke ble tilført tilstrekkelig med vann og omrøring på grunn av ulik vannstrøm gjennom den perforerte slangen og/eller akkumulering av luftbobler på undersiden av filterduken som obstruerte vannet. Dette var tydelig observerbart i enkelte replikater hvor en god del av kopepodittene og naupliene var døde ved sluttsamlingen, og lave klekkerater kom utelukkende fra kammer hvor vannskiftingen var suboptimal. Til tross for dette ble det for de fleste behandlinger registrert normal kopepodittproduksjon per egg (Tabell 3) Antall kopepoditter registrert for forsøkene var lik de verdiene som ble opplyst av ILAB (Bergen) hvor eggstrengene ble kjøpt fra, som oppgir 200 – 250 kopepoditter per eggstreng som normalt.

Tabell 3: Gjennomsnittlig antall kopepoditter utviklet per eggstreng, vist som snitt for eksponerte eggstrenger (n=15) for alle behandlinger.

Behandling	Gjennomsnittlig antall kopepoditter pr. eggstreng
6kHz	239,7
10 kHz	215,2
20 kHz	244
30 kHz	191,4
54 kHz	195,7
Kontroll	237,9

Figur 14 til Figur 19 over kopepodittenes migrasjon viser en del variasjoner. Variasjoner her kan imidlertid komme fra flere faktorer enn kun den akustiske påvirkningen. En relativt liten prosentandel av kopepodittene ble telt med i hvert forsøk: Av 500 tilsatte for hver kjøring ble rundt 10-15% observert i sektorene med høyest tetthet. Dette er ikke unaturlig med tanke på at observasjonssektorene ikke dekker en stor andel av den avstengte overflaten (innenfor det rektangulære filterområdet), og fokusdybden for kamerasystemet var omtrent 4 av 25mm vannsøyle. Likevel var dette en effektiv måte å få gjort tellinger langsetter tanken på, spesielt med tanke på at observasjoner i seks ulike soner helst skulle skje til samme tid, flere ganger på rad.

Sone 1 har i konturplottene få tellinger. Dette er ikke helt intuitivt da det alltid ble observert en 'sverm' med kopepoditter mot planktonduken, nærmest lyset (se Figur 20). Muligens oppfattet kopepodittene lyset bedre på så kort avstand og hadde en større hastighet når de da beveget seg forbi sone 1. Visuelle observasjoner under forsøkene viste at noen få kopepoditter fortsatt befant seg i forsøksrektangelet, men de aller fleste befant seg etter forsøket (15 minutter) på, eller inntil, planktonduken nærmest lyset. (Altså innenfor sone 1).



Figur 20: Bilde av planktonduk etter endt forsøk, nærmest lyskilden

Kontrollgruppen viser at de aller fleste observerte kopepoditter nådde fram til sone 1 (nærmest lyset) etter 9 til 11 minutter (Figur 14). For at en frekvens skulle hatt en feltmessig relevant motvirkning på kopepodittenes positive fototaksis, holder det ikke å forsinke denne, men tiltrekningen må oppheves, eller helst snus, slik at den frastøtende effekten av lyden eller ultralyden overgår lysets tiltrekning. Dette skjedde ikke med noen av de testede frekvensene.

Med en større vannsøyle ville en ha kunnet oppnå en mer markant gradient i lydtrykk fra sektor 1 til 6. Årsaken til at dette ikke ble gjort er fordi dette ble et kompromiss mellom ønsket om gradient i lydtrykk og kameraets observasjonsvolum. Kameraets fokusdybde (området som framtrer skarpt i bildene) var kun på ca 3mm. Dette er en begrensning det ikke er optisk mulig å komme utenom med så små avstander mellom bildebrikke og objekt.

Figur 13 viser at vi oppnådde avtakende lydtrykk utover i testtriggen, men de forskjellige frekvensene har et nokså forskjellig nivå. Dette kommer trolig mest fra det faktum at høyttalerelementet benyttet for frekvensene opp til og med 30 kHz ikke har en lineær følsomhet over dette relativt brede frekvensspekteret. Undervannshøyttaleren benyttet en impedanstilpasning mot forsterkeren, og denne hadde en strømbegrensning på 4,0A. Maksimalt lydtrykk ble dermed gitt av denne begrensningen, og selv om den elektriske effekten var konstant varierte altså det genererte lydtrykket.

Kortere bølgelengder kan tenkes å ha større effekt, dersom de bedre sammenfaller med lakselusas fysiske dimensjoner. Dette forutsetter at det er en tilstrekkelig akustisk impedans i lakselusas kropp relativt sjøvannet rundt, slik at tilstrekkelige energimengder blir avsatt i organismen. For sammenligning er frekvensen som omtrent tilsvarer en kopepoditts tverrsnittsmål (typisk rundt 220 μ m diameter) nært 7GHz. Ulempen med kortere bølgelengder er deres betydelig raskere demping i vannet.

4 Konklusjon

Lydfrekvenser og lydtrykk (under kavitasjonsnivå) som ble brukt i forsøkene i prosjektet viste:

- Ingen effekt på frittlevende stadier av *L. salmonis*' eksterne morfologi. Studiet avkrefter at man kan ta livet av eller ødelegge lus ved bruk av lyd og ultralyd i benyttede trykk og frekvenser
- Ingen effekt på klekkesuksess hos *L. salmonis* eggstrenger.
- Ingen effekt på raten av klekte nauplier som utvikler seg til kopepoditter. Studiet avkrefter seneffekter av påføring av lyd og ultralyd på eggstrenger som hindrer nauplier i å vokse frem til det infeksjøs kopepodittstadiet.
- Ingen effekt på normal (positiv) fototaktisk atferd. Studiet avkrefter at man kan endre fototaktisk atferd ved bruk av lyd og ultralyd.

5 Leveranser

- Faglig sluttrapport (denne)
- Administrativ sluttrapport
- Populærvitenskapelig artikkel

6 Referanser

- Dahle, S. W.**, Svendsen E., Hagemann, A., Delacroix, S., 2016, Effect of ultrasonic cavitation on small and large organisms for water disinfection during fish transport, submitted Aquacultural Engineering
- Eichner, C.**, Hamre, L. A. & Nilsen, F., 2015: Instar growth and molt increments in *Lepeophtheirus salmonis* (Kopepoda: Caligidae) chalimus larvae. *Parasitology International* 64: p. 86–96
- Gaines, W. A.**, 2007, "Controlling cooling water quality by hydrodynamic cavitation", *Proceedings of the Water Environment Federation*, 2007.7: 538-545
- Gogate, P. R.**, Abhijeet M. K., 2009, "A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology", *Biochemical Engineering Journal*, 44.1: 60-72
- Igboeli, O.O.**, Burka, J. F. & Fast, M. D., 2014: *Lepeophtheirus salmonis*: a persisting challenge for salmon aquaculture. *Animal Frontiers*, Vol. 4 No. 1, p. 22-32
- Iversen, Audun**; Hermansen, Øystein; Andreassen, Otto; Brandvik, Ruth Kongsvik; Marthinussen, Anders; Nystøyl, Ragnar, 2015, "Kostnadsdrivere i lakseoppdrett", (ISBN 978-82-8296-336-7) 43, p. Nofima rapportserie (41/2015)
- Jyoti, K. K.**, 2001, "Water disinfection by acoustic and hydrodynamic cavitation", *Biochemical Engineering Journal*, 7.3: 201-212
- Kalumuck, K. M.**, 2003, "Remediation and disinfection of water using jet generated cavitation", 5th International Symposium on Cavitation (CAV 2003), Osaka, Japan
- Michel, J. M.**, 2001, "Introduction to cavitation and supercavitation", Centre national de la recherche scientifique Grenoble (France) lab de ecoulements geophysiques/industriels.
- Mortensen, A.**, Skjelvareid, M. H., 2015, "Ultral lyd – et nytt våpen i kampen mot lakselusa", (ISBN 978-82-8296-316-9) 25, p. Nofima rapportserie (31/2015)
- Omelyanyuk, M. V.**, 2013, "Removal of Growths and Incrustations from Water-Development Works", *Power Technology and Engineering*, 47.4: 239-243
- Raut, J. S.**, 2012, "Hydrodynamic cavitation: a bottom-up approach to liquid aeration", *Soft Matter*, 8.17: 4562-4566
- Save, S. S., Pandit, A. B., Joshi, J. B.**, 1997, "Use of hydrodynamic cavitation for large scale microbial cell disruption", *Food and Bioproducts Processing*, 75.1: 41-49

7 Vedlegg

På oppfordring fra styringsgruppa ble det i tillegg lagt inn en bestilling på en beskrivelse av kavitasjon som konsept og bruksområder for kavitasjon innen avlusingsoperasjoner. Det ble også besluttet i styringsgruppa at det skulle tas utgangspunkt i Hydrolicer som case for vurderingen. Dette er utenfor det originale omfanget av prosjektet og er derfor vedlagt her. Det ble ikke gjennomført praktiske tester i dette prosjektet.

7.1 Kavitasjon

Kavitasjon er dannelse av gassbobler forårsaket av trykkendringer i fluidet, for eksempel forårsaket av hastighetsendringer over en hydrofoil (Michel, 2001, Mortensen et al., 2015). Kavitasjon er ofte et uønsket fenomen ettersom store erosjonskrefter kan oppstå og forårsake skader på mekanisk utstyr som propeller og ventiler.

Kavitasjon kan imidlertid utnyttes til desinfeksjons- og rengjøring, ettersom den lokale kraft- og temperaturøkningen som oppstår når kavitasjonsboblene kolliderer, er stor (Kalumuck et al., 2003). Kavitasjon kan derfor utnyttes til både rengjøring av overflater (Omel'yanyuk, 2013), desinfeksjon av vann (Jyoti et al., 2001, Gaines et al., 2007, Gogate et al., 2009, Save et al., 1997, Dahle et al., 2016), utlufting av fluider (Raut et al., 2012).

Kavitasjon kan oppstå i fluider på ulike måter. Typiske metoder for å inducere kavitasjon i et fluid omfatter:

- 1) Jet-indusert kavitasjon: Et fluid, f.eks. vann pumpes gjennom spesielt utformede dyser hvor kavitasjonsbobler oppstår og rives med ut av dysa. Jetstrålen inkludert kavitasjonsboblene kan anvendes til f.eks. overflaterengjøring og desinfeksjon.
- 2) Ultralydindusert kavitasjon: Piezoelektriske svingere ("ultralydhøytalere") plasseres i fluidet og sender ut lydølger som forårsaker kavitasjon. Dette anvendes f.eks. i rengjøringsbad og til kavitasjon av strømning i rør.
- 3) Vibrerende sonder: Sonder (spesielt utformede metallstaver) plasseres inn i et fluid. Gjennom mekanisk vibrasjon med høy frekvens kaviterer fluidet rundt sonden. Denne teknikken brukes blant annet til homogenisering (blanding) av flere fluider, knusing av celler og til desinfeksjon.
- 4) Superkaviterende impellere: I spesialiserte applikasjoner, eksempelvis forflytning av kryogenisk flytende gass hvor kavitasjon lett oppstår, kan superkaviterende impellere benyttes. Dette er en type impeller som er laget for at kavitasjonsboblene som oppstår kolliderer så langt nedstrøms impelleren at de ikke lenger gjør skade. Dette er et prinsipp som blant annet benyttes i rakettmotorer innen romfart for å frakte store mengder kryogenisk drivstoff raskt nok uten å måtte benytte en stor, tung pumpe.

7.2 Kavitasjonsutstyr og mulig anvendelse i Hydrolicer

7.2.1 Utstysleverandører

Det finnes en rekke kommersielt tilgjengelig utstyr som kan inducere kavitasjon. Et utvalg relevante leverandører av utstyr for kavitasjon til rengjøring og desinfeksjon av vann både i rør og større volum er gitt i Tabell 4

Tabell 4: Leverandører av kavitasjonsutstyr

Aqua Farming Solutions	http://www.aquafarming.solutions/
Dynaflow Inc.	http://www.dynaflow-inc.com/
Cavidyne LLC	http://www.cavidyne.com/
Cavi Jet cavitation systems	http://www.cavi-jet.com/
Hielscher	https://www.hielscher.com/

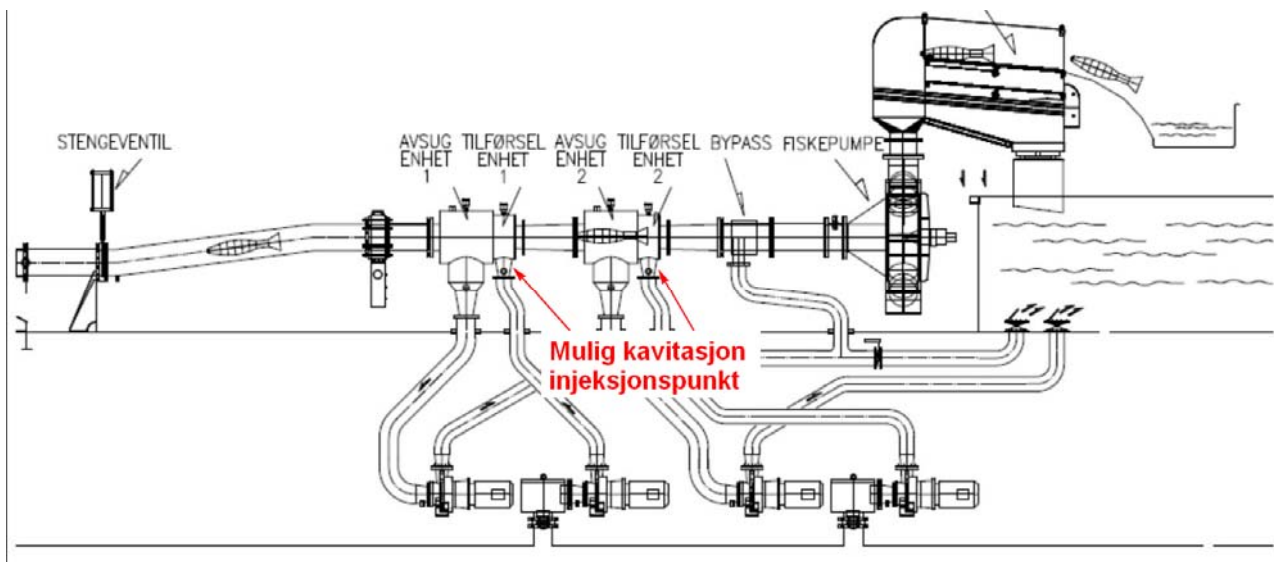
7.3 Kavitasjon til anvendelse i Hydrolicer-konseptet

7.3.1 Mulig implementasjon

Introduksjon av kavitasjonsbobler i Hydrolicer kan skje gjennom anvendelse av ulike kavitasjonsprinsipp. Til tross for at kavitasjon har en veldokumentert desinfiserende effekt er det erfaringsmessig vanskelig å nyttiggjøre seg av denne effekten i industriell skala, som avlusingsoperasjoner med tilhørende vannvolum og strømningsrater. Skal man likevel undersøke kavitasjon som et supplerende prinsipp i Hydrolicer, kan man se for seg følgende alternativ:

Jet-indusert kavitasjon:

Jet-indusert kavitasjon innebærer at kavitasjonsboblene bæres inn i en vannstrøm som del av en høyhastighets vannstråle. Å direkte usette fisken for høyhastighets vannstråler kan være skadelig for fisken. Kavitasjonsdyser kan trolig injisere kavitasjonsbobler inn i tilførselsenhetene (Figur 21), som så transporteres inn i hovedstrømmen.

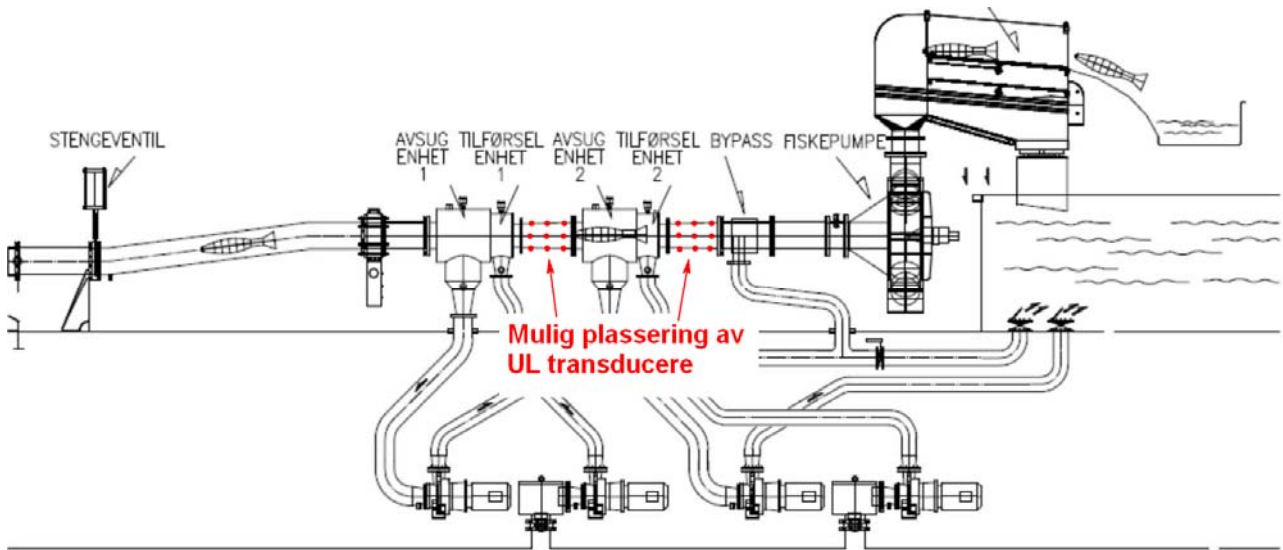


Figur 21: Mulig kavitasjon injeksjonspunkt for jet induert kavitasjon.

Det er uvisst hvor lenge kavitasjonsboblene vil overleve i et kaotisk strømningsregime som det man må forvente i Hydrolicerenhetene. Det vil derfor være viktig å benytte flest mulig kavitasjonsdyser for å introdusere en størst mulig mengde kavitasjonsbobler i vannstrømmen. Kavitasjonsdyser kan anskaffes ved å kontakte dyneflow.inc (<http://www.dynaflow-inc.com/Products/Jets/Jets-Cavitating.htm>) eller cavidyne (<http://cavidyne.com/products/>).

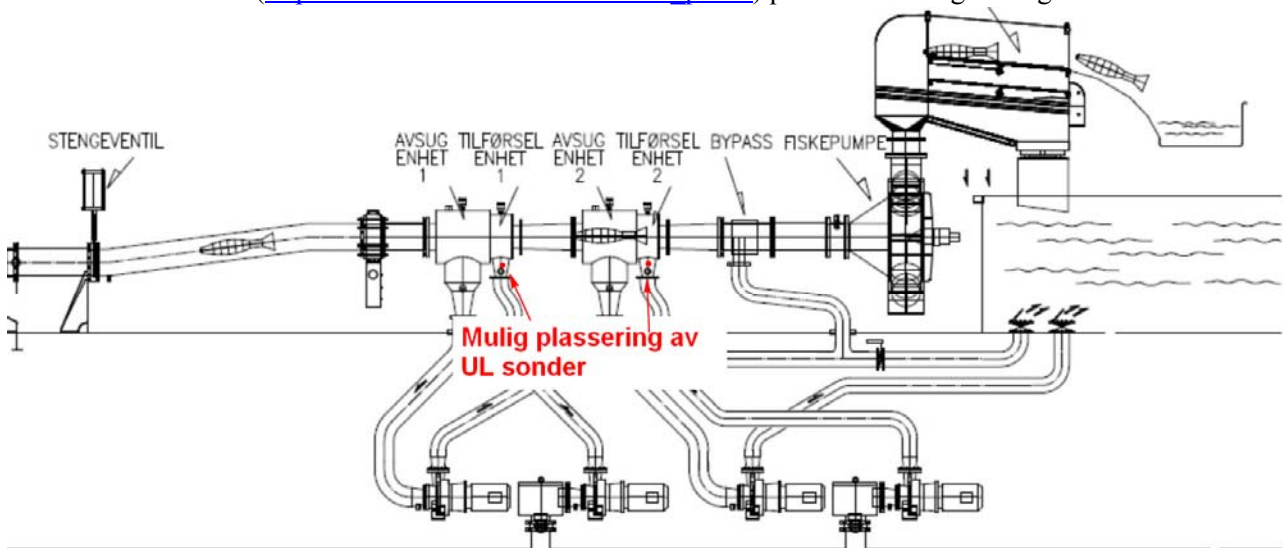
Ultralydindusert kavitasjon:

Det kan bygges en rørgate utstyrt med en UL transducere som kan erstatte rørgaten mellom de to avskog/tilførselsenhetene, eventuelt rørgaten nedstrøms avskog/tilførselsenhet 2. UL transducerene kan for eksempel være av tilsvarende type som anvendes i Aqua Farming Solutions sin C-Dome. En rekke transducere kan monteres rundt periferien langs lengden til rørgaten (Figur 22)



Figur 22: Mulig plassering av UL transducere.

Ultralydbasert kavitasjon kan også bæres inn i hovedstrømmen ved bruk av innstikkssonder, eksempelvis Hielscher UIP16000 (https://www.hielscher.com/i16000_p.htm) plassert som angitt i Figur 23.



Figur 23: Mulig plassering av UL sonder

Under en eventuell test bør det vurderes å kjøre fisk gjennom systemet, først med kun fiskepumpen aktivert. Deretter kan fisk kjøres gjennom systemet med ultralydindusert kavitasjon, og fiskepumpe aktivert. Tilhørende lusetellinger før og etter gjennomkjøring for de to tilfellene vil trolig kunne gi en indikasjon på hvorvidt kavitasjon har en tilleggs effekt eller ikke.

7.3.2 Andre betraktninger

Energibetraktninger:

Det må påregnes et betydelig energiforbruk for å kavitere vannet i Hydrolicer. Et industrialisert kavitasjonssystem som Hielscher UIP16000 krever 4 sonder á 16kW til kavitasjon/desinfeksjon av en algeholdig vannstrøm på 12000 liter i timen (https://www.hielscher.com/ui16000_p.htm). I en Hydrolicer er det betydelig større vannvolum, men også større målorganismer enn alger. Det anbefales derfor å gjøre en mulighetsstudie i samarbeid med valgte leverandør av kavitasjonsteknologi forut for forsøket for å sannsynliggjøre at løsningen som velges vil kunne ha en effekt. SINTEF har per i dag samarbeid med norske selskap som kan bidra i en slik sammenheng.

Materialbetraktninger:

Kavitasjon er i de fleste tilfeller et uønsket fenomen ettersom det fører til materialerosjon. Det må påregnes at utstyr som over tid er eksponert for kavitasjonsbobler vil svekkes. Et eventuelt fremtidig vedlikeholdsregime må ta høyde for dette.

Felttest:

Under en eventuell test bør det vurderes å kjøre fisk gjennom systemet, først med kun fiskepumpen aktivert. Deretter kan fisk kjøres gjennom systemet med tilførselsenheter/kavitasjon, og fiskepumpe aktivert. Tilhørende lusetellinger før og etter gjennomkjøring for de to tilfellene vil trolig kunne gi en indikasjon på hvorvidt kavitasjon har en tilleggseffekt eller ikke.

Forsøksdyrtillatelse:

Det understrekes at enhver test med kavitasjonsteknologi på levende fisk som skissert i dette dokumentet vil kreve forsøksdyrtillatelse, og er en ufravikelig forutsetning for videre arbeid.



Teknologi for et bedre samfunn

www.sintef.no