



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

Masteroppgave 2016 30 stp  
Institutt for Husdyr- og akvakulturvitenskap

## **Påvirker fôropptak hos Niltilapia eller en forurenset algekultur *Chlorella sorokiniana*'s kapasitet som biofilter?**

Does feed intake of Nile tilapia or a polluted algae culture have an effect on *Chlorella Sorokiniana*'s capacity as biofilter?

Jørgen N. Skeide  
Master of Science in Aquaculture



**Påvirker fôropptak hos Niltilapia eller en forurenset  
algekultur *Chlorella sorokinianas* kapasitet som biofilter?**

**Does feed intake of Nile tilapia or a polluted algae culture  
have an effect on *Chlorella Sorokiniana*'s capacity as  
biofilter?**

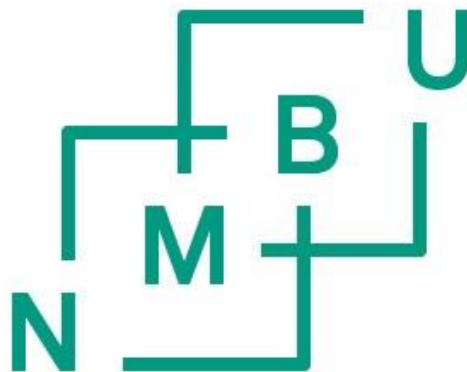
**Masteroppgave 30 stp.**

**Jørgen Norvik Skeide**

**Institutt for Husdyr- og akvakulturvitenskap**

**Norges miljø- og biovitenskapelige universitet**

**Ås 2016**





## Sammendrag

Den encellede grønnalgen *Chlorella sorokiniana* har potensial til å erstatte konvensjonell bruk av nitrogenoksyderende bakterier i biofilter for å fjerne ammoniakk fra fiskens proteinkatabolisme i resirkulerte akvakultursystemer (RAS). I konvensjonelle RAS blir ammoniakk ( $\text{NH}_3$ ) nitrifisert til nitritt ( $\text{NO}_2^-$ ) som så nitrifiseres til nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) som akkumuleres i vannet. *Chlorella sorokiniana* tar opp  $\text{NH}_3$  og inkorporerer det i aminosyrene. Fosfater er et begrensende næringsstoff for algeveksten, det er funnet en sterk lineær korrelasjon mellom gjødsling med fosfat ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) og evne til å fjerne  $\text{NH}_3$ . Fosfater og kationiske elementer ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  og  $\text{Zn}^{++}$ ) blir også bundet i biomassen. Via fotosyntetisk aktivitet binder algene karbon fra  $\text{HCO}_3^-$  og holder pH stabilt høyere etter fôring. Reduseringen av hydrogen ioner ( $\text{H}^+$ ) senker graden av toksisk ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) i vannet.

Målet for denne studien var å se på om et forurenset algemiljø eller fôropptak hos *Niltilapia* (*Oreochromis niloticus*) hadde en påvirkning på *Chlorella sorokinianas* kapasitet for fjerning av ammoniakk fra fiskens proteinkatabolisme.

Tolv tanker med én *Niltilapia* (68 g til 187 g) i hver tank var tilknyttet hver sin bioreaktor. Bioreaktoren bestod av en 7m klar plastslange, limt sammen til spiraler i ett LED belyst, aluminiums-kledd kammer. Før forsøksstart ble alle tankene overmettet med  $\text{PO}_4^{3-}$  og fisken ble fôret 80% av metthetsfølelsen. Halvparten av tankene hadde en antatt forurenset algekultur, mens den andre halvparten hadde en nyetablert ren kultur med *Chlorella sorokiniana*. Konsentrasjonen av  $\text{NH}_3$ , og  $\text{NO}_2^-$  ble målt hver time i fem timer etter fôring.  $\text{PO}_4^{3-}$  - konsentrasjonen ble målt før fôring og etter fem timer.

$\text{PO}_4^{3-}$  ble nyttiggjort i stor grad observert ved en halvering i konsentrasjon fra 2.20 til 1.24 mg/L. En toveis ANOVA påviste ingen signifikante korrelasjoner mellom ren og forurenset algekultur og konsentrasjon av  $\text{NH}_3$  ( $P>0.12$ ) og  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $P>0.46$ ). Gjennomgang av preparater i mikroskop viste en forskyvning av fremmede organismer, og sterk algevekst i den forurensete algekulturen ved gjødsling. Det var heller ingen signifikant lineær korrelasjon mellom fôropptak og fjerning av  $\text{NH}_3$  ( $P>0.34$ ) og  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $P>0.10$ ) i spennet 0.4 g til 2.3 g. Forurenset algekultur eller varierende fôringsmengde hadde ingen effekt på *Chlorella sorokinianas* evne til å fjerne  $\text{NH}_3$ .



## **Forord**

Først og fremst må jeg takke Stortinget for å vedta fusjon med tilhørende rivning av fiskelabben akkurat det året min masteroppgave stod for tur. Dette ble starten på noen frustrerende runder med mislykkede oppsett. Med særskilt fokus på ernæring og ledelse i mitt masterprogram var alger og resirkulasjon en brå overgang. Men etter en slags symbiose mellom Professor Storebakken og AQN-350-klassen fikk vi til slutt laget et bra oppsett.

Jeg må takke prof. Storebakken for all hjelp jeg har fått gjennom hele masterprogrammet mitt og nå for all tid brukt på en tidvis frustrert og fortapt student. Jeg må også takke min forlovede Charlotte Norseng for støtte og korrekturlesing. Sodbilig Uriyanghai og Dejan Knezevic har min største takknemmelighet for å ha frivillig hjulpet til under forsøket og for å hele tiden vært tilgjengelig for mine spørsmål. Til slutt må jeg få takke og gratulere AQN-350-klassen for helt ekstraordinær innsats og resultater i årets semester.





# Innholdsfortegnelse

Sammendrag .....	I
Forord .....	II
Innholdsfortegnelse .....	III
Tabeller og figurer .....	IV
1 Introduksjon .....	1
1.1 Premisser .....	1
1.2 <i>Chlorella sorokiniana</i> som biofilter i fiskeoppdrett .....	1
1.3 Mål for studien .....	3
2 Materiale og metoder .....	4
2.1 Fisk og røktning .....	4
2.2 Alger .....	4
2.3 Tanker og bioreaktor .....	4
2.4 Forsøksdesign og statistisk analyse .....	5
2.5 Fôr .....	7
Tabell 2.2: Formulering av forsøksdietten. ....	7
2.6 Fôropptak .....	8
2.7 Vannkvalitet .....	9
3 Resultat og drøfting .....	10
3.1 Generelle tendenser .....	10
3.2 Drøfting av generelle tendenser .....	11
3.3 Algekilder .....	12
3.4 Drøfting av algekilder .....	16
3.5 Fôropptak .....	17
3.6 Drøfting av fôropptak .....	18
4 Konklusjon .....	19
Kilder .....	20



## Tabeller og figurer

Figur 1.1: Deaminering av glutaminsyre (University of Leeds, 08.07.2016). .....	2
Figur 2.1: 3D-modell av forsøksoppsettet. Tolv tanker, med skillevegg, og individuelle reaktorer. Kun slangene til den ene spiralen er tegnet inn. ....	5
Tabell 2.1: Fosfornivå i tankene etter metning og stabilisering. ....	6
Tabell 2.2: Formulering av forsøksdietten .....	7
Utfyllende informasjon vedrørende opphav og innhold refereres til Latif (2016).....	7
Figur 2.2: En av oppsamlerne brukt under forsøket. ....	8
Figur 3.1: Stolpediagram som viser forskjell i gjennomsnittlig fosfornivå ved 0. og 5. måling. ....	10
Figur 3.2: Punktdiagram med rette linjer for NH <sub>3</sub> -konsentrasjon i mg/l i samtlige tanker for alle målinger inkludert 0-prøven (1). ....	11
Figur 3.3: Preparat fra veggen på tank 12. Bilde tatt fra mikroskop med x 40 forstørrelse. ....	12
Tabell 3.1 NH <sub>3</sub> og PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> mot algemiljø som kategorisk variabel (toveis ANOVA). ....	12
Figur 3.4: Boksplokk av ammoniakk mot algekultur (1 = ren, 2 = forurenset) for første måling. ....	13
Figur 3.5: Boksplokk av ammoniakk mot algekultur (1 = ren, 2 = forurenset) for siste måling. ....	13
Figur 3.6: Preparat fra ren algekultur (A, C, E, G) og forurenset algekultur (B, D, F, H). (Foto: Jørgen Skeide, Dejan Knezevic). Bilder tatt fra mikroskop. ....	15
Tabell 3.2: Mengde fôr distribuert og fortært i gram. ....	17
Tabell 3.3: Resultat fra regresjonsanalyse gjort for alle fem måletidspunkter for NH <sub>3</sub> og de to gjort for PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> . ....	18



# 1 Introduksjon

## 1.1 Premisser

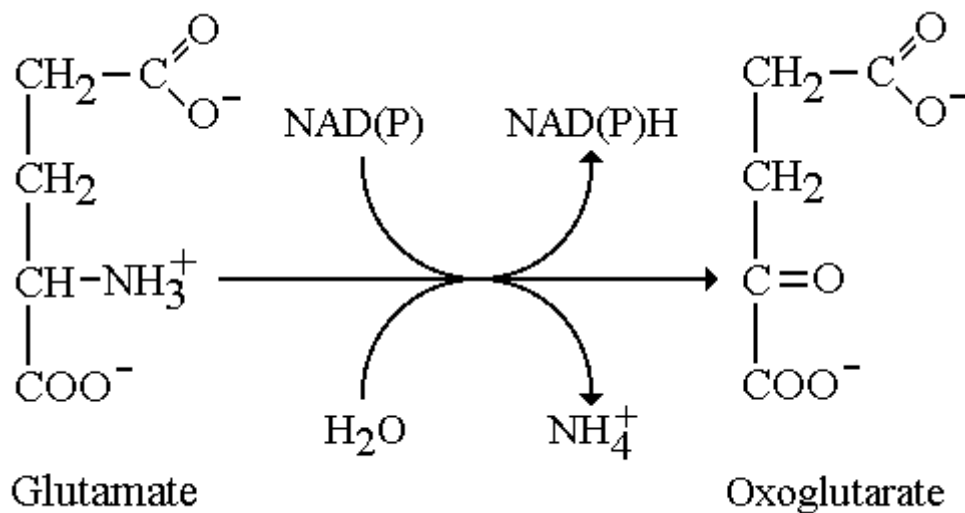
Menneskelige fremskritt har fremprovosert store endringer i hvordan vi produserer mat. Fra lokalt produsert animalske og vegetabiliske kilder med lukkede nitrogen- og fosforsykluser, er den industrielle matproduksjonen preget av ekstern gjødsling, gjerne hentet ut fra et annet kontinent, og med store utslipp. Moderne fiskeoppdrett har få eller ingen mekanismer for å fange opp næringsstoffer fra avfall. Det samme kan sies om moderne sanitering, der kloakk blir rensert for farlige stoffer før resten går indirekte eller direkte ut i havet. Da fosfor er en begrenset kilde (Cordell *et al.* 2009) og nitrogen-utslipp forårsaker tap i biodiversitet og økning av potensielt giftige algeoppblomstringer (Fields 2004), bør en se på måter å nyttiggjøre eller fange opp disse næringsstoffene. For voksne mennesker er mengden fosfater og nitrogen vi skiller ut, omtrent lik mengden vi fortærer ettersom muskler og skjellet ikke lenger vokser og trenger disse stoffene (Jönsson *et al.* 2004). Potensialet for å fange opp og nyttiggjøre disse næringsstoffene er dermed stort.

Hovedhensikten til akvatiske resirkulasjons-systemer, RAS (recirculating aquaculture system) er og redusere vannbruken. Det spås at også i mer primitive dam-systemer vil RAS etter hvert bli tatt i bruk som et tillegg eller som et fullstendig alternativ (Gutierrez-Wing & Malone 2006). Kunnskapsoverføring fra dette fagfeltet til human avløpsteknologi kan gi nye miljøvennlige løsninger.

Som preliminare forsøk på dette fagfeltet har det blitt gjort to studier ved NMBU. Latif (2016) så på fosfat ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) som begrensende faktor i et eksperimentelt oppsett med *Chlorella sorokiniana* for å fjerne ammoniakk fra oppdrettsvannet og Niltilapia (*Oreochromis niloticus*) som oppdrettsorganisme. Knezevic (2016) analyserte bruksområdene til forskjellige *Chlorella*-stammer som potensiell kilde til fôr.

## 1.2 *Chlorella sorokiniana* som biofilter i fiskeoppdrett

Fôret til de mest oppdrettede fiskeartene har et høyt proteininnhold (20-50 %). Ved deaminering (Fig. 1.1) (fjerning av aminogrupeer fra aminosyrer) nyttiggjør fisken de aminosyrene som ikke brukes til muskelbygging som substrat for glukose og energi: Aminogruppen i aminosyrene reduseres til ammoniakk ( $\text{NH}_3$ ) som skilles ut over gjellene via diffusjon (Hoar *et al.* 2001). I en studie av Porter *et al.* (1987), viste at hos Dorade (*Sparus aurata*) var fôropptaket proporsjonalt med utslippet av  $\text{NH}_3$ .



**Figur 1.1:** Deaminering av glutaminsyre (University of Leeds, 08.07.2016).

I konvensjonelle RAS brukes bakterier i slektene *Nitrosomonas* og *Nitrospira* til å oksidere henholdsvis  $\text{NH}_3$  og nitritt ( $\text{NO}_2^-$ ) (Interdonato 2012). Der disse bakteriene kun fjerner nitrogenbindingene tar *C. sorokiniana* opp  $\text{NH}_3$  og nyttiggjør det i aminosyresyntesen (Kim *et al.* 2010) og ved lys og andre vekstmedier multiplisere seg til å bli en koloni der fisken kan redusere fôrforbruket ved hjelp av algfiltrering (Priyadarshani *et al.* 2012). For å skape et produkt av høyere kvalitet kan algene høstes under produksjon og avhengig av ønsket produkt prosesseres på flere måter (Knezevic 2016).

I innendørs industrielle RAS blir ikke fosfatene bundet opp men skylt ut via utløpsvannet (Rijn 2013). I et system med alger vil fosfat få en viktig rolle. Fosfat regulerer både metabolisme, cellevekst og kjemisk sammensetning av algecellen. Mangel på  $\text{PO}_4^{3-}$  senker det gunstige høye proteinnivået til fordel for lipider (Liang *et al.* 2013). Latif (2016) fant en sterk lineær korrelasjon mellom gjødsling med  $\text{PO}_4^{3-}$  og evne til å fjerne  $\text{NH}_3$  og viste at gjødsling med  $\text{PO}_4^{3-}$  var en forutsetning for effektiv bruk av *C. sorokiniana* til å rense vann i RAS.

*C. sorokiniana* har også fordelen ved å binde kationske elementer ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  og  $\text{Zn}^{++}$ ) som er nyttig for cellevekst, i stedet for å la de akkumuleres i vannet (Knezevic 2016). Med bruk av bioreaktorer, eller soleksponerte dam-anlegg vil algene produsere  $\text{O}_2$  som et biprodukt fra fotosyntesen. Når algene bruker  $\text{CO}_2$  fra vannet i form av karbonsyre ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) vil dette øke pH og dra likevekten i reaksjonen  $[\text{H}_2\text{CO}_3 + 2\text{NH}_3 \rightleftharpoons (\text{NH}_4^+)_2\text{CO}_3]$  mot venstre. Dette senker konsentrasjonen av svært giftig ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ).

### 1.3 Mål for studien

Denne oppgaven må ses på som en videreføring av forsøket til Latif (2016) der han så på  $\text{PO}_4^{3-}$  som et begrensende næringsstoff. Denne oppgaven er todelt ettersom ønsket er å se på de praktiske bruksområdene med *C. sorokiniana* som ammoniakk-fjerner i RAS.

I åpne industrielle rensesystemer vil det være vanskelig å holde algekulturen helt ren. Skal man rense restvannet fra kloakk må man regne med forskjellige typer forurensning, og i ferskvannssystemer trengs det en tilføring av nytt vann hvor fremmede algesporer kan komme med. Første del av oppgaven blir derfor å se på hvordan et antatt forurenset miljø påvirker kapasiteten til *C. sorokiniana* som biologisk resirkulasjons-organisme.

Andre del av studien ser på hvordan *C. sorokiniana* takler et spenn i konsentrasjon av ammoniakk forårsaket av ulikt fôropptak. Fiskeoppdrett vil ha svingninger både i biomasse og fôropptak, og dermed mengde  $\text{NH}_3$ . Mengden næringsstoffer i kloakk vil også ha ukontrollerbare svingninger som systemet må være i stand til å takle.

De to spørsmålene som stilles i denne oppgaven er som følger:

- Har en antatt forurenset algekultur en effekt på fjerning av ammoniakk, nitritt, og fosfat?
- Har forskjeller i fôringsopptak en effekt på fjerning av nitritt, ammoniakk og fosfat?

## 2 Materiale og metoder

### 2.1 Fisk og røktng

Ut i fra et oppsett beskrevet i Latif (2016), ble forsøksoppsettet installert hos Institutt for husdyr- og akvakulturvitenskap, NMBU. I forsøket ble det benyttet Niltilapia (*O. niloticus*) (12. generasjon fra GIFT stammen). Syv individer fra tidligere forsøk ble videreført, og ut i fra en begrenset restbeholdning ble fem individer overført til de resterende tankene. Dødeligheten i tankene antas å være grunnet aggressivitet mellom fisken i et forsøk på å holde to individer i samme tank. Snittvekt etter forsøksdagen var på 125 g med spenn fra 68 g til 187 g. Fisken ble sultet før forsøket startet.

### 2.2 Alger

Før jul ble en ren kultur med alger (*C. sorokiniana*, stamme NIVA CHL176) levert av NIBIOs biogass-lab, introdusert i ti tanker. Rundt februar skapte en markant fargeendring mistanke om forurensning av blågrønn-alger og videre forsøk ble suspendert. Seks tanker beholdt den urene kulturen, utenom bioreaktoren som ble skiftet ut. Noe av kulturen som ble mottatt før jul stod uberørt i en kolbe, og via utvanning og gjødsling ble en ny ren kultur gradvis tilsatt seks nyinnkjøpte tanker og bioreaktorer. Denne kulturen ble gjødslet med urea, ren fosfor og monokalsiumfosfat til en så at kulturen var etablert i bioreaktoren.

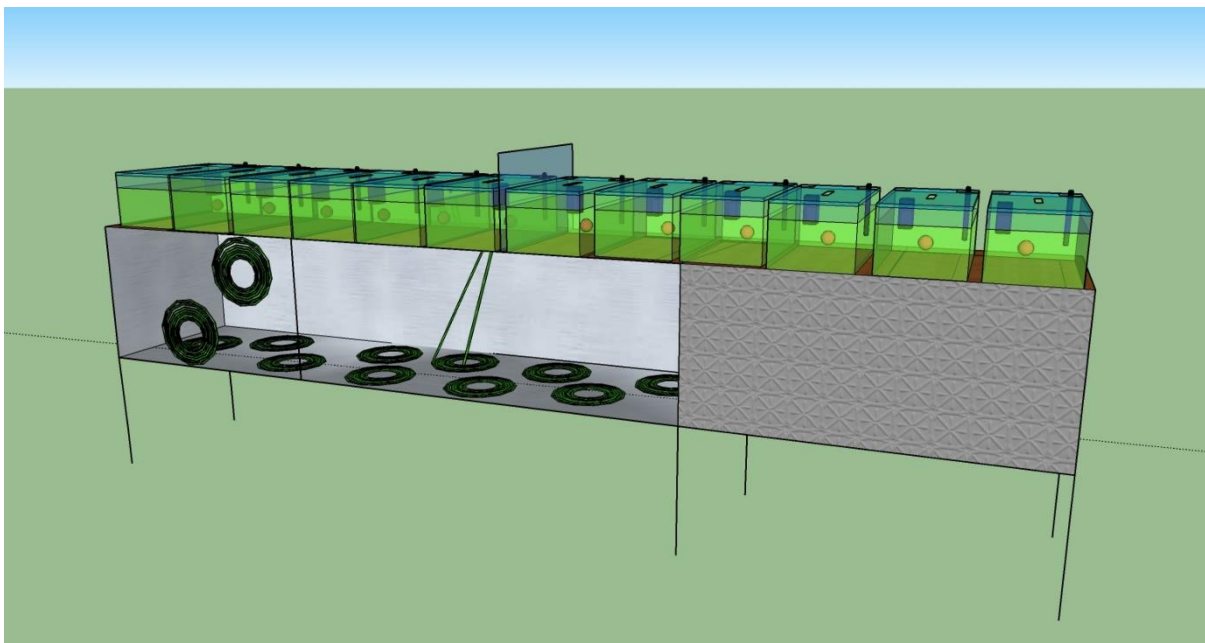
### 2.3 Tanker og bioreaktor

Tolv 20 L plast-tanker (35cm\*26cm\*23cm, Clas Ohlson, Ski) var arrangert med skillevegg (Fig. 2.1) mellom tank 6 og 7 for å unngå kontaminering mellom de to miljøene. Renkultur av *C. sorokiniana* ble benyttet i tank 1-6, mens en potensielt forurenset kultur ble benyttet i tank 7-12. I underkant av 12 L (11.8), ble oppvarmet og holdt stabilt på 27°C ( $\pm 2^\circ$  C), av ti stk. Eheim Jager 3611 25W og to stk. Trixie 87300 25W termostater. Hver tank hadde en mikro-poret luftestein koblet til en felles luftpumpe (Airset super 8500). Tolv stk. Marina 87300 25W vannfilter ble strippet for filter og fungerte som vannpumper til bioreaktorene.

Hver tank var koblet til sin egen bioreaktor (Fig 2.1). Algene ble eksponert til lys i 7 m PVC-slange med indre diameter 10 mm (Biltema, Frogn). Slangene ble limt sammen i spiraler og lagt i et aluminiumskledd kammer laget for god lysrefleksjon. Grunnet plassmangel ble to reaktorer montert vertikalt på den ene veggen. Hønsenetting ble lagt som underlag, og to sponfiber-plater ble skåret til for å dekke kammeret fullstendig. LED-dioder (EVOLYS™) fungerte som lyskilder, og fire identiske



plater med 16 dioder på hver plate ble montert med likt mellomrom i taket på kammeret. Disse fikk strøm via en 200W LED driver (Inventronics, EUD-200S070BT).



**Figur 2.1:** 3D-modell av forsøksoppsettet. Tolv tanker, med skillevegg, og individuelle reaktorer. Kun slangene til den ene spiralen er tegnet inn.

## 2.4 Forsøksdesign og statistisk analyse

Forsøket ble opprinnelig designet for toveis variansanalyse (ANOVA), med to fôringsregimer (appetittfôring, og halv rasjon bestemt ut fra appetittnivået) innen hver av de to algekvalitetene. Det var imidlertid stor variasjon i fôropptak innen de planlagte fôringsregimentene. Modellen ble derfor modifisert slik at analysen ble utført for faktorene algekvalitet ( $n=2$ ), tid (timer etter fôring;  $n=5$  for ammoniakk og nitritt i vannet,  $n=2$  for fosfat), med fôropptak som kovariat. Statistiske analyser ble gjort i SAS (versjon 9.4, SAS Institute, Cary, NC, USA). Grunnet gjennomgående store avvik ble Tank 12 ekskludert i analysen.

Alle systemene ble mettet med fosfat før forsøksstart da det er en sterk korrelasjon mellom fosfatgjødning og algens kapasitet for fjerning av ammoniakk (Latif 2016).

Forsøket startet 22. april med fôring, og estimering av fôropptak. Det ble fra 22.april daglig testet for fosfor- og ammoniakknivå, med tanke på både fiskehelsen og standardiseringen. 23. april ble det fôret for siste gang før testinnsamlingsdagen.

27. april var fisken sultet i fire dager og algekulturen hadde blitt godt etablert. Først skulle tankene mettes med fosfor på likt nivå. Syv tanker var mettet, to var overmettet og tre tanker var undermettet. De to overmettede tankene ble tynnet ut ved å fjerne forholdsvis seks (tank 2) og fire liter (tank 12). De undermettede tankene ble tilført fosfor via uttynnet  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  til en løsning som inneholdt ett gram  $\text{PO}_4^{3-}$  per liter. Der kalkuleringen stemte bra for utvanningen fungerte det ikke i tilsetningen og alle tre tanker ble overmettet. Etter de ble utvannet igjen, nådde de et akseptabelt nivå av fosfor (se Tabell 2.1).

**Tabell 2.1:** Fosfatnivå i tankene etter metning og stabilisering.

Tank	$\text{PO}_4^{3-}$ mg/L
1	1,5
2	2,32
3	2,39
4	2,51
5	2,15
6	2,43
7	2,55
8	2,53
9	2,17
10	2,27
11	1,29
12	2,28

Etter metningen ble ammoniakk, nitritt og temperatur målt i alle tankene (0-avlesningen) før fisken ble fôret. Alle tankene fikk 80 % mengde fôr av det som trengtes for å oppnå full metthetsfølelse. En time etter fôringen startet vi å teste ammoniakk og nitritt. Prøver ble tatt hver time i fem timer, og ved siste prøvetaking ble fosfor, oksygen og temperatur registrert i tillegg til ammoniakk og nitritt.

## 2.5 Fôr

For forsøket ble det produsert et plantebasert fôr bestående av hovedsakelig soyamel, maisglutenmel, forklistret potetstivelse og rapsolje. Resten av ingrediensene er listet opp i Tabell 2.2. Fôret hadde beregnet sammensetning på 28 % råprotein, 30 % stivelse og 6% fett i tørrstoff, basert på tabellverdier over råvarenes sammensetning. Fôret ble tilberedt ved IHA, der 3 kg av ingrediensene ble nøye målt opp og blandet. Soyamelet ble først behandlet med 0,304 g flytende fytase blandet i en liter vann (50° C) og fikk deretter hvile i 30 min. Etterpå ble alle mikro-ingrediensene og soyablandingen blandet i en kjøkkenmaskin (Kenwood major 1200 W). Deretter ble de øvrige tørre råvarene blandet i kjøkkenmaskinen, kombinert med det enzymbehandlede soyamelet i en pastadeigmikser (Moretti Forni Grain, Italy). Mikro-ingrediensene og soya-blandingen ble gradvis blandet inn i de tørre ingrediensene. Deigen ble deretter kjørt gjennom en pasta-ekstruder (P55DV Italy, Carasco, Italy) to ganger, siste gjennomkjøring med en 3 mm dyse og to kniver for passende pellet-størrelse. Fôret ble tørket i en varmlufts-tørker først ved 80° C i 10 min, så 100° C i fire min og tilslutt 90° C i tre min. Alle oppvarmingene hadde en pause imellom øktene der fuktigheten ble målt, og det ble sjekket om det forelå fargeforandringer som kunne tyde på Maillard-reaksjon.

**Tabell 2.2:** Formulering av forsøksdietten.

<b>Ingrediens</b>	<b>Gram</b>
Soyamel (DENOSOY)	600
Maisglutenmel	954
Forklistret potetstivelse	999
Rapsolje	129
Premix	30
StayC	30
Lysin	53,7
Metionin	14,7
Treonin	20,1
Tryptofan	3,93
Fenylalanin	8,1
Valin	20,7
Kalkstein	138

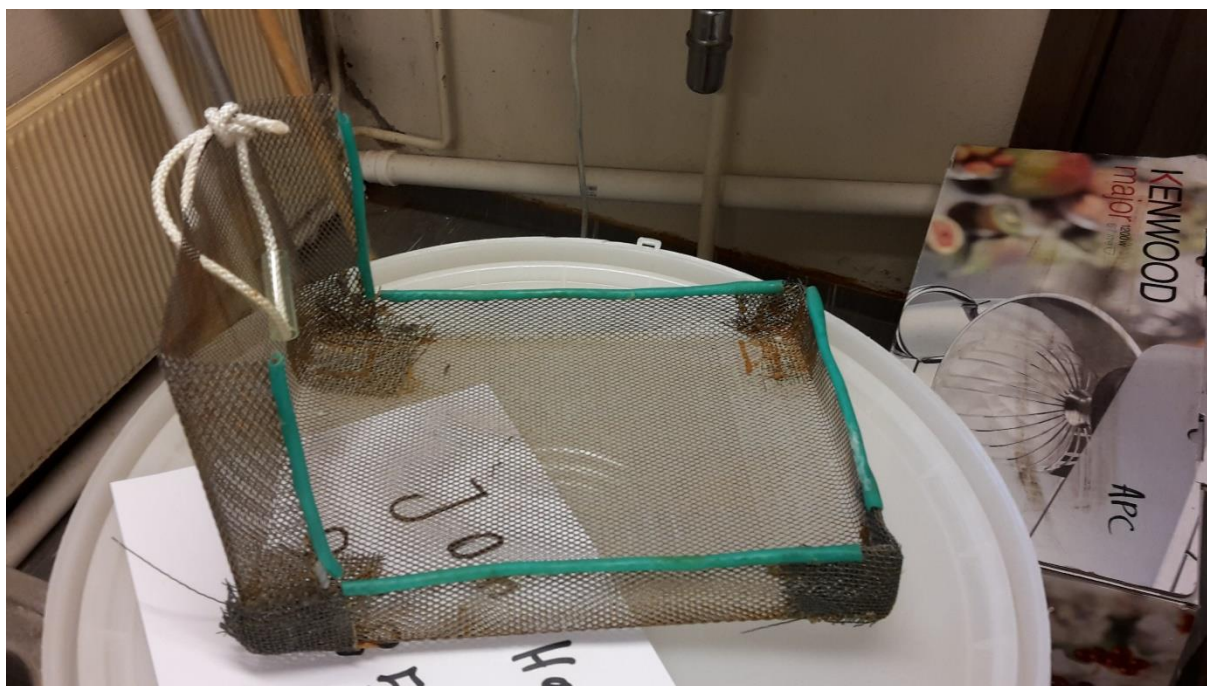
Utfyllende informasjon vedrørende opphav og innhold refereres til Latif (2016).

## 2.6 Fôropptak

Fem dager før testdagen ble fôropptak estimert. Niltilapia i hver av tankene ble håndfôret 100 pellets, og 30 min senere ble uspist fôr samlet og telt ved hjelp av oppsamlere. Av dette ble ett 80 % fôringsregime kalkulert.

Fôret ble sakte håndfôret av fire personer fordelt på hver sine tre tanker, i en ti minutters periode. 30 minutter etter påbegynt fôring ble uspiste pellets forsiktig tatt ut av tanken og telt opp. 100 pellets var på forhånd individuelt veid, og gjennomsnittlig pellet-vekt var 0.0322 g.

På grunn av liten sikt i vannet var ikke fôr-telling og innsamling med hevert et alternativ. Det ble derfor produsert en oppsamler av finmasket netting, med dimensjoner som stemte overens med bunnen på tankene. Den hadde en høy vegg og tre mindre vegger for å hindre pellets fra å trille av (se Figur 2.2). Denne skaper noe stress ved utsett og ble forsiktig plassert i tanken to timer før fôring for å minimere stress. Ved oppsamling ble oppsamleren løftet sakte opp og vinklet noe for at fisken skulle unnsnippe mens pelletene lå tilfredsstillende trygt.



**Figur 2.2:** En av oppsamlerne brukt under forsøket.

## 2.7 Vannkvalitet

Oppløst oksygen ble målt ved hjelp av en oksygensonde (OxyGurad, Handy MK III, Denmark), kalibrert ved å måle 100 % atmosfærisk oksygen. Ved måling ble sonden senket i vannet, og rørt sakte rundt i sirkler. Temperatur ble målt med et enkelt termometer.

For de andre variablene ble testkitt brukt: Fosfat (Merc Millipore, Darmstadt, Germany, 114848), ammoniakk (Merc Millipore, Darmstadt, Germany, 114752) og nitritt (Merc Millipore, Darmstadt, Germany, 114776). Vannprøver ble sentrifugert før testkittens vedlagte instruksjon ble fulgt. Prøvene ble så analysert i et spektrometer (Merc Millipore, Darmstadt, Germany, Nova 60 Spektroquant®) som oppga konsentrasjonene i mg/L.

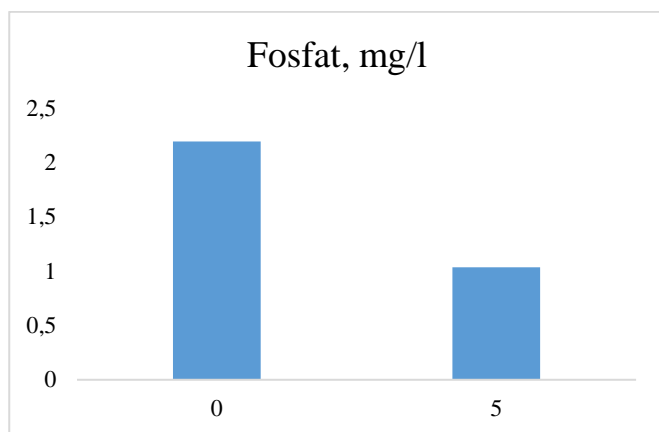
## 3 Resultat og drøfting

### 3.1 Generelle tendenser

Fisken i forsøket viste ingen tegn på unormal oppførsel, og sto rolig i vannmassen.

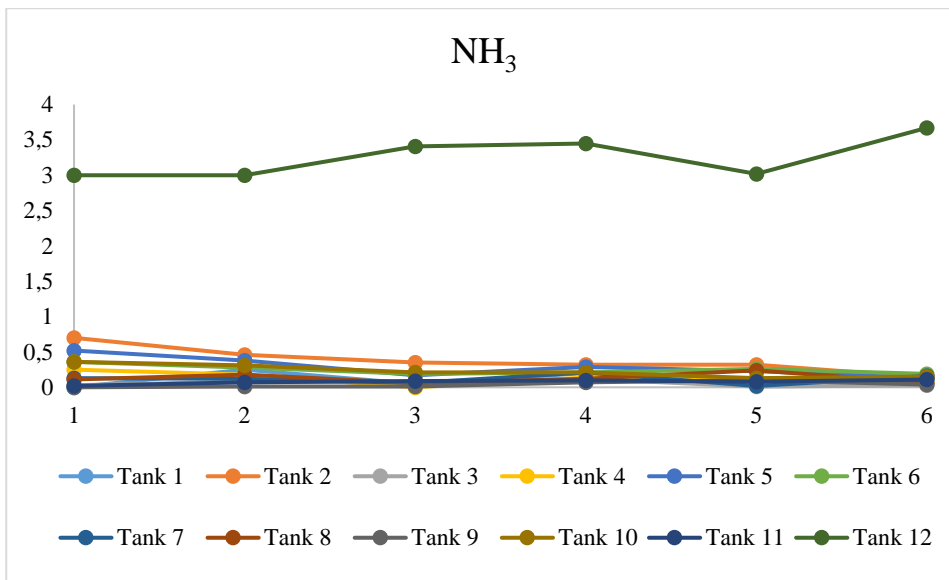
Konsentrasjonen av nitritt i vannet ( $0.35 \pm 0.04$ , gj.snitt  $\pm$  std.feil) var verken påvirket av algekvalitet ( $P=0.36$ ), samplingtidspunkt ( $P=0.90$ ), eller fôropptak ( $P=0.26$ ). Dette tyder på at det var sammenlignbar aktivitet av ammoniakk- (eller urea) oksiderende bakterier som *Nitrobacter* i alle de elleve karene, og at syntesen av nitritt ikke var raskere enn opptak av grønnalgene (og eventuelt andre mikrober) i vannet.

Fosfat ble kun målt ved 0 (start) og 5 timer (siste måling) (Fig 3.1). Mengden  $\text{PO}_4^{3-}$  ble nesten halvert (fra 2.20 (0) til 1.24 (5)). Halveringen viser at selv i et fosfatrikt miljø nyttiggjør algene effektivt store mengder fosfat på kort tid.



**Figur 3.1:** Stolpediagram som viser forskjell i gjennomsnittlig fosfatnivå ved 0. og 5. måling.

Generelt fungerte alle fotoreaktorene godt, med ett unntak; tank 12 (Fig. 3.2). Spektrometerets øvre grenseverdi var 3 mg/L  $\text{NH}_3$ , og samtlige målinger viste  $\text{NH}_3$ -verdier  $>3.00$ . Også for  $\text{NO}_2^-$  og  $\text{PO}_4^{3-}$  var konsentrasjonene konsekvent større i tank 12 enn i de andre. Dette var også tilfellet ved kontrollmålinger foretatt rutinemessig i to uker opp mot forsøket. Slangene i fotoreaktoren fra denne tanken hadde også lavere grønnfarge enn de andre. Resultater fra denne tanken ble ansett som ikke representative og utelatt fra statistiske analyser og presentasjoner.



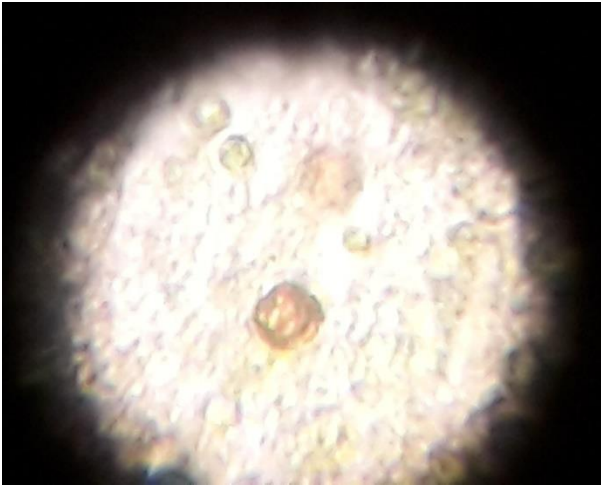
**Figur 3.2:** Punktdiagram med rette linjer for NH<sub>3</sub>-konsentrasjon i mg/l i samtlige tanker for alle målinger inkludert 0-prøven (1).

### 3.2 Drøfting av generelle tendenser

NO<sub>2</sub><sup>-</sup> ble akkumulert uavhengig av miljø (0.27 mg/L måling 1, 0.40 mg/L måling 5.). I Figur 3.2 ser man at NH<sub>3</sub> blir tydelig redusert i tank 1-11. Algene nyttiggjør tydeligvis NH<sub>3</sub> først, og målingene strekker seg ikke langt nok i tid til å se på effekten algene har på NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-konsentrasjonen.

Tankene ble mettet med fosfat fordi Latif (2016) fant en sterk lineær korrelasjon mellom opptak av PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> og fjerning av NH<sub>3</sub>. Den drastiske reduksjonen av PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> ((2.20 (0) 1.24 (5)) tyder på at algene, etter å ha blitt utsatt for en økt konsentrasjon av fosfater og nitrater fra fôring og gjødsling, har satt i gang en betydelig vekst, i tråd med Klasterska (1959) sine observasjoner.

Beslutningen med å ta ut tank 12 fra den statistiske behandlingen og resten av drøftingen var enkel. Nivåene av særlig NH<sub>3</sub> (>3.0 mg/L) var så høye at det ble åpenbart at denne tanken ikke hadde samme miljø som de andre i den forurensede gruppen. Årsaken bak forskjellen kan en ikke med stor sikkerhet påpeke. I figur 3.3 ser man to relativt store røde celler, som ble observert i mange av preparatene. Ved personlig gjennomgang av dette preparatet, og flere gjort av student Dejan Knezevic, er det tydelig at det eksisterer flere typer mikrobielle kulturer i denne tanken. *Chlorella*-kulturen ble skjøvet til side i selve tanken, og det var kun i bioreaktoren at en fant preparater der *Chlorella*-alger dominerte (Knezevic 22.06.2016, personlig meddelelse).



**Figur 3.3:** Preparat fra veggen på tank 12. Bilde tatt fra mikroskop med x 40 forstørrelse.

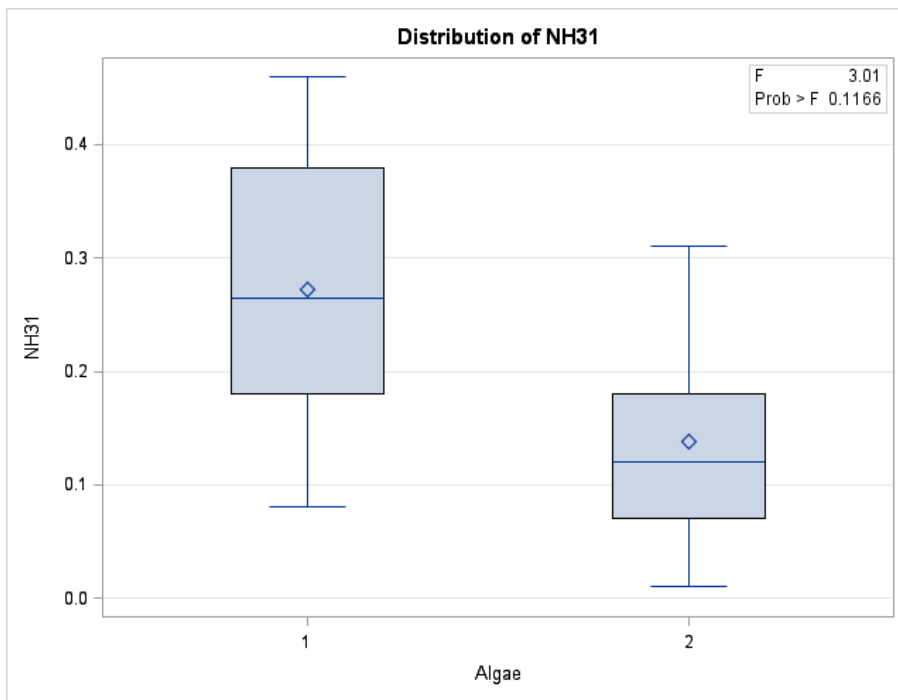
### 3.3 Algekilder

I tabell 3.1 er de viktigste resultatene fra SAS-utskriften fremstilt. Konsentrasjonen av  $\text{NH}_3$  og  $\text{PO}_4^{3-}$  fra de elleve tankene har blitt testet opp mot rent eller forurenset algemiljø i en toveis ANOVA-test. Forskjellen mellom  $\text{NH}_3$  i måling 1 og 5 er illustrert i figur 3.4 og 3.5. Boksplottene viser liten overlapp i time 1, og fullstendig overlapp i time 5. De høye P-verdiene ( $>0.12$ ) tilsier at ingen av resultatene er signifikante, og den mulige forskjellen må tilskrives en annen faktor som ikke er inkludert i vår modell.

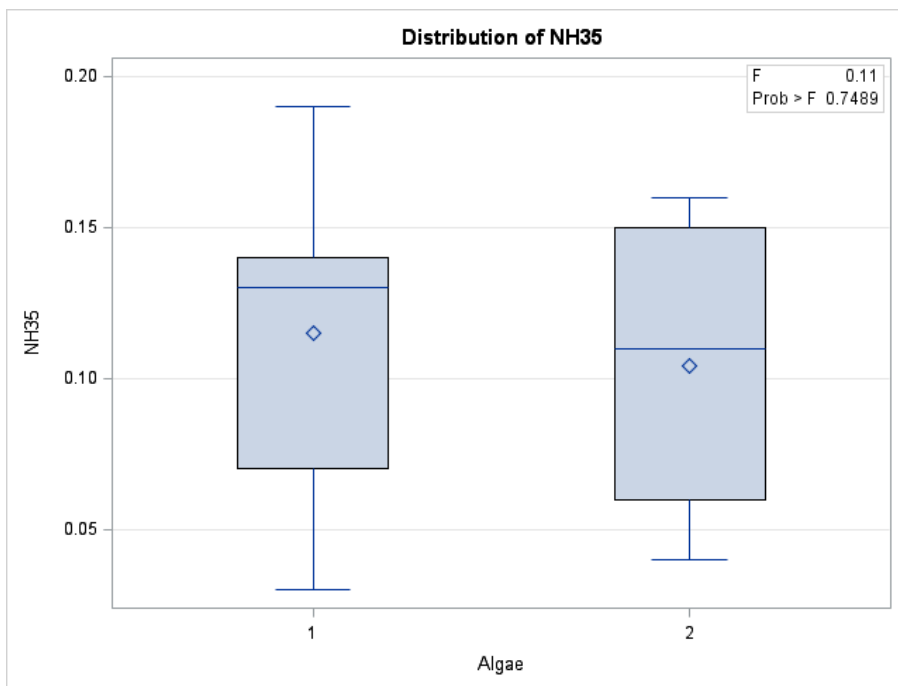
**Tabell 3.1**  $\text{NH}_3$  og  $\text{PO}_4^{3-}$  mot algemiljø som kategorisk variabel (toveis ANOVA).

Variabel	Tid	F-Verdi	P(F-Verdi)
$\text{NH}_3$	1	3.01	0.12
$\text{NH}_3$	2	0.71	0.42
$\text{NH}_3$	3	2.59	0.14
$\text{NH}_3$	4	0.59	0.46
$\text{NH}_3$	5	0.11	0.75
$\text{PO}_4^-$	0	0.04	0.84
$\text{PO}_4^-$	5	0.60	0.46



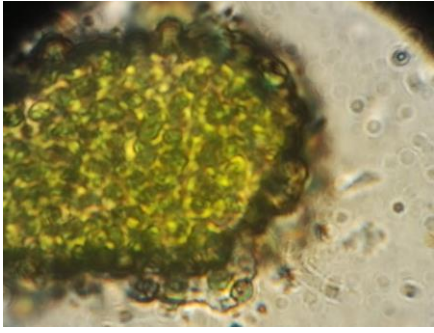


**Figur 3.4:** Boksploott av ammoniakk mot algekultur (1 = ren, 2 = forurenset) for første måling.

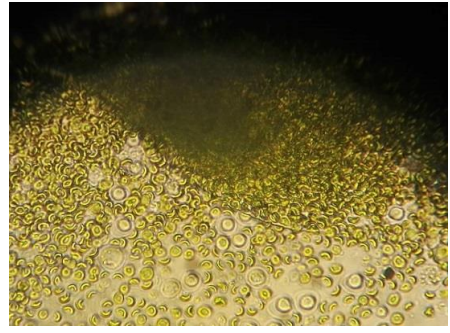


**Figur 3.5:** Boksploott av ammoniakk mot algekultur (1 = ren, 2 = forurenset) for siste måling.

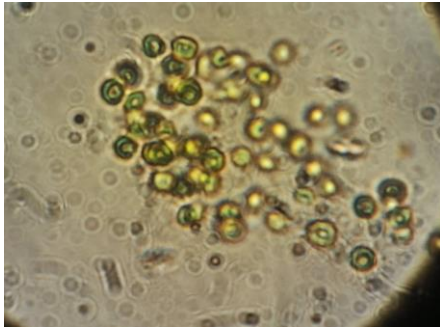
I Figur 3.6 ser man utviklingen av algekulturen i den rene og forurensede kulturen. Bilde A-F ble tatt under forberedelsene til forsøket. Flere preparater ble konstruert og sett på, fremstilt her av et representativt utvalg. Bilde A viser en ung kultur som hurtig vokser med homogene celler preget av store kloroplast organeller. Bildet B viser en allerede etablert kultur, med bleke celler der lipidakkumulasjon har fortrenget kloroplastorganellene grunnet suboptimale vekstforhold (Liang *et al.* 2013). Bilde C og E viser en fortsatt homogen kultur med få fremmedlegemer. Bilde D og F fra den forurensede algekulturen viser flere typer fremmede organismer observert i preparatene. Bilde D viser en fremmed alge, kolonisert i en fiberlignende membran. Bilde F viser en amøbe og andre bakterier av ukjent opprinnelse. G og H er tatt omtrent en måned etter fôring med konstant over-fertilisering av fosfater. Gjennomgangen av preparatene viste at miljøet i de forurensede tankene (med unntak av tank 12) hadde en algekultur lik den i de rene tankene med lavere tilstedeværelse av fremmede organismer.



A



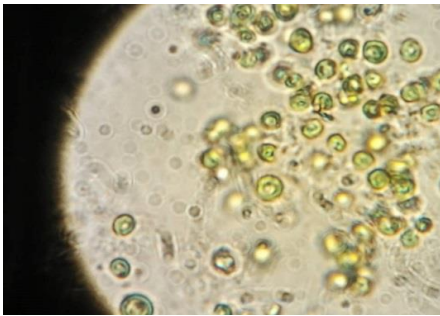
B



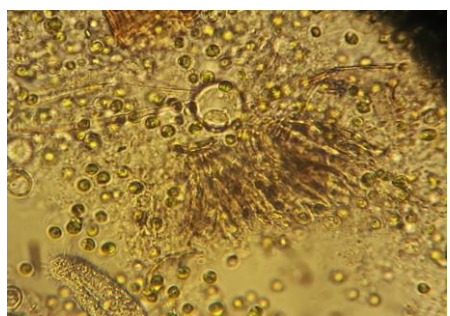
C



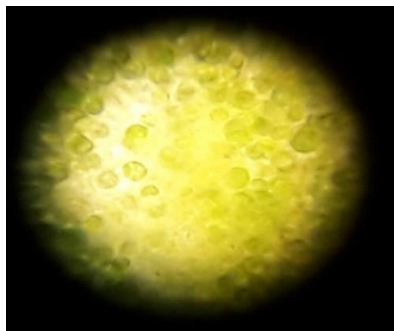
D



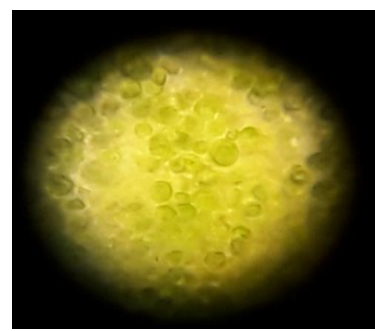
E



F



G



H

**Figur 3.6:** Preparat fra ren algekultur (A, C, E, G) og forurenset algekultur (B, D, F, H). (Foto: Jørgen Skeide, Dejan Knezevic). Bilder tatt fra mikroskop.

### 3.4 Drøfting av algekilder

Etter det tidligere forsøket av Latif (2016) kom det en mistanke om forurensning. Tankene utviklet en fargeendring, med markante variasjoner mellom tankene. Vannet hos tre tanker fikk en mørk grønnfarge, noen med blågrått skjær. Fisken i de tankene med størst fargevariasjon viste tegn på stress (høy aktivitet, mye vannsprut rundt tankene). Årsaken til fargeendringen kan komme fra fritt-flytende klorofyll, frigitt av alger ødelagt av mekaniske krefter i pumpen. Dette understøttes ved en grønnfarge som ikke lot seg sentrifugere ut. En annen årsak til fargeendringen kan være at i eldre populasjoner blir cellene forholdsvis store (Retovsky & Klasterska 1959), noe som kan skape en mørkere grønnfarge.

Etter forsøket ble det tatt prøver av materie fra tank-veggene og undersøkt i mikroskop. Som en ser i figur 3.6 var det kommet fremmedlegemer i de antatt forurensede tankene (A, C, E, G). Tilstedeværelse av *C. sorokiniana* som har skiftet over til lipid-akkumulering indikerer at i tiden opp mot forsøket har det vært en mangel på nitrogenholdige avfallsstoffer (Agirman. & Celtin 2015). Mangelen på føring denne perioden gjør at en også kan anta at det var en mangel på fosfater, noe som legger til rette for en stagnering av algevekst og en mulighet for andre organismer å komme inn. Den rene kulturen ble gjødslet opp frem til forsøkstart og her ble det observert få andre organismer. Dette kan tyde på at *C. sorokiniana* fortrenger andre organismer under rask vekst. Dette underbygges også av gjennomgang fra preparatene en periode etter forsøket med stabil gjødsling. Her var kulturen i begge miljøene blitt homogenisert med få tegn til andre organismer. Ser man dette i sammenheng med resultatene som viser at algemiljø ikke har noen effekt på opptak av hverken  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $P>0.46$ ) eller  $\text{NH}_3$  ( $P>0.12$ ) tyder det på at *C. sorokiniana* har en sterk nok vekstrate ved gunstige forhold at fremmede arter blir skjøvet bort og algene får fritt spillerom til å binde opp avfallsstoffene.

Det anbefales at dette sees på igjen med et mer standardisert oppsett. Den rene kulturen kunne med fordel vært kultivert like lenge som den utsatte forurensede kulturen for å bedre se forskjellen i utviklingsstadier og mikrofloraen. Det hadde også vært ønskelig med en DNA-analyse av mikrofloraen for å se spesifikt hvilke organismer som lever i dette miljøet, og hvilke forskjeller som finnes.

### 3.5 Fôropptak

Fôringsnivået lå på 80 % av metthetsfølelse, og halvparten av tankene hadde uspist fôr. Det er ingen åpenbar sammenheng mellom fôrmengde eller algemiljø og fôropptak. I Tabell 3.2 ser man at fôropptaket varierte fra 0.6 g til 2.3 g.

**Tabell 3.2:** Mengde fôr distribuert og fortært i gram.

Tank	Fôret pellets	Fôr gram	Uspist pellets	Uspist gram	Inntak g
1	27	0,8694	0	0	0,8694
2	19	0,6118	0	0	0,6118
3	16	0,5152	5	0,161	0,3542
4	46	1,4812	6	0,1932	1,288
5	74	2,3828	2	0,0644	2,3184
6	38	1,2236	1	0,0322	1,1914
7	34	1,0948	0	0	1,0948
8	40	1,288	1	0,0322	1,2558
9	28	0,9016	0	0	0,9016
10	24	0,7728	0	0	0,7728
11	45	1,449	13	0,4186	1,0304

Fra SAS fikk man en regresjonsanalyse vist under i Tabell 3.3. Likningen viser et uttrykk for  $\hat{y} = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 x$ , der konsentrasjon av ammoniakk og fosfor i de forskjellige tidspunktene måles opp mot fôropptak (FI).  $R^2$  verdiene ligger på eller under 0.10 for alle variablene bortsett fra fosfor målt ved forsøksslutt.  $R^2$  verdiene viser at fôropptak mot ammoniakk og fosfor konsentrasjon ikke klarer og godt forklare variansene en ser. P-verdiene for stigningstallet er i alle målinger ikke signifikante ( $P > 0.10$ ) og med god margin. Man kan ikke med disse dataene si at det er en klar korrelasjon mellom fôropptak og  $\text{NH}_3/\text{PO}_4^{3-}$  verdier. Snur en på det kan en si at algene, i en 7 m bioreaktor (11.8 L vann totalt) klarte å ta opp mengden  $\text{NH}_3$  produsert av fisken fôret i spennet 0.4 g til 2.3 g.

**Tabell 3.3:** Resultat fra regresjonsanalyse gjort for alle fem måletidspunkter for NH<sub>3</sub> og de to gjort for PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>.

Variabel	Tid	Likning	R <sup>2</sup>	P(konstant)	P(stigningskoeffisient≠0)
NH <sub>3</sub>	0	0.084+0.134 FI	0.08	0.64	0.39
NH <sub>3</sub>	1	0.133+0,073 FI	0.07	0.23	0.43
NH <sub>3</sub>	2	0.131-0.015 FI	0.01	0.14	0.83
NH <sub>3</sub>	3	0.135+0.043 FI	0.08	0.04	0.41
NH <sub>3</sub>	4	0.071+0.066 FI	0.10	0.38	0.34
NH <sub>3</sub>	5	0.086+0.022 FI	0.05	0.06	0.52
PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	0	2.164+0.026 FI	0.00	<0.00	0.93
PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	5	1.474-0.415 FI	0.27	0.0003	0.10

### 3.6 Drøfting av fôropptak

Resultatene viser at det ikke er en signifikant korrelasjon mellom fôropptak og konsentrasjonen av NH<sub>3</sub> og PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>. Det betyr i praksis at algene uavhengig av forskjellene i dette fôringsregime er i stand til å nyttiggjøre/fjerne avfallsstoffene fra fisken. Retovsky og Klasterska (1959) beskriver celledelingen til *Chlorella* som eksponentiell, takket være muligheten til celledeling fra 2 til 8+. Denne egenskapen til å gro så raskt, gjør *Chlorella* til en potent resirkulasjonsorganisme.

Man må likevel vise forsiktighet når en tolker tallene. Når alle relevante tall ikke er signifikante er det vanskelig å kvalitetssikre tallene i seg selv. Så selv om tolkningen av tallene er riktig, er tallgrunnet sårbar. Elleve tanker, målt hver time i fem timer pluss en null-måling gjør at usikkerhetsmomenter kan gi store utslag.

Det er flere usikkerhetsmomenter av betydning. Ved å se på avføringen til fisken var det åpenbart at de spiste alger. Dette kan forklare noe av det ustabile fôropptaket uten at det ble foretatt noen analyse på akkurat dette. Det er flere momenter som gjør algeinntaket til en usikker variabel. Mengden alger fisken har fortært er vanskelig å anslå men det kan være en forskjell i fordøyelighet. De tykke celleveggene i tank 7-11 gjør algene lite tilgjengelig for fisken (Burczyk *et al.* 1999). Den yngre kulturen i tank 1-6 kan derfor potensielt ha høyere fordøyelighet.

Dette forsøket ble opprinnelig satt opp med en toveis ANOVA-analyse. Dette oppsettet ble ikke en realitet av flere grunner, men først og fremst på grunn av stort spenn i fôropptak. Det kan være flere grunner til at fôropptaket var noe ustabil. Varierende grad av algekonsum og fordøyelighet, stress fra mange involverte parter og en ustabil fôringscyklus i forkant kan være mulige feilkilder.

## 4 Konklusjon

Algene klarer å fjerne  $\text{NH}_3$  og  $\text{PO}_4^{3-}$  uavhengig av om algekulturen er ren eller forurenset med andre mikrober (av foreløpig ukjent natur). Ved tilgang på høy konsentrasjon av  $\text{PO}_4^{3-}$  (gj.snitt 2.2 mg/L), bioreaktor, og de utskilte stoffene fra fisken blomstrer *Chlorella*-kulturen og forskyver andre organismer. Vi vet foreløpig ikke hvilken organisme eller andre forutsetninger tank 12 hadde for å lage et miljø *Chlorella* ikke trivdes i. Fremtidige studier bør undersøke hvilken organisme/miljøvariabler som legger til rette for at miljøet blir så ugunstig at *Chlorella* ikke evner å blomstre.

Forsøket avslørte ikke noen øvre grense eller terskelverdi for *C. sorokiniana*s evne til å fjerne  $\text{NH}_3$ . Dette bør studeres i oppfølgingsstudier. Resultatene viste imidlertid at fjerningen var effektiv ved et fôropptak på hele 2.3 g hos en fisk som hadde et samlet vannvolum på 11.8 L. Dette indikerer at fjerning av ammoniakk fra vannet ikke bød på problemer når fôropptaket i et måltid var så høyt som 0.19 g fôr per liter vann.

*C. sorokiniana* har en rekke fordeler ovenfor *Nitrosomonas*- og *Nitrospira*-bakteriene funnet i konvensjonelle RAS. Algene lar ikke  $\text{NO}_3$ , fosfater eller metaller akkumuleres, og bidrar til å skape en mer gunstig pH i vannmassen. Algene kan også brukes som en direkte eller indirekte fôrkilde. Algen trives best i varmt vann (32.4°C, Mayo 1997) og kostnadmessig kan en anta at storskala-forsøk egner seg best i åpne dam-oppsett i land med høy gjennomsnittstemperatur.

Det erkjennes at datagrunnlaget og konklusjoner basert på ikke-signifikante tall gjør resultatene sårbare for feil som statistikken ikke kan fange opp. Derfor anbefales det at ved eventuelle oppfølgingsstudier designes et forsøksoppsett med større grunnlag.

## Kilder

- Agirman, N., Celtin, A., 2015. Effects of nitrogen starvations on cell growth, protein and lipid amount of *Chlorella vulgaris*. *Fresenius environmental bulletin*. **24**, 3643-3548.
- Burczyk, J., Smietanaa, B., Terminska-Pabis, K., Zycha, M., Kowalowski, P., 1999. A Comparison of nitrogen content amino acid composition and glucosamine content of cell walls of various chlorococcalean algae. *Phytochemistry*. **51**, 491-497.
- Cordell, D., Drangert, Jan., White, S., 2009. The story of phosphorus: Global food security and food for thought". *Global Environmental Change*. **19**, 292–305.
- Fields, S., 2004. Global nitrogen: Cycling out of control. *Environ Health Perspekt*. **110**, A556-A563.
- Gutierrez-Wing, M., Malone, R., 2006. Biological filters in aquaculture: Trends and research directions for freshwater and marine applications. *Aquacultural Engineering*. **34**, 163–171.
- Hoar, W., Randall, D., Farrell, A., Anderson, P., Wright, P., 2001. *Fish Physiology: Nitrogen Excretion*. London: Academic press.
- Interdonato, F., 2012. Recirculating acquaculture system (RAS) biofilters: focusing on bacterial communities complexity and activity. PhD thesis University of Messina.
- Jönsson, H., Stinzing, R., Vinneras, B., Salomon, E., 2004. Guidelines on the use of Urine and Faeces in Crop Production. Report 2004-2.
- Kim, J., Lingaraju, P., Rheume, R., Lee, J., Siddiqui, K., 2010. Removal of ammonia from wastewater effluent by *Chlorella vulgaris*. *Tsinghua Science &Technology*. **15**, 391-396.
- Knezevic, D., 2016. Unicellular Algae from the Genus *Chlorella* Grown Under Various Conditions- Potential for Use as Feed.
- Latif, S, M., 2016. Development of Research Tool to Evaluate the Potential of Using *Chlorella sorokiniana* as Bio-Filter In Recycled Tilapia Production.
- Liang, K., Zhang, Q., Gu, M., Cong, W., 2013. Effect of phosphorus on lipid accumulation in freshwater microalga *Chlorella* sp. *Journal of Applied Phycology*. **25**, 311-318.
- Mayo, A., 1997. Effects of Temperature and pH on the Kinetic Growth of Unialga *Chlorella vulgaris* Cultures Containing Bacteria. *Water environment research*. **69**, 64-72.
- Porter, C., Krom, M., Robbins, G., Brickell, L., Davidson, A., 1987. Ammonia excretion and total N budget for gilthead seabream (*Sparus aurata*) and its effect on water quality conditions. *Aquaculture*. **66**, 287-297.



Priyadarshani, I., Sahu, D., Rath, B., 2012. Algae in Aquaculture. *International Journal of Health Sciences and Research*. **2**, 108-114.

Rijn, J., 2013. Waste treatment in recirculating aquaculture systems. *Aquacultural engineering*. **53**, 46-56.

Retovsky, R., Klasterska, I., 1959. Study of the Growth and Development of Chlorella Populations in the Culture as a Whole. *Folia microbiologica*. **4**, 336-344.

University of Leeds. Tilgjengelig på: <http://www.bmb.leeds.ac.uk/illingworth/metabol/amino.htm>  
Hentet 08.07.2016



Norges miljø- og biovitenskapelig universitet  
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet  
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway