

# Bruk av ozon i akvakultur og fiskeforedling



**Hovedkontor**

Gaustadalléen 21  
0349 Oslo  
Telefon (47) 22 18 51 00  
Telefax (47) 22 18 52 00  
Internett: www.niva.no

**Sørlandsavdelingen**

Jon Lilletuns vei 3  
4879 Grimstad  
Telefon (47) 22 18 51 00  
Telefax (47) 37 04 45 13

**Østlandsavdelingen**

Sandvikaveien 59  
2312 Ottestad  
Telefon (47) 22 18 51 00  
Telefax (47) 62 57 66 53

**Vestlandsavdelingen**

Thormøhlensgate 53 D  
5006 Bergen  
Telefon (47) 22 18 51 00  
Telefax (47) 55 31 22 14

**NIVA Midt-Norge**

Pirsenteret, Havnegata 9  
Postboks 1266  
7462 Trondheim  
Telefon (47) 22 18 51 00  
Telefax (47) 73 54 63 87

Tittel Bruk av ozon i akvakultur og fiskeforedling	Løpenr. (for bestilling) 6143-2011	Dato 20. januar 2011
	Prosjektnr. Undernr. 21824	Sider Pris 42
Forfatter(e) Helge Liltved Christian Vogelsang	Fagområde Miljøteknologi	Distribusjon Fri
	Geografisk område Norge	Trykket NIVA

Oppdragsgiver(e) NIVA og Norges forskningsråd	Oppdragsreferanse
--	-------------------

<p>Sammendrag</p> <p>Ozon er en sterk oksidant som har et stort potensiale som desinfeksjonsmiddel innen akvakultur og fiskeforedling. Målsettingen med prosjektet som er rapportert her var å komme fram til betingelser for bruk av ozon i disse bransjene. Det er gjennomført forsøk med ozonering av <i>Listeria monocytogenes</i> i biofilm, ozonering av overflater i et lakseslakteri, forsøk med felling av blodprotein med naturlige organiske koagulanter før ozonering av blodvann fra et lakseslakteri, samt forsøk med ulike metoder for deozonering av ferskvann og sjøvann.</p>
--

<p>Fire norske emneord</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Ozon</li> <li>Akvakultur</li> <li>Fiskeforedling</li> <li>Bakterier</li> </ol>	<p>Fire engelske emneord</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Ozone</li> <li>Aquaculture</li> <li>Fish processing industry</li> <li>Bacteria</li> </ol>
--	---



Helge Liltved  
Prosjektleder



Bjørn Faafeng  
Seniorrådgiver

# **Bruk av ozon i akvakultur og fiskeforedling**

## **Forord**

Prosjektet har vært finansiert av NIVA og Norges forskningsråd, Program for Havbruk. Forsøkene har blitt gjennomført ved NIVA i Oslo og ved fiskeindustribedrifter i området rundt Ålesund.

Grimstad 20. januar 2011

*Helge Liltved*

# Innhold

<b>Sammendrag</b>	<b>6</b>
<b>Summary</b>	<b>7</b>
<b>1. Innledning</b>	<b>8</b>
1.1 Generelt om ozon	8
1.2 Giftighet og nedbygning	8
1.3 Måling av ozon og oksidanter	9
1.3.1 Indigometoden	9
1.3.2 Jodometrisk titrering	9
1.3.3 DPD-metoden	10
1.3.4 Redokspotensialet	10
1.3.5 Andre metoder	10
1.4 Effekt overfor mikroorganismer	10
<b>2. Ozonering av Listeria i biofilm</b>	<b>12</b>
2.1 Bakgrunn	12
2.2 Forberedelser	13
2.2.1 Dyrking av <i>Listeria monocytogenes</i>	13
2.2.2 Etablering av biofilm	13
2.3 Utførte forsøk	13
2.3.1 Måling av biofilm	13
2.3.2 Referanseforsøk	14
2.3.3 Nedsenking i ozonert sjøvann	14
2.3.4 Spraying med ozonert sjø- og ferskvann	14
2.4 Resultater og diskusjon	15
2.4.1 Vurdering av tallmaterialet	15
2.4.2 Referansebiofilmen: Effekt av transport til Ålesund	15
2.4.3 Effekten av vanlige rengjøringsrutiner	16
2.4.4 Effekt av ozonering på <i>Listeria monocytogenes</i> i suspensjon	16
2.4.5 Nedsenking i ozonert sjøvann	17
2.4.6 Spraying med ozonert sjø- og ferskvann	19
2.5 Sammendrag og konklusjoner	20
<b>3. Overflatedesinfeksjon - ozonering av kjøle- og blødetanker</b>	<b>27</b>
3.1 Innledning	27
3.2 Metoder	27
3.3 Resultater	27
3.3.1 Første forsøksserie (12-13. januar 2001)	27
3.3.2 Andre forsøksserie (7. mars 2002)	28
3.4 Konklusjon	29
<b>4. Avgiftning/deozonering av ferskvann og sjøvann</b>	<b>30</b>
4.1 Innledning	30
4.2 Materialer og metoder	30

4.3 Resultater	31
4.3.1 Deozonering ved henstand og lufting	31
4.3.2 Deozonering med natriumtiosulfat	32
4.3.3 Deozonering ved filtrering i aktivkull	33
4.3.4 Dannelse av ozoneringsbiprodukter	35
4.4 Konklusjon	35
<b>5. Felling av slakteriavløp med naturlige organiske fellingsmidler</b>	<b>36</b>
5.1 Innledning	36
5.2 Materialer og metoder	36
5.3 Resultater	37
5.4 Konklusjon	40
<b>6. Referanser</b>	<b>41</b>

# Sammen drag

Innen fiskeoppdrett og i forbindelse med tilvirking av fisk er det økt fokus på hygiene. Etablering av hygieniske barrierer for å hindre inntak og spredning av fiskepatogene og humanpatogene mikroorganismer er svært viktig. Ozon er en sterk oksidant som har et stort potensiale som desinfeksjonsmiddel. Det mangler imidlertid kunnskaper knyttet til dimensjonering av ozonanlegg i akvakultur og fiskeforedling.

Målsettingen med prosjektet som er gjennomført, var å utvikle dimensjoneringskriterier for bruk av ozon innen akvakultur og fiskeforedling. For å framskaffe slike er det gjennomført forsøk med ozonering av *Listeria monocytogenes* i biofilm, ozonering av overflater i et lakseslakteri, forsøk med felling av blodprotein med naturlige organiske koagulanter før ozonering av blodvann fra et lakseslakteri, samt forsøk med ulike metoder for deozonering av ferskvann og sjøvann.

Ved å eksponere *Listeria monocytogenes* på plast- og stålplater til en ozondose på 15 mg totale restoksidanter (TRO)•min/l (1.0 mg TRO/l i 15 min) ved ca. 10 °C, ble bakterietallet redusert til nær null (ca. 99,9 % reduksjon). I en sjøvannssuspensjon ble det målt en reduksjon på 99,99 % ved en ozondose på 1.5 mg TRO•min/l (0.5 mg TRO/l i 3 min eller 1.5 mg TRO/l i 1 min). Spraying med ozonert sjøvann så ut til å være en effektiv desinfeksjonsmetode. Det ble registrert total inaktivering etter 10 sekunders spraying med en TRO-konsentrasjon på 1.5 mg/l. Tilsvarende spraying med ozonert ferskvann viste ingen signifikant desinfeksjonseffekt, noe som sannsynligvis skyldtes manglende dannelse av ”stabile” brom-desinfektanter i ferskvann.

Ozonert sjøvann hadde en desinfiserende effekt på overflater i kjøle- og blødetanker i et lakseslakteri. Ved høytrykkspyling etterfulgt av ozonering til en restkonsentrasjon på 1 mg TRO pr. liter (tilsvarende et redokspotensial på ca. 750 mV) med en virketid på 1 time, ble det målt 89-95 % lavere bakterietall enn ved bare høytrykkspyling. Resultatene tyder videre på at jevnlig ozonering over tid bidrar til å forhindre etablering av fastsittende bakterier/biofilm.

I deozoneringsforsøk ble det registrert en halveringstid på ca. 15 min i rent ferskvann. Ved lufting gikk deozoneringen betydelig raskere. I sjøvann dannes oksidanter (i hovedsak aktivt brom) som har en langt høyere stabilitet, og som er giftige for fisk ved lave konsentrasjoner. Det må derfor utvises stor forsiktighet ved bruk av ozonert sjøvann i fiskeoppdrett. Deozonering av sjøvann kan gjøres med natriumtiosulfat (5 mg natriumtiosulfat pr. mg oksidant), eller ved filtrering gjennom aktivkull med en oppholdstid i filteret på minimum 4,2 min. Det skal imidlertid påpekes at disse forsøkene ble gjennomført i løpet av kort tid, så eventuelle endringer over tid er ikke studert.

Det ble analysert m.h.p. 7 ulike halogenerte organiske forbindelser og bromat i ozonert naturlig sjøvann (9,5 °C). Ved en TRO konsentrasjon på 0,9 mg/l var det bare bromoform (CHBr<sub>3</sub>) og bromat (BrO<sub>3</sub><sup>-</sup>) som ble funnet i noen grad. Etter 20 og 80 minutters virketid var bromoformkonsentrasjonene henholdsvis 7,7 og 16,0 µg/l, mens bromatkonsentrasjonene var 50 og 70 µg/l. Filtrering gjennom aktivkull reduserte effektivt begge forbindelsene i korttidsforsøk.

Ved desinfisering av blodvann fra lakseslakterier med ozon, er det en fordel å fjerne så mye organisk stoff som mulig før ozoneringen. Blodprotein kan fjernes ved bruk av et fellingsmiddel. I denne undersøkelsen ble effekten av noen naturlige organiske fellingsmidler (kitosan, alginat og lignosulfonat) undersøkt. Ingen av fellingsmidlene ga god utfelling. Best resultat (25 % reduksjon i organisk karbon) ble oppnådd ved pH 5,5-6,0 og en kitosandose på

10 mg/l. Blodvannet som ble benyttet var ikke helt ferskt (1 døgn gammelt), noe som kan ha bidratt til de dårlige fellingsresultatene.

## Summary

Title: Use of ozone in aquaculture and fish processing industry

Year: 2011

Author: Helge Liltved, Christian Vogelsang

Source: Norwegian Institute for Water Research, ISBN No.: ISBN 978-82-577-5878-3

Good hygienic practise is essential in aquaculture and fish processing industry. The establishment of hygienic barriers is important to prevent intake and spreading of pathogenic microorganisms. Ozone is a powerful oxidant with a promising potential as disinfectant. However, problems have been experienced when ozone is used for disinfection purposes due to lack of knowledge of; i) dose requirement to accomplish inactivation of pathogens, ii) the influence of water quality on disinfection performance, iii) toxicity of ozone and its secondary oxidation products in seawater, and iv) dependable methods to detect total residual oxidants (TRO) in seawater. The work reported here focus on these issues.



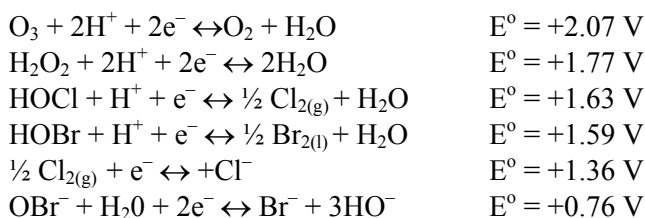
# 1. Innledning

## 1.1 Generelt om ozon

Ozon genereres ved å la tørr luft eller oksygen passere gjennom et felt med elektriske utladninger hvor oksygen-molekyler splittes. De resulterende oksygen-atomene reagerer med intakte oksygen-molekyler til ozon.

Løseligheten av ozon i vann avhengig av partialtrykket av ozon over vannet, og følger Henrys lov, som sier at forholdet mellom partialtrykket av ozon og molfraksjonen av ozon i vannet er konstant. Selv om ozon er betydelig mer løselig i vann enn det oksygen er (ca 12.5 ganger), vil det normalt svært lave partialtrykket av ozon over vannet være en sterk drivkraft for å bringe ozon ut av løsning ved grenseflaten vann/luft.

Ozon er et meget sterkt oksydasjonsmiddel og har det høyeste redokspotensialet ( $E^0$ ) av de mest brukte desinfeksjonsmidlene<sup>1</sup>:



Ozon i luft er giftig for mennesker. Faregrensen i luft er satt til 1 ppm, men de fleste vil kjenne lukten av ozon allerede ved en så lav konsentrasjon som 0.01 ppm i luft. Riktig kalibrerte og jevnlig sjekkede ozonmonitører med tilkoblet alarm bør være montert i umiddelbar nærhet til arbeidsområdet (generatorrom og i rom hvor ozoneringen foregår).

## 1.2 Giftighet og nedbygning

Ozon i så lav konsentrasjon som 0.0093 mg/l har vist seg å være dødelig for regnbueørret i ferskvann<sup>2</sup>. Ved ozonering av sjøvann vil ozon meget raskt oksidere bromid (rent sjøvann inneholder 65 mg/l bromid) og danne hypobromsyre (HOBr), som står i pH-avhengig likevekt med hypobromittion (OBr<sup>-</sup>). Disse sekundære oksidantene utgjør de viktigste aktive forbindelsene sammen med eventuelt restozon, og refereres til som total mengde restoksidanter (TRO). Tabell 1 viser toksisiteten til totale restoksidanter (TRO) og brom i sjøvann overfor dafnier, amfipoder og regnbueørret<sup>3</sup>.

**Tabell 1.** Toksisiteten til totale restoksidanter (TRO) og brom i sjøvann overfor dafnier, amfipoder og regnbueørret.

	LC <sub>50</sub> , µeq TRO/l (± 95% konfidensintervall)	LC <sub>50</sub> , µg brom/l (± 95% konfidensintervall)
Dafnier ( <i>Daphnia magna</i> )	<0,48	<38
Amfipoder ( <i>Hyalella azteca</i> )	<0,39	<32
Regnbueørret ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	0,85 (0,68-1,02)	68 (54-81)

µg brom/l = µeq TRO/l x 79,9

Ozonkonsentrasjonen i vann reduseres over tid ved 3 hovedmekanismer:

- 1) Spontan dekomponering i vann, med bl.a. dannelse av frie hydroksylradikaler<sup>4,5,6</sup>:  
 $O_3 + OH^- \rightarrow O_3^- + OH\bullet$ . Hastigheten er avhengig av temperatur, pH, UV-lys og tilstedeværelse av bl.a. metallioner.
- 2) Både ozon og hydroksylradikaler vil forbrukes i reaksjoner med urenheter i vannet. Slike urenheter kan være naturlig organisk materiale og mineraler/salter, samt organiske og uorganiske forurensninger.
- 3) Ozon vil forsvinne fra vannfase ved avdrivning til atmosfæren (stripping).

De frie hydroksylradikalene har en halveringstid på i størrelsesorden mikrosekunder, og vil derfor aldri finnes i høyere konsentrasjon enn  $10^{-12} M^7$ . I helt rent vann vil det teoretisk kunne dannes 1.5 mol frie hydroksylradikaler for hvert mol ozon.

I sjøvann vil mesteparten av fritt brom brytes ned under dannelse av bromidioner. Noe hypobromittion ( $OBr^-$ ) vil kunne oksideres av ozon videre til bromat ( $BrO_3^-$ ), som dannes i lave konsentrasjoner. Bromat er en mulig carcinogen forbindelse, men er ikke akutt giftig for fisk ved lave konsentrasjoner (96 timer  $LC_{50}=30 \text{ mg/l}$ )<sup>8</sup>.

I tillegg til de uorganiske biproduktene kan det også dannes bromaminer og halogenerte organiske forbindelser i lave konsentrasjoner ved ozonering av sjøvann. En av de sistnevnte er bromoform, som ikke er akutt giftig for fisk i sjøvann, men som er vist å ha carcinogene og mutagene effekter i forsøksdyr<sup>9</sup>. Da nedbrytningen av bromoform foregår langsomt, er fortynning med rent sjøvann viktigste når det gjelder reduksjon i konsentrasjoner nær utslippsstedet

### 1.3 Måling av ozon og oksidanter

Det finnes flere metoder for måling av ozon og oksidanter i ferskvann og sjøvann. Noen analytiske metoder er spesifikke for ozon, mens andre er mer generelle og vil inkludere de sekundære oksidantene:

#### 1.3.1 Indigometoden

I sur løsning (pH 2.5) vil ozon avfarge indigo, noe som måles spektrofotometrisk ved 600 nm eller visuelt<sup>10</sup>. Deteksjonsgrensen for høykvalitetsspektrofotometere er ned til  $2 \mu\text{g O}_3/\text{l}$ , og for den visuelle detekteringen er grensen  $10 \mu\text{g/l}^{10}$ . Vanlig arbeidsområde er  $0.01 \rightarrow 300 \mu\text{g/l}^{11}$ . Metoden er sensitiv og vil, i følge litteraturen, også inkludere hypobromsyre og hypobromittion, selv om den ikke influeres av andre sekundære oksidanter som ozonider og peroksider. Indigo-reagenset er tilsatt malonsyre som maskerer påvirkning av klor. Praktiske erfaringer tilsier at metoden er egnet for måling av ozon i ferskvann, men ikke for måling av TRO i sjøvann.

#### 1.3.2 Jodometrisk titrering

Denne metoden baserer seg på ozon-oksidasjon av en bufret (pH 3-4) KI-løsning med påfølgende frigjøring av fritt jod, som måles ved titrering med tiosulfat eller ved tilbaketitrering med jod-standard etter tilsats av overskudd tiosulfat-standard<sup>11,10</sup>. Schechter har presentert en modifisert utgave, der et frigjort  $I_3^-$ -kompleks måles spektrofotometrisk<sup>12</sup>. I sjøvann er ikke nøyaktigheten til metoden god ved TRO-verdier under  $1 \text{ mg/l}$ , selv om den i andre vanntyper vil kunne gi reproducerbare målinger helt ned til  $10 \mu\text{g/l}$ . P.g.a. lav pH vil den sure jodometriske titreringen også inkludere andre oksidanter (inkludert oksiderte former av mangan, sekundære oksidanter og andre oksydasjonsmidler) i målingene<sup>13,10</sup>. Ved arsenikk-tilbaketitrering, der et tilsatt overskudd arsenikk(III) titreres tilbake med jod-

standard, kan man betydelig redusere påvirkning fra andre oksidanter enn ozon. Metoden drar fordel av at den kjøres ved pH 6,8, og den er derfor mindre sensitive overfor tilstedeværelse av sekundære oksidasjonsprodukter.

### 1.3.3 DPD-metoden

Metoden kan benyttes kolorimetrisk, titrimetrisk, med jodometrisk titrering og amperometrisk titrering. Kolorimetrisk DPD er mest benyttet. Ozon, pluss bromoksidanter og andre oksidanter som dannes ved ozonering av sjøvann, oksiderer N,N-dietyl-*p*-fenylendiamin (DPD) til et rosa Wurster-kation, som kvantifiseres spektrofotometrisk ved 530 nm eller ved manuelt å sammenlikne fargeutslaget med standardfarger som korresponderer med kjente konsentrasjoner<sup>14,10</sup>. Ved bruk av fotometer framstår DPD-metoden som en sensitiv og godt egnet metode for måling av TRO i sjøvann.

### 1.3.4 Redokspotensialet

Redokspotensialet blir ofte brukt til å måle TRO-konsentrasjonen etter ozonering fordi det er en meget enkel målemetodikk. Svakheten er at den er avhengig av en rekke faktorer; tilstedeværelse av en tilstrekkelig mengde reduktanter (f.eks bromid og organisk stoff), vannets temperatur og atmosfærisk oksygen. Erfaringene med redoks-målinger i forsøkssammenheng er nokså dårlige, da det ofte tar lang tid før redoks-reaksjoner innstiller seg, slik at det er vanskelig å få en stabil måling. Det er også registrert store måleforskjeller mellom ulike elektroder/instrumenter i like vannkvaliteter. For måling på anlegg kan metoden være nyttig, spesielt dersom redoks-målingene kan sammenliknes med direkte TRO-målinger.

### 1.3.5 Andre metoder

ACVK-metoden<sup>15</sup> og Bis-(terpyridin)jern(II)-metoden<sup>16</sup> er aktuelle metoder om man ønsker å bare måle på ozon. Bis-(terpyridin)jern(II)-metoden har lav deteksjonsgrense (4 µg/l), og viser bra samsvar med Indigometoden<sup>17</sup>.

## 1.4 Effekt overfor mikroorganismer

Den inaktiverende effekten av ozon overfor bakterier, sopp og virus er godt dokumentert i den vannfaglige litteraturen. Det er gjort en rekke inaktiveringsstudier i drikkevann, kommunalt avløpsvann, og i vann i akvakultur.

Ozon er generelt meget effektiv mot vegetative bakterier. Så lave konsentrasjoner som 9 µg O<sub>3</sub>/l over mindre enn ett minutt har gitt 4-log reduksjon av *E. coli*<sup>18</sup>, og en ozonkonsentrasjon på 0.21 mg/l i fem minutter har ført til mer enn 2-log reduksjon av *Legionella pneumophila*<sup>19</sup>. Gram positive bakterier og sporulerende former er mer resistente overfor ozon, men alle inaktiveres lett ved relativt lave ozondoser<sup>20</sup>. Virus er generelt mer resistente mot ozon enn vegetative bakterier, men mindre resistente enn sporulerende former av *Mycobacteria*<sup>21</sup>. Ozon er mer effektivt overfor virus enn andre desinfeksjonsmidler (klor, jod, UV). Cyster av protozoer er generelt resistente mot alle typer desinfeksjonsmidler, også ozon, men flere studier tyder på at cyster av *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, *Giardia muris* og *Naegleria gruberi* er lettere å inaktivere med ozon enn klor<sup>22,23,24</sup>. *C. parvum* er rapportert å være blant de mest resistente cystene med 90% inaktivering etter 5 minutter eksponering i 1 mg O<sub>3</sub>/l<sup>28</sup>.

I forsøk er det vist at soppen *Candida tropicalis* ble redusert med 99% etter 18 sekunder ved 0,02 mg/l ozon (22°C, pH 7,2), eller etter 5 sekunder ved 1 mg/l<sup>25</sup>. *Candida tropicalis* var mer enn 10 ganger så resistent som *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, og *Staphylococcus aureus*, men ca. 15 ganger mer sensitiv enn sporer av *Bacillus* spp.

I suspensjonstester er det vist at fiskepatogene bakterier som *Enterococcus seriolicida*, *Pasteurella piscicida* og *Vibrio anguillarum* i naturlig sjøvann ble inaktivert med en effekt på 99,9% ved TRO-konsentrasjoner 0.089-0.177 mg/l etter 0.9-1.2 minutter ved 25°C<sup>26</sup>. Videre er det vist at *Aeromonas salmonicida*, *V. anguillarum*, *V. salmonicida* og *Yersinia ruckeri* ble inaktivert (> 99.9 %) i løpet av 2 minutter ved initielle konsentrasjoner på 0.15 - 0.20 mg O<sub>3</sub>/l i naturlige vann typer (ferskvann, brakkvann og sjøvann) ved 9 - 12 °C<sup>27</sup>. Sistnevnte bakteriestammer var isolert ved sykdomsutbrudd i norske oppdrettsanlegg for laks, og ble skaffet tilveie av Veterinærinstituttet i Oslo. I buffere laget av destillert vann er det vist at ozonfølsomheten til *A. salmonicida* og *Y. ruckeri* er høyere. Rask desimering ved så lave konsentrasjoner som 0.01 - 0.04 mg restozon pr. liter er rapportert<sup>28</sup>. I avløpsvann fra landbaserte oppdrettsanlegg som inneholdt 10 mg/l organisk karbon, var det nødvendig å heve den initielle ozonkonsentrasjonen til 0.3 mg/l for 99,9% inaktivering av *A. salmonicida* (NCIMB 1102) etter 40 sekunder ved 7°C<sup>29</sup>. Det initielle ozonforbruket var 3,9 mg/l.

I suspensjonstester er det tidligere blitt hevdet at IPN-virus i sjøvann ble inaktivert (> 99.9 %) i løpet av 120 sekunder ved en TRO-konsentrasjon på 0,1 mg/l<sup>30</sup>. Tilsvarende inaktivering ble oppnådd etter 2 minutter ved initielle konsentrasjoner på 0.1 - 0.2 mg O<sub>3</sub>/l i naturlige vann typer (ferskvann, brakkvann og sjøvann) ved 9 - 12 °C<sup>56</sup>. Lavere konsentrasjon (0,01 mg/l) var tilstrekkelig for 100% inaktivering i buffere<sup>31</sup>.

Nye forsøk har imidlertid vist at det kreves høye ozonkonsentrasjoner for inaktivering av IPN-virus og nodavirus i sjøvann, mens ILA-viruset inaktiveres ved svært lave konsentrasjoner<sup>32</sup>. Nødvendige kombinasjoner av konsentrasjon og kontakttider, samt verdier for dose (C T-verdier), er gitt i tabell 2.

**Tabell 2.** Kombinasjoner av konsentrasjoner og kontakttider, samt verdier for dose (C T-verdier), for ulike prosentvis inaktivering av IPNV, nodavirus (AHNV) og ILAV i sjøvann ved 5°C.

Virus	TRO conc., as mg Cl <sub>2</sub> /l	Contact- time, min	C·T value, mg·s/l	Inactivation, %
IPNV	8.1	4.0	1944	90.0
	2.8	18.3	3066	93.7
	6.7	14.0	5628	98.0
	2.5	31.0	4650	98.4
	7.9	17.0	8058	98.7
AHNV	0.9	12.2	643	80.0
	2.0	6.3	752	96.0
	1.8	10.8	1166	96.0
	1.6	31.5	3043	98.0
ISAV	0.09	0.25	1.4	90.0
	0.09	0.50	2.7	96.0
	0.33	0.25	5.0	99.0

Den primære virkningsmekanismen ovenfor bakterier er rapportert å være membranskade med påfølgende lekkasje av intracellulære komponenter. Oksidasjon av umettede fettsyrer skader membraner. Ozon kan også inaktivere enzymer ved oksidasjon. Ozon kan også inaktivere enzymer ved oksidasjon. En foreslått mekanisme for inaktivering av virus er angrep på kapselen og overføringssystemet for virus-DNA, hvor på viruset mister evnen til å overføre sitt DNA til vertscellen<sup>33</sup>.

## 2. Ozonering av *Listeria* i biofilm

### 2.1 Bakgrunn

I mange fiskeforedlingsbedrifter og slakterier er det problemer med fremvekst av den humanpatogene bakterien *Listeria monocytogenes*. Organismen ble derfor valgt som forsøksorganisme. Problemene er antatt å komme på grunn av utilstrekkelige renholdsrutiner, og da som fremveksten av biofilm på overflater som jevnlig kommer i kontakt med prosessvann. De daglige renholdsrutinene inkluderer høytrykksspyling med ferskvann, såpevask og en avsluttende desinfisering. Normalt brukes en fortynnet (5%) desinfeksjonsvæske under desinfiseringen, men kan tenkes erstattet med ozonering.

Giftvirkningen av ozon på en enkelt bakterie er avhengig av ozonkonsentrasjonen den opplever, og hvor lenge ozonet får virke. Man opererer derfor normalt med ozondose ( $D_{\text{ozon}}$ ), som er produktet av tid ( $t$ ; min) og konsentrasjon ( $C_{\text{ozon}}$ ; mg TRO/l):

$$D_{\text{ozon}} = C_{\text{ozon}} \cdot t \quad (\text{mg TRO} \cdot \text{min/l})^1$$

Ozonkonsentrasjonen den enkelte bakterie opplever kan i mange tilfeller være svært ulik den man måler ute i de frie vannmasser. Dette gjelder spesielt når man har med biofilmer å gjøre. Det er tre prosesser som særskilt er med på å skape gradienter i en biofilm; 1) diffusjon av ozon innover i biofilmen, 2) forbruk av ozon og 3) væsketransport inne i biofilmen forårsaket av biofilmens heterogenitet. De to førstnevnte prosessene gir redusert transport i biofilmen, mens den sistnevnte bidrar til økt transport. Mens diffusjon og ozonforbruk vil ha stor betydning for alle biofilmer, vil den interne væsketransporten i biofilmen først være viktig når biofilmen er relativt tykk.

Diffusjonen og forbruket av ozon må sees i sammenheng. Når ozon blandes inn i vannmassene fordeles denne hurtig på grunn av konveksjonen, men siden alle overflater har et stillestående sjikt av vann utenfor seg, må ozonet transporteres gjennom dette sjiktet ved langsom diffusjon (drevet av konsentrasjonsforskjellen i ozon mellom vannet utenfor og lenger inne). Diffusjonen fortsetter inne i biofilmen ("biofilmen" består gjerne av mer enn 99% vann), men her møter den mye oksyderbart materiale som også forbruker ozon. Ozongradienten vil derfor gå fra å være lineært avtagende ute i det stillestående vannsjiktet til å avta eksponensielt inne i biofilmen. Resultatet er at bakterier inne i biofilmen kan ligge beskyttet selv om ozonkonsentrasjonen ute i de frie vannmasser dreper frittsvevende bakterier umiddelbart.

Alle sprekker, selv av mikroskopisk skala, vil kunne gi bakteriene beskyttelse. Også den viskøse massen mange biofilmer ligger badet i etter noe tid (forårsaket av utskilt polymert materiale), kan gi ytterligere beskyttelse.

Det ville vært for omfattende og lite hensiktsmessig å inkludere alle de ovenfor omtalte faktorene i dette forsøket. Forsøket ble derfor designet for å vurdere effekten av ozonering på en rik biofilm av *Listeria monocytogenes* ved ozoneringsprosedyrer som er tenkt brukt ved desinfisering av overflater i fiskeslakterier.

<sup>1</sup> I vannet vil ozonet raskt reagere med lett oksyderbare stoffer, noe som gir et umiddelbart tap av ozon (i tillegg til det som ikke løser seg, men forsvinner opp i atmosfæren). I sjøvann vil ozon også reagere med tilgjengelig bromid og gi ulike bromforbindelser med noe svakere desinfiserende effekt. Ved den mye brukte DPD-metoden for å måle ozon, er det mengden restoksydanter – gitt ved den såkalte TRO-verdien (totale restoksidanter) – som måles, noe som inkluderer disse bromforbindelsene.

## 2.2 Forberedelser

### 2.2.1 Dyrking av *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* stamme 1155 (mottatt fra Norges Veterinærhøyskole 26.06.01 og overført til blodagarskål) ble dyrket opp på *Listeria* Enrichment Broth Base CM 862 (Oxoid) uten selektiv supplement. Bakterien vokste raskt på dette mediet; meget turbid i løpet av 12 timer.

### 2.2.2 Etablering av biofilm

I et innledende forsøk (juni-juli 2001) ble 20 stk 10x10 cm plastplater (5 mm tykkelse) og stålplater (3 mm tykkelse) eksponert hengende ned i et kar med tett bakteriekultur (uten sirkulasjon i mediet) på laboratoriet til NIVA i Oslo. For enkelt og raskt å kunne fjerne biofilmen på baksiden av platene ble denne dekket med brun bred pakke-tape. Etter et døgn i nedsenket tilstand ble platene hengt opp til tork i luft med tilnærmet 100 % relativ fuktighet. Lufttemperaturen ble holdt ved 22-26 °C ved hjelp av et vannbad og vanntemp på ca 43 °C. Medium ble benyttet til 2x daglig fukting av overflatene de neste fire dagene. På dag 5 ble en kontrollplate undersøkt for vekst av *Listeria*, med dårlig resultat. Det siste døgnet (dag 6 til 7) før ozoneringsforsøket ble startet, ble platene holdt nedsenket i tett bakteriekultur for å øke biofilmdannelsen. De enkelte platene ble tatt ut og skylt lett av med fosfatbuffer for å fjerne løstsittende bakterier rett før ozoneringen ble gjennomført (utenfor NIVAs kontorbygning i Oslo).

I hovedforsøket (oktober-november 2001) ble ca 150 stk 2.5x5 cm plastplater og stålplater fastlimt på objektglass festet til to roterende horisontale PVC-plater (objektglassene ble montert stående med smalsiden mot strømretningen) med metallklips i en sylindrisk reaktor. Disse platene ble rotert rundt i reaktoren med en hastighet på 50 rpm. Etter et døgn i batch i tett bakteriekultur (i 10% medium uten selektivt supplement), ble reaktoren kontinuerlig fødet med 5% medium (uten selektivt supplement). Etter dette dukket problemene opp som perler på en snor, og ble ikke løst før etter dag 6: Platene begynte å løsne (plastplatene etter et døgn, stålplatene etter 3 døgn) og limet viste seg å skille ut inhiberende stoffer. Først etter grundig vask av alle plater (såpe og stålull, etterfulgt av god skylling i varmt vann og destillert vann) og alt utstyr, ble det god vekst i reaktoren. Platene ble festet direkte i klipsene. Det ble avmerket en 5 mm "festekant" nederst på platene for å markere den delen av hver plate som var dekket av klipsene. Dag 6-7 ble reaktoren kjørt som batch, dag 7-11 med kontinuerlig føding av 5% medium, og dag 11-13 med kontinuerlig føding av 1% medium. I hele perioden var mediet meget turbid på grunn av bakterievekst. På morgenen dag 13 ble platene tatt ut, lagt i spesiallagde objektglassbokser tett med parafilm, og transportert til Ålesund for ozonering senere på dagen (5-17 timers ventetid).

## 2.3 Utførte forsøk

### 2.3.1 Måling av biofilm

For hver ozondose ble det brukt 3 plast- og 3 stålplater (5 av hver for referansen uten noen behandling). Måling av resterende biofilm på plater etter endt eksponering ble gjort ved avskraping av 2 av 3 plater (3 eller 4 av 5 for referansen) med hard plasticslikkepott og vasking med 5 ml eller 10 ml fosfatbuffer. Slikkepottene ble skylt i kokende vann og lufttørket mellom hver avskraping. Ulike fortyninger av vaskevannet ble støpt inn i selektivt agarmedium (*Listeria* Enrichment Agar Base CM 856 med selektivt supplement fra Oxoid). De avskrapte skålene ble dekket med agarmedium for å kunne vurdere hvor mye som var igjen på skålene. Den siste platen ble umiddelbart dekket med agarmedium uten avskraping. Agarskålene ble avlest etter tre dager.

I det innledende forsøket ble platene børstet med tannbørste (én børste for hver plate) og vasket med ca 20-25 ml fosfatbuffer. Ulike fortyninger av vaskevannet ble støpt inn i agarmedium. De avskrapte platene ble lagt ned på delvis stivnet agar. Skålene ble avlest etter 2 dager.

Hver koloni på agarskålene har opphav i én bakterie fra platene, og iberegnet fortyninger er det opprinnelige antall bakterier på platene oppgitt som kolonidannende enheter pr cm<sup>2</sup> overflate (CFU/cm<sup>2</sup>). Eventuelle gjenværende bakterier (kolonier) funnet på avskrapte (og innstøpte) plater ble ikke inkludert i disse verdiene, men brukt for å vurdere hvor vellykket avskrapingen hadde vært.

### 2.3.2 Referanseforsøk

For å ha et godt referansegrunnlag å jobbe med, ble følgende referanseforsøk gjennomført:

1. Antall bakterier på platene uten noen behandling. Effekten av transporten opp til Ålesund kan til en viss grad leses av som forskjellen mellom start-biofilmen i det innledende forsøket (juni-juli 2001) og start-biofilmen i hovedforsøket oktober-november 2001).
2. Effekt av vanlige rengjøringsrutiner:
  - a. Lett såpebehandling: en ca 5% løsning av Chloro clear i ferskvann ble helt forsiktig over platene (5-10 s behandlingstid)
  - b. Normal desinfisering: en ca 5% løsning av Ultra des i ferskvann ble helt forsiktig over platene (5-0 s behandlingstid)
3. Effekt på *Listeria monocytogenes* i suspensjon: 100 ml sjøvann med ulike TRO-konsentrasjoner (0 mg/l, 0.5 mg/l, 1.0 mg/l og 1.5 mg/l) ble tilsatt 1 ml bakteriekultur ved  $t=0$ . Etter endt eksponeringstid (1 min, 3 min, 10 min og 30 min) ble en 5 ml tatt uttatt prøve tilsatt 50 µl 50 mg tiosulfat/l for å fjerne restozon. 1 ml evt også 0.1 ml av prøven ble støpt inn i agarmedium. Effekt av økt belastning ble også testet ved 1 min eksponering i sjøvann med 0.5 mg TRO/l og 2 ml og 5 ml bakteriekultur tilsatt. Både bakteriene og mediet representerer et ozonforbruk, men TRO-konsentrasjonen ble ikke målt etter at bakteriekulturen var tilsatt eller etter at forsøket av avsluttet.

### 2.3.3 Nedsenking i ozonert sjøvann

En aktuell metode for ozonering av bløde- og kjøletanker på fiskeslakterier er å fylle tankene med ozonert sjøvann, og sørge for at ozonnivået holder seg på et visst nivå en viss tid ved å pumpe sjøvannet i en sirkulasjonssløyfe hvor i det reozoneres. Pumpingen av sjøvann sikrer en god vannsirkulasjon i tankene. For å etterligne en slik eksponeringssituasjon ble plater (montert med metallklips på PVC-platene brukt under biofilmetableringen) holdt nedsenket i sjøvann med ulike TRO-konsentrasjoner (0 mg/l, 0.5 mg/l, 1.0 mg/l og 1.5 mg/l) og ulike eksponeringstider (15 min, 60 min og 120 min). Etter endt eksponering ble platene dyppet i sjøvann med 50 mg tiosulfat/l. I et innledende forsøk (juni-juli 2001) med 10x10 cm plast- og stålplater ble platene hengt nedsenket hver for seg i det ozonerte vannet (både sjøvann og ferskvann) etter en tråd festet i et hull øverst på platene.

### 2.3.4 Spraying med ozonert sjø- og ferskvann

For desinfisering av andre overflater på fiskeslakteriene er det aktuelt å spraye med ozonert sjø- eller ferskvann. På grunn av lavt klor- og bromidinnhold holder ferskvann langt dårligere på ozonnivået (målt som TRO) enn sjøvann. Forsøket ble derfor innledet med en test for å undersøke hvor mye av TRO-konsentrasjonen som ble mistet under sprayingen: kar med ozonert sjø- og ferskvann (h.h.v 1.6 mg TRO/l og 2.3 mg TRO/l) ble sprayet med ulik spredning på sprayen ned i en balje, hvor TRO-konsentrasjonen ble målt. I det videre sprayingsforsøket ble plast- og stålplater festet 3 og 3 til en spesiallaget rigg og sprayet i 10 eller 30 s med sjø- eller ferskvann med en TRO-konsentrasjon på 0 mg/ eller 1.5 mg/l. Det ble brukt en spray med litt spredning.

## 2.4 Resultater og diskusjon

### 2.4.1 Vurdering av tallmaterialet

Hensikten med forsøkene var å fastsette nødvendig dosering ved daglig ozonering av potensielt *Listeria*-infiserte overflater. Valg av variable og antall parallelle målinger ble valgt med dette for øye. Det statistiske tallgrunnlaget for hvert målepunkt (2-4 parallelle målinger) er langt fra stort nok til at de absolutte tallverdiene kan ilegges særlig vekt, men datagrunnlaget er tilstrekkelig for å trekke konklusjoner i retning anbefalte ozondoser.

Med unntak av de ubehandlede referanseplatene, ble det for hvert "målepunkt" valgt å ha tre parallelle plater. To av platene ble brukt til å tallfeste målepunktet (ved utplating av avskrapet rest-biofilm), mens den siste platen ble brukt som en kvalitetssikring (kontrollplate) av avskrapingsprosedyren ved at den ble støpt direkte inn i agarmedium. Denne ble vurdert opp mot de matchende avskrapte platene, som også ble støpt inn i agarmedium. For å gi en indikasjon på usikkerheten i tallverdiene er det oppgitt "standardavvik" ("STD") basert på de to måleverdiene. Kontrollplaten vil også kunne gi en indikasjon på om kontaminering fra plasthanske ("fingermerker") eller festesone på platen har intruffet etter ozoneringen.

Alle måledata er gitt i tabellene 5 til 11.

### 2.4.2 Referansebiofilmen: Effekt av transport til Ålesund

I tabell 3 nedenfor er det gjort en sammenligning mellom antall bakterier funnet på kontrollplatene (uten behandling) ved hovedforsøket gjort i Ålesund og det innledende forsøket gjort noen måneder tidligere i Oslo. Bakterietettheten på "Oslo-platene" av plast er i størrelsesorden 10x høyere enn på de tilsvarende "Ålesund-platene" (av plast). Interessant er det da å se at ved henstand i sjøvann i 1 time, var tettheten på "Oslo-platene" nede på samme nivå som "Ålesund-platene", hvor bakterietettheten var tilnærmet uforandret. Dette kan tyde på at ca 90% av den opprinnelige "Oslo-biofilmen" satt veldig løst, og derfor løsnet helt av den mekaniske belastningen. "Ålesund-platene" var montert fast på roterende PVC-plater i reaktoren, noe som sannsynligvis har gjort at den etablerte biofilmen satt bedre fast til underlaget.

På platene av stål var forholdet mellom bakterietetthet på "Ålesund-platene" og "Oslo-platene" hele 1:100. Også her mistet "Oslo-platene" ca 90% av biofilmen ved 1 times henstand i sjøvann, mens "Ålesund-platene" var relativt uforandret. Men dette tilsier også at forskjellen i biofilmtetthet var i størrelsesorden 1:10 selv etter at "Oslo-platene" hadde mistet den delen som satt løst. Dette antyder at biofilmen på stålplatene brukt i Ålesund kan ha tørket litt inn under transporten. Det er ikke så uventet at den glatte ståloverflaten gir noe dårligere beskyttelse mot uttørring enn den mer ru plastoverflaten. Bakterietettheten på stålplatene brukt i Ålesund må likevel sies å ha vært stor nok til å kunne måle en signifikant effekt av ozoneringen.



**Tabell 3.** Sammenligning mellom bakterietetthet på plast- og stålplatene brukt som kontrollplater (uten behandling) og etter 1 time henstand i sjøvann ved det innledende forsøket i Oslo i juni/juli og ved hovedforsøket gjennomført i Ålesund i oktober/november. Tallverdiene er hentet fra tabellene 5, 6, 9 og 10.

	Underlag	Oslo bakterier/cm <sup>2</sup>	Ålesund bakterier/cm <sup>2</sup>
Uten behandling	plast	ca 10000	570 ± 500
	stål	ca 3300	41 ± 26
1 time i rent sjøvann	plast	ca 710	1080 ± 90
	stål	ca 380	23 ± 30

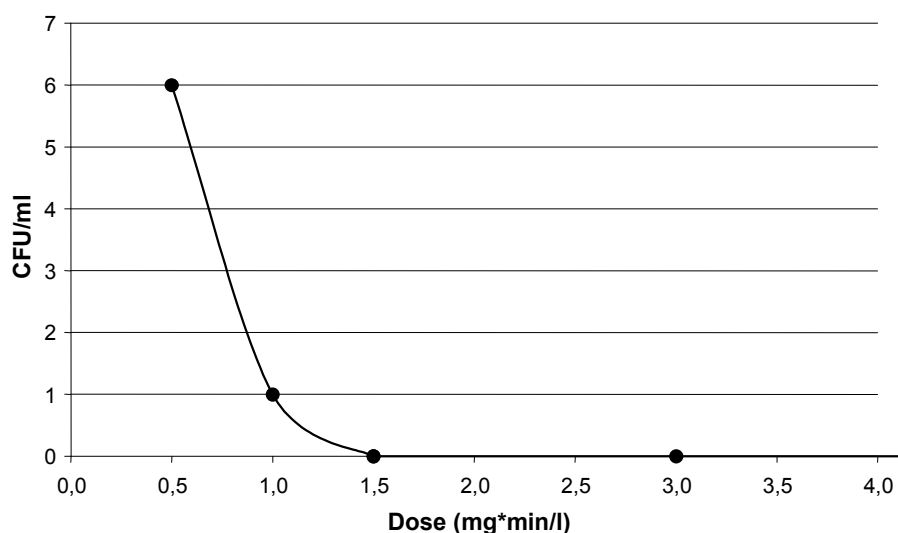
### 2.4.3 Effekten av vanlige rengjøringsrutiner

Behandling av plastplater med en vanlig brukt 5% såpeløsning (Chloro clear) ga ingen signifikant effekt på biofilmen på platene.  $1268 \pm 400$  bakterier/cm<sup>2</sup> ble funnet etter avskraping av platene etter såpebehandlingen, noe som er innenfor samme størrelsesorden som på platene uten behandling (tabell 7).

Desinfisering med Ultra des (5% løsning) reduserte antall bakterier på platene med i størrelsesorden 90% (ned til  $59 \pm 23$  bakterier/cm<sup>2</sup>), men var altså ikke tilstrekkelig for å ta knekken på alle bakteriene.

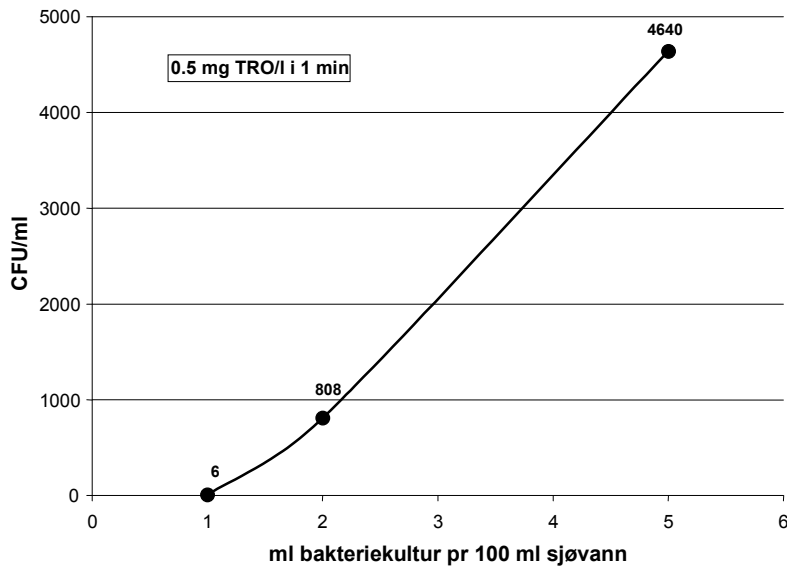
### 2.4.4 Effekt av ozonering på *Listeria monocytogenes* i suspensjon

Ozoneringen hadde en betydelig effekt på *Listeria monocytogenes* i suspensjon (frittssvevende). Ved den svakeste doseringen som ble benyttet – 0.5 mg TRO/l i 1 minutt – ble bakterietettheten redusert fra  $1.46 \pm 0.42 \cdot 10^4$  CFU/ml til 6 CFU/ml, en overlevelse på under 1% (se figur 1). Ved en dosering på 1.5 mg TRO•min/l (0.5 mg TRO/l i 3 min eller 1.5 mg TRO/l i 1 min) eller høyere ble det ikke funnet noen overlevende bakterier i en 1-ml prøve.



**Figur 1.** Effekt av ozondoser (mg TRO•min/l) på *Listeria monocytogenes* i suspensjon. Bakterietettheten (CFU/ml) under tilsvarende oppholdstider (1-30 min) i ikke-ozonert sjøvann var  $1.46 \pm 0.42 \cdot 10^4$  CFU/ml. Alle måledata er gitt i tabell 8.

Startkonsentrasjonen av bakterier er av stor betydning. Jo høyere bakterietallet er, desto større blir forbruket av ozon, og desto mindre ”ozon per bakterie”. Som nevnt foran representerer dyrkingsmediet også et ozonforbruk, og vil derfor også øke sitt bidrag når det tilsettes mer sammen med bakteriene. Effekten av å doble og femdoble mengden bakteriekultur som ble tilsatt det ozonerte sjøvannet er vist i figur 2. Effekten tilsvarer en overlevelse på i størrelsesorden 0.03% med  $1.97 \cdot 10^4$  bakterier/ml, ca 2% ved den doble og ca 5% ved den femdoble bakteriekonsentrasjonen. Dette indikerer at ozoneringen fremdeles har god effekt ved økte bakteriemengder, men at tilfredsstillende desinfeksjon krever høyere ozondoser. I en aktuell situasjon vil imidlertid konsentrasjonen være lav, og effekten god.



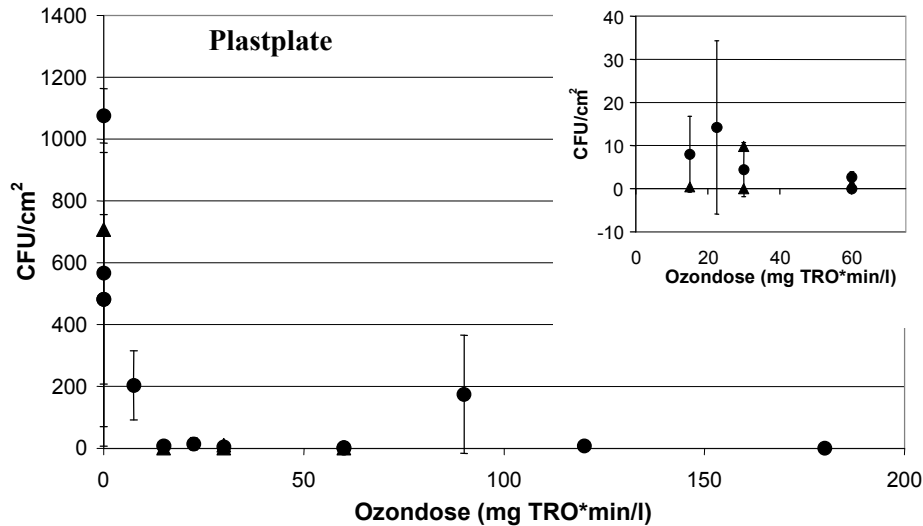
**Figur 2.** Effekt av å øke bakteriekonsentrasjonen før ozonering. Antall overlevende bakterier (CFU/ml) ved ozonering med 0.5 mg TRO/l i 1 min. Bakterietettheten ved tilsats av 1 ml bakteriekultur til 100 ml ikke-ozonert prøve etter 1 min henstand var ca 19700 CFU/ml. Alle måledata er gitt i tabell 8.

#### 2.4.5 Nedsenking i ozonert sjøvann

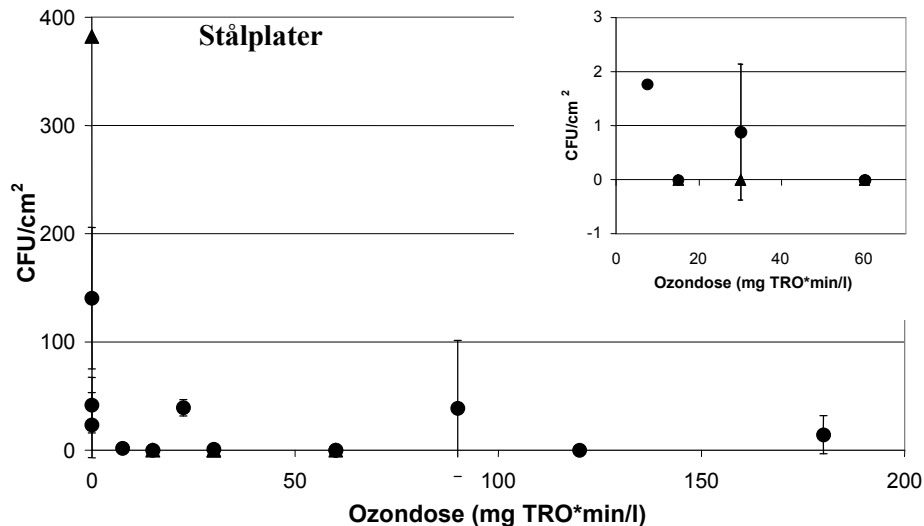
Forsøkene med ozonering av plater nedsenket i ozonert sjøvann indikerte at relativt små ozondoser var nødvendig for å få tilfredsstillende desinfeksjon av *Listeria*-biofilmen. Resultatene fra forsøkene med plast- og stålplater som underlag for biofilmen er vist i h.h.v figur 3 og figur 4. Det fremgår at bakterietallet for begge typer plater var redusert til nær null allerede ved en ozondose på 15 mg TRO•min/l (1.0 mg TRO/l i 15 min). Usikkerheten i tallverdiene (jfr de små vinduene oppe i høyre hjørne av i figurene) tilsier imidlertid at den nødvendige ozondosen bør settes noe høyere; 50 mg TRO•min/l (f.eks 1.0 mg TRO/l i 50 min eller 1.5 mg TRO/l i drøyt 30 min) burde være tilstrekkelig for total inaktivering. Noen vesensforskjell på plast- og stålplater var det ikke mulig å spore. Det må igjen bemerkes at i sprekker og groper i kar og andre overflater kan det lett danne seg tykke biofilmer inne blant annet avsatt materiale. Både dette materialet og den voksende biofilmen vil kunne virke meget beskyttende på den enkelte bakterie ved normal ozondosering.

Noen ”slengere” ved høyere ozondoser ser man i de to figurene. Dette gjaldt spesielt plastplatene ved 90 mg TRO•min/l ( $174 \pm 191$  CFU/cm<sup>2</sup>) og stålplatene ved 90 mg TRO•min/l ( $44 \pm 63$  CFU/cm<sup>2</sup>) og 180 mg TRO•min/l ( $14 \pm 18$  CFU/cm<sup>2</sup>). Observasjonene gjort på platene (gjengitt i siste kolonne i tabell 9), som ikke ble avskrapet men direkte støpt inn i agarmedium, antyder en mulig kontaminering etter ozoneringen; ”ingen bakterier på

platen, noen langs platekanten” på plastplaten ved 90 mg TRO•min/l, ”noen bakterier på, en del i festekant” og ”ingen bakterier på platen, noen langs platekanten” på stålplatene ved h.h.v 90 og 180 mg TRO•min/l. Dette kan f.eks ha skjedd via plathanskene som ble brukt til å holde i platenes festkant. I enkelte tilfeller kom hanskene også borti kantene på platene, noe som kunne ”avleses” på de ikke-avskrapte platene. De tilhørende høye standardavvikene på CFU-verdiene indikerer også denne kontamineringen.



**Figur 3.** Desinfeksjonseffekt på *Listeria*-biofilm på plastplater nedsenket i ozonert sjøvann; hovedforsøk i Ålesund (●) og innledende forsøk i Oslo (▲). Det lille vinduet oppe i høyre hjørne er et forstørret utsnitt av den store figuren ved lave ozondoser. Alle måledata er gitt i tabell 9.



**Figur 4.** Desinfeksjonseffekt på *Listeria*-biofilm på stålplater nedsenket i ozonert sjøvann; hovedforsøk i Ålesund (●) og innledende forsøk i Oslo (▲). Det lille vinduet oppe i høyre hjørne er et forstørret utsnitt av den store figuren ved lave ozondoser. Alle måledata er gitt i tabell 10.

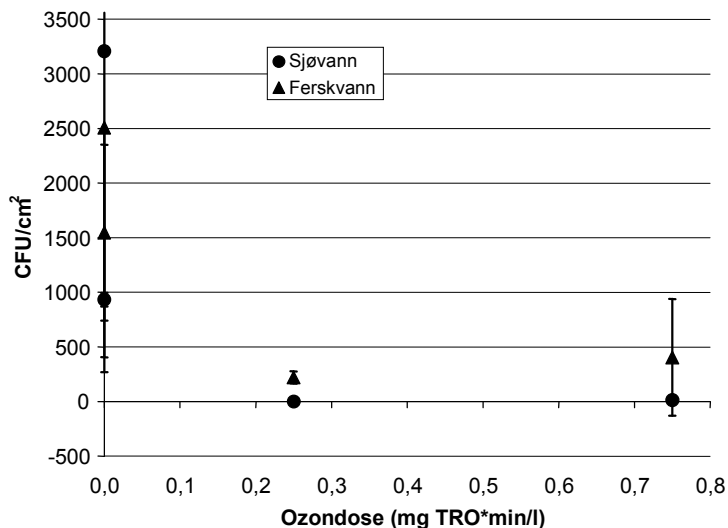
### 2.4.6 Spraying med ozonert sjø- og ferskvann

Ved spraying vil man av rent praktiske hensyn måtte begrense ozoneringstiden betraktelig, og dermed reduseres ozondosen tilsvarende. Når spraying likevel kan være en effektiv desinfeksjonsmetode, skyldes dette to forhold; man kan få en mekanisk effekt av sprayingen, og man får en langt bedre overføring av ozon inn til og innover i biofilmen.

I det innledende forsøket ble et fåtall plast- og stålplater sprayet med ferskvann med eller uten en ozonkonsentrasjon på 1.0 mg TRO/l i 10 sekunder (se tabell 5). Sprayingen med ozonert ferskvann ga en betydelig nedgang i forhold til ubehandlede plater; fra ca 10.000 CFU/cm<sup>2</sup> til 620 ± 620 CFU/cm<sup>2</sup> for plastplatene og fra ca 3.300 CFU/cm<sup>2</sup> til 6.1 ± 3.5 CFU/cm<sup>2</sup> for stålplatene. I hvilken grad dette skyldes en ren mekanisk effekt eller om ozonet hadde en tilleggseffekt, er uvisst. Det mest besynderlige var at kontrollplatene sprayet med ikke-ozonert ferskvann var nærmest fri for bakterier; ca 7 CFU/cm<sup>2</sup> på plastplaten og 0.2 CFU/cm<sup>2</sup> på stålplaten. Dette styrker i hvert fall teorien om at ren mekanisk slitasje hadde størst betydning for ”desinfisering”, eller kanskje riktigere sagt, biofilmfjerningen.

I hovedforsøket ble biofilmen bygget opp over noe lengre tid, og som det er vist tidligere i rapporten, satt denne biofilmen bedre fast til underlaget. Selv om en sprayer med noe ulik dusj-effekt ble benyttet under dette forsøket enn i det innledende forsøket, var det tydelig at den mekaniske slitasjen nå må ha vært langt mindre. På plastplatene som ble sprayet med rent ferskvann eller sjøvann ble det faktisk funnet presumptivt flere bakterier enn på ubehandlede plater, selv om standardavvikene var store (se tabell 11).

Figur 6 viser effekten av å spraye ozonert ferskvann og sjøvann (1.5 mg TRO/l i 10 s og 30 s) på plastplatene. I forhold til ubehandlede plater, viste ikke ozonert ferskvann å ha noen signifikant effekt; 220 ± 60 CFU/cm<sup>2</sup> etter 10 s spraying og 400 ± 530 CFU/cm<sup>2</sup> etter 30 s spraying mot 570 ± 500 CFU/cm<sup>2</sup> uten behandling. Ozonert sjøvann hadde derimot en betydelig desinfiserende effekt. Kun et fåtall bakterier ble funnet på platene etter avskraping (se tabell 9). Den samme tendensen så man på platene støpt direkte inn i agarmedium etter ozoneringen, der platene som var sprayet med ozonert ferskvann var fullstendig overgrodd, mens man på platene sprayet med ozonert sjøvann kun fant noen få bakterier på overflaten. Dette viser at selv en så kort eksponeringstid som 10 sekunder kan ha betydelig desinfiserende effekt.



**Figur 5.** Effekt av spraying med ozonert sjøvann og ferskvann på *Listeria*-biofilm på plastplater under hovedforsøket i Ålesund. Den virkelige ozondosen ved spraying med ferskvann kan ha vært betydelig lavere på grunn av tap av ozon til atmosfæren (se kommentar i tekst). Alle måledata er gitt i tabell 11.

Den dårlige effekten av ozonert ferskvann kan sannsynligvis spores til dets langt dårlige evne til å holde på ozonet enn sjøvann. Dette kan illustreres ved et sprayingsforsøk som ble gjort, der preozonert vann ble sprayet med ulik spredning på dusjen ned i en balje hvor restozonekonsentrasjonen (som mg TRO/l) ble målt. Resultatene er gjengitt i tabell 4, og viser tydelig hvor vanskelig det er å holde et høyt ozonnivå i ferskvann. Den virkelige dosen som bakteriene opplevde under sprayingsforsøket med ozonert ferskvann var med andre ord sannsynligvis langt lavere enn ved spraying med ozonert sjøvann.

**Tabell 4.** Konsentrasjon av restozone etter spraying med ozonert ferskvann og ozonert sjøvann.

	Ozonert ferskvann (mg TRO/l)	Ozonert sjøvann (mg TRO/l)
Før spraying	2.3	1.6
”Normal” spredning på dusj	0.8	1.6
Minimal spredning på dusj	-	1.6
Maksimal spredning på dusj	0.3	1.6

## 2.5 Sammendrag og konklusjoner

- For fjerning av *Listeria monocytogenes* voksende i biofilm ser det ikke ut til at vanlig såpebehandling har noen desinfiserende effekt. Bruk av Ultra des som vannbasert desinfeksjonsmiddel fjernet eller inaktivert 90% av biofilmen.
- Ved en ozondosering på 1.5 mg TRO•min/l (0.5 mg TRO/l i 3 min eller 1.5 mg TRO/l i 1 min) til en sjøvannsløsning med *Listeria monocytogenes* ble det ikke funnet noen overlevende bakterier i en 1-ml prøve med opprinnelig konsentrasjon på  $1.46 \pm 0.42 \cdot 10^4$  bakterier/ml. Nødvendig dose er avhengig av den opprinnelige mengden bakterier i løsningen.
- En ozondose på 50 mg TRO•min/l (f.eks 1.0 mg TRO/l i 50 min eller 1.5 mg TRO/l i drøyt 30 min) burde være tilstrekkelig for å gi en tilfredsstillende desinfisering av *Listeria monocytogenes* voksende i biofilm på både plast- og stålflater. Det må bemerkes at i sprekker og groper i kar og andre overflater kan det avsettes organisk materiale og danne seg biofilm. Både dette materialet og den voksende biofilmen vil kunne beskytte bakterier ved normal ozondosering.
- Spraying med ozonert sjøvann var en effektiv desinfeksjonsmetode. Tilnærmet total inaktivering ble oppnådd ved 10 sekunders ozonering med 1.5 mg TRO/l. Ozonert ferskvann viste ikke noen signifikant desinfeksjonseffekt, noe som kan ha skyldes at dette vannet har en meget dårligere evne til å holde på ”ozonet” enn sjøvann.
- Biofilmen på platene brukt i Ålesund satt i utgangspunktet noe bedre fast enn de som ble brukt i det innledende forsøket i Oslo. Dette gjorde at ca 90% av biofilmen på ”Oslo-platene” løsnet ved mekanisk behandling (nedsenking i vannet) av platene. Biofilmen på stålplatene benyttet i Ålesund så ut til å ha tørket noe inn under transporten fra Oslo, uten at dette hadde noen større betydning for vurderingen av effekten av ozoneringen.

**Tabell 5. Plast- og stålplater med eller uten behandling med ozonert vann. Inledende forsøk**

Underlag		TRØ-kons	Ekspon.tid	Vaskevann	Kolonitellinger (CFU)*				CFU	CFU/cm <sup>2</sup>	Kolonier på avskrapte plater
(mg/l)	(min)	(ml)	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>				
<b>Kontrollplater uten behandling</b>											
Plast	0	51,65	overgr	fimt	194	25	1	1002010	10020	60% av platen tett vekst	
Stål	0	22,58	overgr	fimt	146	9	0	329668	3297	Hele platen tett vekst	
<b>Plater nedsenket i ozonert sjøvann</b>											
Plast	0	23,52	fimt	301	29	1	0	70795	708	Soner med tett kolonivekst	
Plast	0,5	18,87	2	0	0			38	0,4	1/4 av flate tett, resten fri	
Plast	0,5	22,18	44	5	0			976	9,8	Mørke soner rundt hull	
Plast	1,0	15,71	0	0	0			0	0	Mørk sone i hull	
Plast	1,0	38,11	3	2	0			114	1,1	Mørkt i randsone	
Stål	0	14,85	overgr	257	31	3	0	38165	382	Mørkt i randsone + soner tett vekst	
Stål	0,5	15,90	0	0	0			0	0	Mørkt i randsone + smitte?	
Stål	0,5	19,94	0	0	0			0	0	Mørkt i randsone + hull	
Stål	1,0	27,30	0	0	0			0	0	50% tett vekst	
Stål	1,0	20,65	0	0	0			0	0	Utflytende soner	
<b>Plater sprayet med ozonert ferskvann</b>											
Plast	0	30,02	24	0	1			720	7,2	randsone + hull	
Plast	1,0	22,99	overgr	460	26			105754	1057	90% fri, vekst hull + nedre rand	
Plast	1,0	25,00	fimt	70	8			17500	175	70% fri	
Stål	0	23,56	1	0	0			24	0,2	Mørke soner hele plate	
Stål	1,0	20,84	174	19	1			3626	36	Utflytende sone	
Stål	1,0	26,75	32	1	0			856	8,6	Svarte soner rundt hele platen + 50% flate	
<b>Plater "overrislet" med ozonert ferskvann</b>											
Plast	1,0	29,25	238	22	0			6962	70	Randsone tett vekst	
Stål	1,0	28,73	430	47	6			12354	124	Hele platen tett vekst	

\* overgr = overgrodd med kolonier

fimt = for mange kolonier til å kunne telles

Tabell 6 til 11. Hovedforsøk (oktober-november 2001)

Tabell 6. Kontrollplater uten behandling

Underlag	TRO-kons (mg/l)	Ekspon.tid (min)	Kolonitellinger (CFU)	$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	CFU	CFU/cm <sup>2</sup>	CFU <sub>snitt</sub> /cm <sup>2</sup>	“STD” (CFU/cm <sup>2</sup> )	Kolonier på ikke-avskrapte plater
Plast	0	0	60	5	0	0	0	0	6000	533	567	497	Overgrodd
			26	5	0	0	0	2600	231				
			25	0	0	0	0	2500	222				
			144	14	2	0	0	14400	1280				
Stål	0	0	3	0	0	0	0	300	27	41	26	Overgrodd	
			8	1	0	0	0	800	71				
			3	1	0	0	0	300	27				

Tabell 7. Effekt av vanlig desinfisering (Ultra Des) og såpevask (Chloro clear) overfor fastsittende bakterier på plastplater

Behandling	Kolonitellinger (CFU)	$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	CFU	CFU/cm <sup>2</sup>	CFU <sub>snitt</sub>	“STD” (cm <sup>-2</sup> )	Kolonier på ikke-avskrapte plater
Desinfisering	24	1	5	480	43	59	23	mye i feste	
	42	33	0	840	75				
Såpevask	fmt	79	5	15800	1404	1268	400	overgrodd	
	fmt	46	7	9200	818				
	fmt	89	10	17800	1582				

fmt = for mange kolonier til å kunne telles

Tabell 8. Effekt av ozonert sjøvann overfor Listeria i suspensjon

Bakteriebelastning (ml/100 ml sjøvann)	TRO-kons. (mg/l)	Ekspontid (min)	Dose (mg*min/l)	Kolonitellinger (CFU)	
				1 ml	0.1 ml
1	0	1	0,0	overgr	1968
1	0	3	0,0	fmt	1640
1	0	10	0,0	fmt	1184
1	0	30	0,0	fmt	1048
1	0,5	1	0,5	6	0
1	0,5	3	1,5	0	0
1	0,5	10	5,0	0	0
1	0,5	30	15,0	0	0
1	1	1	1,0	1	0
1	1	3	3,0	0	0
1	1	10	10,0	0	0
1	1	30	30,0	0	0
1	1,5	1	1,5	0	0
1	1,5	3	4,5	0	0
1	1,5	10	15,0	0	0
1	1,5	30	45,0	0	0
1	0,5	1	0,5	6	0
2	0,5	1	0,5	808	808
5	0,5	1	0,5	4640	4640



Tabell 9. CFU i biofilm nedsenket i ozonert vann – plastplater

Underlag		TR0-kons	Ekspn.tid	Kolonitellinger (CFU)				CFU	CFU/cm <sup>2</sup>	CFU <sub>snitt</sub> /cm <sup>2</sup>	“STD”	Kolonier på ikke-avskrapte plater
(mg/l)	(min)	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>				(CFU/cm <sup>2</sup> )		
Plast	0	162	21	0			3240	288	482	274	Overgrodd	
		fnt	38	1			7600	676				
Plast	0	60	57	7			11400	1013	1076	88	Overgrodd	
		fnt	64	13			12800	1138				
Plast	0	120	46	3	0		9200	818	482	475	Overgrodd	
		fnt	82	4	0	0	1640	146				
Plast	0,5	15	159	19	2		3180	283	204	112	nesten ingen	
		fnt	70	5	0		1400	124				
Plast	0,5	60	0	0	0		0	0	4,4	6,3	ingen	
		fnt	5	0	0		100	8,9				
Plast	0,5	120	0	0	0		0	0	0	0	ingen	
		fnt	0	0	0		0	0				
Plast	1	15	1	0	0		20	1,8	8,0	8,8	Litt i kant	
		fnt	8	1	0		160	14,2				
Plast	1	60	2	0	0		40	3,6	2,7	1,3	Litt i feste	
		fnt	1	0	0		20	1,8				
Plast	1	120	7	0	0		140	12,4	7,1	7,5	ingen	
		fnt	1	0	0		20	1,8				
Plast	1,5	15	0	0	0		0	0	14,2	20,1	litt i kanter/feste	
		fnt	16	2	0		320	28				
Plast	1,5	60	174	7	1		3480	309	174	191	ingen/litt i kant	
		fnt	22	1	0		440	39				
Plast	1,5	120	0	0	0		0	0	0	0	ingen/noe i feste	
		fnt	0	0	0		0	0				

Tabell 10. CFU i biofilm nedsenket i ozonert vann (forts.) – stålplater

Underlag	TRO-kons (mg/l)	Eksp-on.tid (min)	Kolonitellinger (CFU)	$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	CFU	CFU/cm <sup>2</sup>	CFU <sub>snitt</sub> /cm <sup>2</sup>	“STD” (CFU/cm <sup>2</sup> )	Kolonier på ikke-avskrapte plater
Stål	0	15	105	4	0				2100	187	140	65	Overgrodd
			53	2	0				1060	94			
Stål	0	60	25	1	0				500	44	23	30	overgrodd
			1	0	0				20	1,8			
Stål	0	120							0	0			overgrodd
									0	0			
Stål	0,5	15	1	0	0				20	1,8	1,8	0	nesten ingen
			1	0	0				20	1,8			
Stål	0,5	60	1	0	0				20	1,8	0,9	1,3	ingen
			0	0	0				0	0			
Stål	0,5	120	0	0	0				0	0	0	0	ingen
			0	0	0				0	0			
Stål	1	15	0	0	0				0	0	0	0	litt i kant
			0	0	0				0	0			
Stål	1	60	0	0	0				0	0	0	0	ingen
			0	0	0				0	0			
Stål	1	120	0	0	0				0	0	0	0	ingen/litt i feste
			0	0	0				0	0			
Stål	1,5	15	11	1	0				220	19,6	14	8	litt i kant
			5	0	0				100	8,9			
Stål	1,5	60	50	4	1				1000	89	44	63	litt/en del i feste
			0	0	0				0	0,0			
Stål	1,5	120	15	0	0				300	27	14,2	17,6	ingen/litt i kant
			1	0	0				20	1,8			

Tabell 11. Effekt av spraying med ozonert ferskvann og sjøvann på *Listeria monocytogenes*

Underlag	Vannstype	TRO-kons (mg/l)	Eksp.tid (sek)	Kolonitellinger (CFU)	$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	CFU	CFU/cm <sup>2</sup>	CFU <sub>snitt</sub> /cm <sup>2</sup>	“STD” (CFU/cm <sup>2</sup> )	Kolonier på ikke-avskrapte plater
plast	sjøvann	0	10	fimt	50	5	0	0	10000	889	933	63	overgrodd
				fimt	55	6	2		11000	978			
plast	sjøvann	0	30	fimt	292	22	4	4	58400	5191	3209	2803	svakere overgrodd
				fimt	69	7	1	1	13800	1227			
plast	sjøvann	1,5	10	1	1				20	1,8	0,9	1,3	noen kolonier på plate + kant
				0	0				0	0			
plast	sjøvann	1,5	30	14	0				280	25	12	18	noen kolonier på plate + kant
				0	0				0	0			
plast	ferskvann	0	10	fimt	55	11	0	0	11000	978	1547	805	overgrodd
				fimt	119	17	1		23800	2116			
plast	ferskvann	0	30	fimt	230	29	3	3	46000	4089	2507	2238	overgrodd
				fimt	52	8	0	0	10400	924			
plast	ferskvann	1,5	10	146	13	1			2920	260	220	56	overgrodd
				102	13	1			2040	181			
plast	ferskvann	1,5	30	fimt	44	4			8800	782	404	534	overgrodd
				15	0	0			300	27			

## **3. Overflatedesinfeksjon - ozonering av kjøle- og blødetanker**

### **3.1 Innledning**

Ved lakseslakteriet til Marine Harvest, Osen, benyttes ozonert sjøvann for å desinfisere kjøletanken og blødetanken etter endt arbeidsdag. Norsk institutt for vannforskning (NIVA) har på oppdrag fra leverandøren av ozonanlegget (Ozotech Norway AS), undersøkt effekten av ozoneringen m.h.p. bakterietall på overflatene i de to tankene, og bakteriologiske forhold i det ozonerte sjøvannet.

### **3.2 Metoder**

For bestemmelse av bakterietall på tank-overflatene før og etter ulike behandlinger ble det benyttet 2 ulike teknikker.

Den ene teknikken består i å høste bakterier på tankoverflatene ved å stryke en steril tupfer (Non-Woven, Norgesplaster, Alpharma AS) over et ca. 20 cm<sup>2</sup> stort areal. Tupferen holdes med en sterilisert pinsett, og vaskes så i 10 ml sterilt fysiologisk saltvann i en liten steril petriskål. 100 µl av vannet pipetteres ut, og plates på agarskåler i duplikat. I forsøkene ble det benyttet tryptone soya agar (TSA) tilsatt ekstra salt (5 g/l) og blodagar tilsatt ekstra salt (5 g/l). Etter 3 dager ved ca. 20 °C ble antall kolonier telt, og antall pr. cm<sup>2</sup> ble beregnet.

Den andre teknikken som ble benyttet var avtrykk direkte på ferdigpreparerte agarplater (Hygicult TPC fra Orion Diagnostica). Agarplatene har et areal på ca. 10 cm<sup>2</sup>. Disse ble presset mot overflaten i tankene og inkubert ved ca. 20 °C. Etter 3 dager ble antall kolonier telt, og antall pr. cm<sup>2</sup> ble beregnet.

For bestemmelse av bakterietall i sjøvannet før, under, og etter ozoneringen ble det i hovedsak benyttet en filtreringsteknikk. 10 ml vannprøve ble filtrert gjennom sterile membranfiltre med lysåpninger på 0,45 µm. Filtrene ble deretter plassert på TSA og blodagar, og kolonier ble talt etter 3 dager ved ca. 20 °C. I enkelte tilfeller ble det også benyttet en test-metode utviklet av Orion Diagnostica (DryCult TPC).

Det ble gjennomført 2 forsøksserier til ulike tider ved Osen. Første forsøksserie ble gjennomført 12-13. januar 2001, mens den andre forsøksserien ble gjennomført 7. mars 2002.

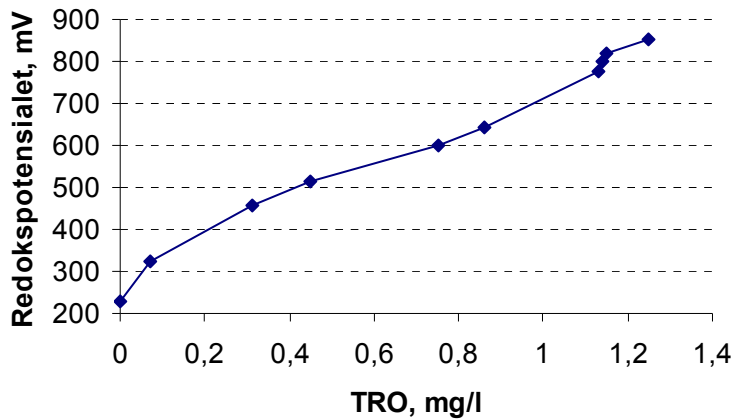
### **3.3 Resultater**

#### **3.3.1 Første forsøksserie (12-13. januar 2001)**

Ved første forsøksserie var ozonanlegget nyinstallert, og hadde bare vært i bruk noen dager. Ved avstryk med tupfere ble det vist at overflatene i både kjøletanken og blødetanken hadde høye bakterietall. Selv etter høytrykkspyling med varmt vann var det over 1000 bakteriekolonier pr. cm<sup>2</sup> både i kjøletanken og i blødetanken.

For å undersøke effekten av å benytte ozonert vann, ble kjøletanken først fylt med sjøvann som ble ozonert. Etter 45 minutters ozonering var konsentrasjonen over 1 mg total restoksidant (TRO) pr. liter, tilsvarende et redokspotensial på mer enn 750 mV (se figur 6). Denne konsentrasjonen ble opprettholdt i ca. 15 min. Deretter ble tanken tømt, og bakteriologiske prøver ble tatt fra

tankoverflatene. Det ozonerte vannet ble overført til blødetanken, og ozonert opp til en konsentrasjon på > 1 mg/l TRO. Det ble benyttet ca. 15 min virketid ved denne konsentrasjonen før tanken ble tømt, og prøver ble tatt ut. Det ble observert at skum som ble dannet under ozoneringen i kjøletanken og i blødetanken ble avsatt på tankoverflatene ved nedtapping. Prøver av skummet viste at dette ikke var sterilt, og kan ha påvirket resultatene.



**Figur 6.** Redokspotensialet som funksjon av totale restoksidanter (TRO) i mg/l.

De bakteriologiske prøvene av tankoverflatene etter ozonering viste at bakterietallet var lavere enn ved bare høytrykkspyling. Bakterietallet varierte fra 280 til 800 pr. cm<sup>2</sup> i kjøletanken, og fra 120 til >1000 pr. cm<sup>2</sup> i blødetanken. Skumlegging av tankoverflatene med 1% Chloroclean-løsning (Arrow Chemicals) med virketid ca. 15 min og påfølgende høytrykkspyling reduserte bakterietallet mer enn ozoneringen. Det ble målt bakterietall fra 12 til 52 pr. cm<sup>2</sup> i kjøletanken, og fra 4 til 31 pr. cm<sup>2</sup> i blødetanken. Prøver av det ozonerte vannet etter endt virketid viste svært få bakteriekolonier (<1 til 2 CFU/10 ml) (tabell 12).

**Tabell 12.** Vannkvalitetsparametere ved økende ozoneringstid i kjøletanken.

Tid min	Temp. °C	Redox, mV	TRO, mg/l	TSA, CFU/10ml	Blodagar, CFU/10ml	pH	Sal, ‰	TSM, mg/l	NPOC, mg/l
0	4,8	230	0	>1000	>1000	7,05	33,6	6,15	2,6
20	4,8	455	0,31	93	216				
40	4,8	645	0,86	80	92				
60	4,8	853	1,25	<1	2	7,15	33,8	2,44	4,1

Redox=redoks-potensialet

TRO=totale restoksidanter

CFU=colony forming unit

TSA=trypton soya agar

Sal=salinitet

TSM=totalt suspendert materiale

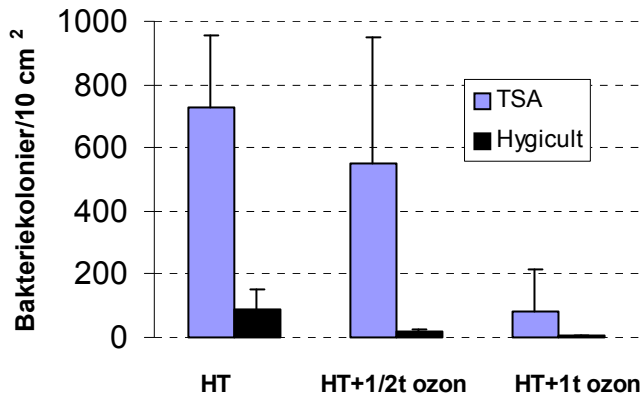
NPOC=organisk karbon

### 3.3.2 Andre forsøksserie (7. mars 2002)

I den andre forsøksserien ble det bare tatt prøver fra kjøletanken. Det ble benyttet en lengere virketid for ozon i denne forsøksserien enn i den første forsøksserien. Prøver ble tatt ut etter ½ time og etter 1 time virketid ved ca. 1 mg/l TRO.

Bakterietallene etter bare høytrykkspyling varierte fra 500 til 1000 pr. 10 cm<sup>2</sup> på TSA, og fra 30 til 160 pr. 10 cm<sup>2</sup> på Hygicult. Etter ozonering (1 times virketid) var bakterietallet lavere, fra 0 til 320 pr. 10 cm<sup>2</sup> på TSA, og fra 0 til 50 pr. 10 cm<sup>2</sup> på Hygicult. Gjennomsnittsverdier med standardavvik er vist i figur 7.

Resultatene viser et generelt lavere bakterietall på tankoverflatene enn i den første forsøksserien, både etter kun høytrykkspyling, og etter høytrykkspyling pluss ozonering. Dette kan forklares med at ozoneringen som har foregått jevnlig i perioden mellom de to forsøksseriene har bidratt til å hindre etablering av bakterier/biofilm å overflatene.



**Figur 7.** Bakterietall på tankoverflaten i kjøletanken etter høytrykkspyling (HT), etter HT pluss ½ times virketid for ozon, og etter HT pluss 1 times virketid for ozon. TRO-konsentrasjon: 1 mg/l. Redokspotensialet: 750-755 mV. Temperatur: 6,4 °C

### 3.4 Konklusjon

Det ble vist at ozonert sjøvann hadde en desinfiserende effekt på overflatene i kjøle- og blødetankene i lakseslakteriet. Ved høytrykkspyling etterfulgt av ozonering til en restkonsentrasjon på 1 mg (TRO) pr. liter (tilsvarende et redokspotensial på ca. 750 mV) med en virketid på 1 time, ble det målt 89-95% lavere bakterietall enn ved bare høytrykkspyling i kjøletanken. Skumlegging av tankoverflatene med 1% Chloroclean-løsning (Arrow Chemicals) med virketid ca. 15 min og påfølgende høytrykkspyling reduserte bakterietallet mer enn ozoneringen.

Bakterietallene på tankoverflatene var lavere ved den siste undersøkelsesserien (7. mars 2002) sammenliknet med den første (12-13. januar 2001), noe som tyder på at jevnlig ozonering over tid bidrar til å forhindre etablering av fastsittende bakterier/biofilm.

## 4. Avgiftning/deozonering av ferskvann og sjøvann

### 4.1 Innledning

Ved oppdrett av fisk i landbaserte anlegg er det viktig å sikre at vannet som oppdrettsorganismene lever i har en betryggende hygienisk kvalitet. I likhet med husdyr, er fisk som lever i intensive oppdrettsystemer utsatt for sykdom p.g.a. høy tetthet, nedsatt vannkvalitet og stress som følge av håndtering/sortering, etc. Dette kan gi god anledning for opportunistiske vannlevende mikroorganismer til å infisere oppdrettsfisken.

For å hindre inntak av fiskepatogene mikroorganismer i oppdrettsanlegg, og for å hindre smittespredning til andre anlegg eller villfiskbestander, er det i flere tilfeller lovpålagt desinfisering av inntaksvann og avløpsvann. Når det gjelder laksefisk er det lovpålagt desinfeksjon av sjøvannsinntak i settefiskanlegg, og desinfeksjon av ferskvannsinntak der det er oppgang av anadrom fisk i kilden. Alt avløpsvann fra slakterier, anlegg som bearbeider oppdrettsfisk, og brønnbåter skal også desinfiseres før dette slippes ut. Disse tiltakene kom som en direkte følge av de alvorlige problemene som oppstod med bl.a. furunkulose, kaldtvannsvibriose og infeksøs lakseanemi på 80- og 90-tallet.

Ved oppdrett av marin yngel har en rekke anleggseierene selv sett behovet for smitteforebyggende tiltak og sanitetsbarrierer på alle nivå (stamfisk, egg, yngel, settefisk), primært for å hindre inntak av problematiske virus. Ulike former for desinfeksjon av inntaksvann og resirkulert vann er etablert. De fleste steder ozoneres sjøvannet da det er en utbredt oppfatning at ozon er mest virksomt overfor virus. Imidlertid synes dette å være gjort uten å ha tilstrekkelig kunnskap om hvilke doser (konsentrasjoner og kontakttid) som er nødvendig for inaktivering av aktuelle virus, hvilke giftige ozoneringsbiprodukter som dannes i sjøvann, effekter av disse på oppdrettsorganismene, og metoder for avgiftning av vannet. Ozonering av sjøvann har da også ført til tap av betydelige mengder fisk i flere anlegg, og det er usikkerhet m.h.t. drift og hvilke metoder som er best egnet for kontroll av ozonmengde.

For å unngå problemer er det derfor svært viktig at det doseres riktig mengde ozon i forhold til hvilke mikroorganismer som skal inaktiveres, kjenne til de kjemiske reaksjonene som foregår når ozon tilsettes ulike vannkvaliteter, og tiltak for å redusere giftige biprodukter før vannet når fisken. Det er også viktig at man har gode metoder for å overvåke mengde restoksidant og for å styre ozondoseringen.

Bruk av ozon er aktuelt for desinfeksjon av inntaksvann og resirkulert vann i landbaserte oppdrettsanlegg. Metoden har også vist seg å være nyttige for desinfeksjon av egg og startfor i marine oppdrettsystemer (Davies and Arnold 1997, Theisen *et al.* 1998).

### 4.2 Materialer og metoder

Forsøkene ble gjennomført for å få bedre kunnskap om avgiftning av ozonert ferskvann og sjøvann som skal benyttes i oppdrettsanlegg. Forsøkene ble gjennomført ved å ozonere de ulike vanntypene til bestemte konsentrasjoner, og deretter avgifte/deozonere vannet med ulike metoder som lufting, tilsetning av natriumtiosulfat, og filtrering gjennom aktivkull. Sjøvannet og ferskvannet er analysert og karakterisert (analyser foreligger ikke ennå).

For måling av restoksidanter ble DPD-metoden benyttet både i ferskvann og sjøvann. Erfaringene med metoden er gode, og det er i første rekke disse målingene som tillegges vekt. I tillegg ble

redokspotensialet målt. Erfaringene med redoks-målinger i forsøkssammenheng er nokså dårlige, da det ofte tar lang tid før redoks-reaksjoner innstiller seg, slik at det er vanskelig å få en stabil måling. Det er også registrert store måleforskjeller mellom ulike elektroder/instrumenter i like vannkvaliteter.

For deozonering ved henstand og lufting ble det benyttet et rundt plastkar med diameter på 55 cm. Vanndybden var 34 cm, tilsvarende et vannvolum på ca. 80 liter. For lufting ble det benyttet en kompressor. Luftmengden ble målt v.h.a. et rotameter og fordelt i karet v.h.a. en diffusorstein.

Forsøkene med deozonering med natriumtiosulfat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) ble gjennomført i et gjennomstrømningssystem. Vann ble pumpet fra et basseng med ozonert vann, tilsatt natriumtiosulfat, og ført gjennom en plexiglass-kolonne som fungerte som et kontaktkammer, og videre til et kar for prøvetaking. Det ble benyttet en fast vanngjennomstrømning på 120 l/time som ble målt i et rotameter. Natriumtiosulfatløsning (1 mg/ml) ble dosert v.h.a. en slangepumpe.

Forsøkene med deozonering ved filtrering i aktivkull ble også gjennomført i et gjennomstrømningssystem. Ozonert vann ble pumpet via et rotameter til filterkolonnen med diameter 15 cm. Det ble filtrert nedstrøms gjennom et 20 cm lag aktivt karbon med kornstørrelse 1,00-3,55 mm (Pool-Aktivkohle W 1-3, Permakem A/S, Oslo). Under kullet var det lagt et støttelag med sand og grus. Det ble gjort forsøk med ulike kontakttider, uttrykt som "empty bed contact time" (EBCT). Kontakttiden i tom kolonne beregnes som følger:

tid (min) = vannvolum i tom kolonne (liter)/vanngjennomstrømningen (liter/min)

I 20 cm var vannvolumet 3,5 liter. Ved å variere vanngjennomstrømningen mellom 0,83 og 5,0 liter/min varierte EBCT mellom 0,7 og 4,2 min.

## 4.3 Resultater

### 4.3.1 Deozonering ved henstand og lufting

Resultatene fra forsøkene med deozonering ved henstand og lufting i ferskvann og sjøvann er vist i figur 12. Som det framgår var det en forholdsvis rask nedgang i ozonkonsentrasjon (restoksidanter) i ferskvann ved kun henstand uten lufting. Det ble registrert en halveringstid på ca. 15 min. Med en slik halveringstid tar det allikevel mer enn 45 min for å redusere ozonkonsentrasjonen fra 0,1 mg/l (konsentrasjonen som skal måles etter 3 min kontaktid ved desinfeksjon av inntaksvann til settefiskanlegg) til <0,01 mg/l (konsentrasjon man må under for å unngå skader på laksefisk).

Ved lufting med en luftinnblåsing på 17 l/min i 80 liter vann (tilsvarende 0,21 l/min pr. liter vann), gikk deozoneringen mye raskere med en halveringstid på ca. 5 min. For tilsvarende reduksjon i ozonkonsentrasjonen som i eksempelet ovenfor, kreves ca. 15 min luftetid.

Ved lufting av sjøvann, var det liten eller ingen reduksjon i oksidanter i løpet av luftetiden. Ved henstand uten lufting ble det fortsatt målt høye konsentrasjoner etter 1 døgn (ca. 0,9 mg/l).

Regneeksempel settefiskanlegg:

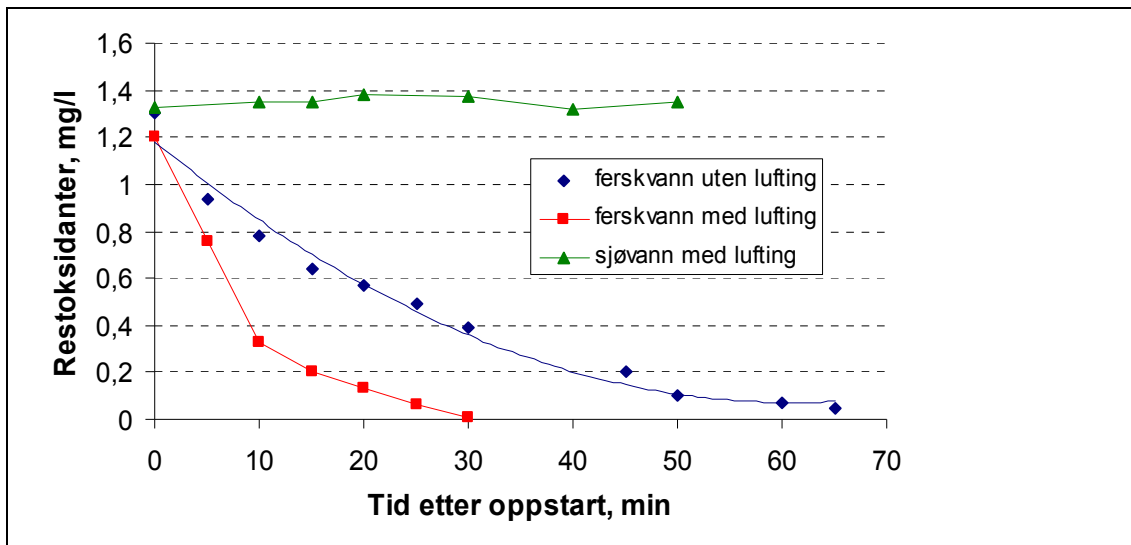
Ferskvannmengde:  $10 \text{ m}^3/\text{min}$  som inneholder 0,1 mg/l ozon

Holdetankvolum:  $150 \text{ m}^3$

Luftmengde:  $32 \text{ m}^3$  luft/min

En effektiv måte å fjerne restozon på i ferskvann er trolig ved å lede vannet gjennom en kolonnelufter. De fleste settefiskanlegg har slike lufter etablert på vanninntaket.





**Figur 8.** Deozonering av ozonert ferskvann og sjøvann ved henstand og lufting. Vanntemperatur: 11,7-12,5 °C.

#### 4.3.2 Deozonering med natriumtiosulfat

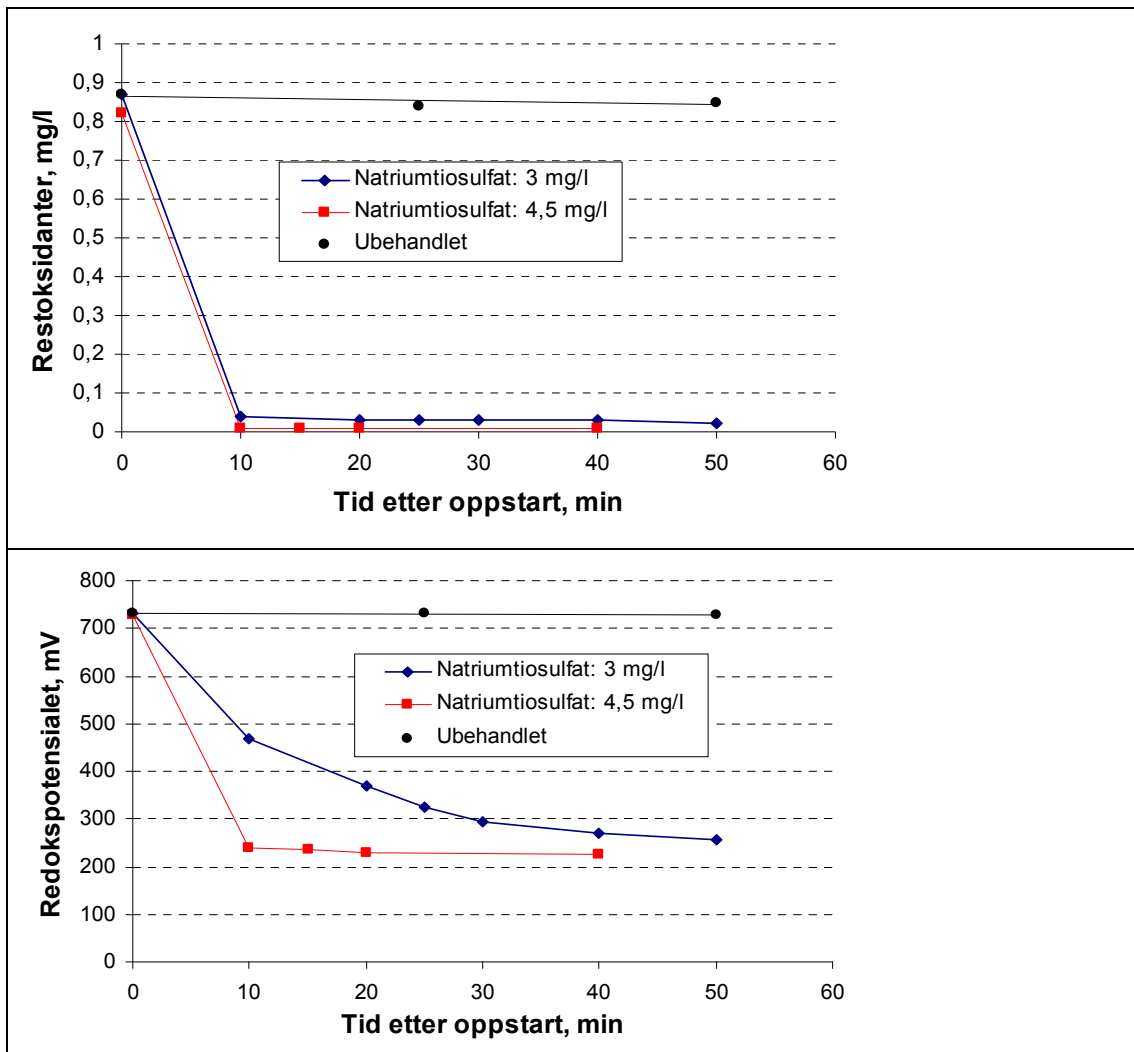
Resultatene med deozonering av sjøvann med natriumtiosulfat i et gjennomstrømningsystem er vist i figur 13. Ved en dosering på 3 mg natriumtiosulfat pr. liter vann ble oksidantkonsentrasjonen redusert fra 0,87 mg/l til mellom 0,02 og 0,04 mg/l, altså en gjennomsnittlig reduksjon på 96,5%. De laveste konsentrasjonene ble målt 40 og 50 min etter oppstart. Redokspotensialet sank også ved økende tid etter oppstart, og var 258 mV etter 50 min. Selv om verdiene for TRO og redoks var synkende, synes denne doseringen å være noe for lav for å avgifte 0,87 mg/l restoksidant. Ved å øke doseringen til 4,5 mg/l, ble oksidantkonsentrasjonen redusert til 0,01 mg/l.

Basert på forsøkene kan det se ut til at det må doseres ca. 5 mg natriumtiosulfat pr. mg oksidant i sjøvann, d.v.s. at vann som inneholder 0,1 mg/l restoksidant må tilsettes 0,5 mg/l natriumtiosulfat. Det anbefales foreløpig å være forsiktig med ozonering av sjøvannsinntak i fiskeoppdrett, selv med deozonering. Imidlertid kan det være aktuelt å ozonere sjøvannsinntaket til 0,1 mg/l i settefiskanlegg når sjøvannsmengden er liten i forhold til ferskvannsinntaket. Dette krever imidlertid en sikker deozonering, da f.eks. en svikt i doseringspumpen for natriumtiosulfat vil kunne få alvorlige konsekvenser. Det er også aktuelt å ozonere sjøvannsinntaket til marine fiskelarver, men da med lavere konsentrasjoner og deozonering med tiosulfat eller andre metoder.

Regneeksempel:

Vannmengde: 1 m<sup>3</sup>/min som inneholder 0,1 mg/l ozon

Forbruk natriumtiosulfat: 0,5 mg/l og 0,72 kg/døgn



**Figur 9.** Deozonering av ozonert sjøvann ved dosering av natriumtiosulfat. Vanntemperatur: 11,7-12,0 °C.

#### 4.3.3 Deozonering ved filtrering i aktivkull

Deozonering ved filtrering i aktivkull av ferskvann som inneholdt 1,5 mg/l ozon var fullstendig ved en vannmengde på 300 l/min og EBCT på 0,7 min.

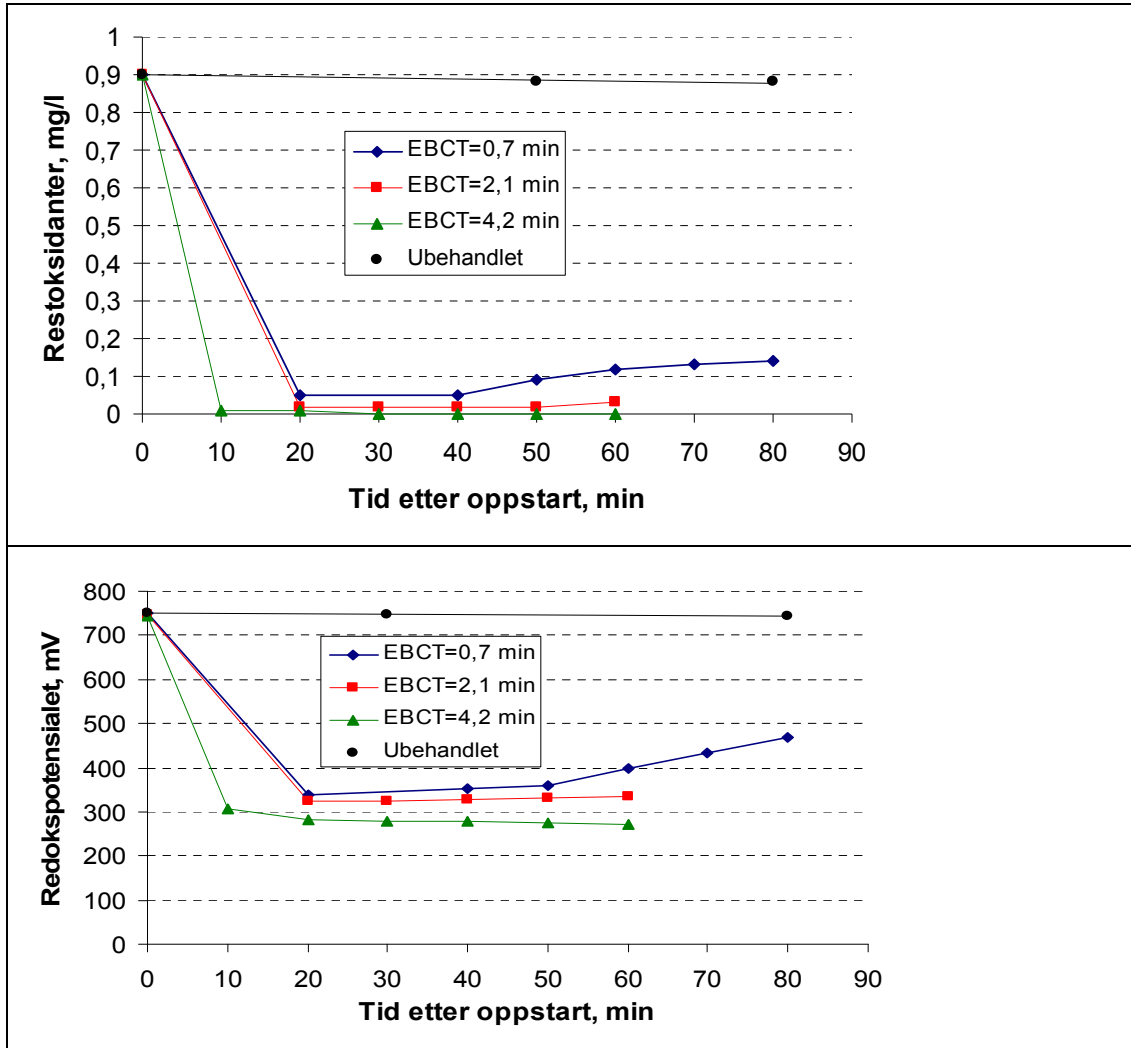
Resultatene fra forsøkene med deozonering av sjøvann ved filtrering i aktivkull er vist i figur 14. Konsentrasjonen av restoksidanter i innløpet var 0,9 mg/l. Ved en høy vanngjennomstrømning (5 l/min) og lav EBCT (0,7 min), ble det registrert ufullstendig avgiftning og økende mengde restoksidanter i utløpet fra filteret. Ved å senke vanngjennomstrømningen til 1,67 l/min og en EBCT på 2,1 min ble oksidantnivået redusert til 0,02-0,03 mg/l. Fullstendig deozonering ble oppnådd ved en vannmengde på 0,83 l/min og EBCT på 4,2 min. I settefiskanlegg vil innløpskonsentrasjonen være lavere, noe som gir en stor grad av sikkerhet dersom anlegg dimensjoneres med en oppholdstid (EBCT) på 4,2 minutter.

I forhold til bruk av tiosulfat, er filtrering i aktivkull trolig en sikrere metode da man ikke er avhengig av doseringspumper. Filteret må imidlertid ha mulighet for tilbakespyling, og kullet må trolig byttes etter en viss driftstid. Kull vil også forbrukes sakte, slik at nytt kull må fylles på etter hvert.

Regneeksempel:

Vannmengde:  $1 \text{ m}^3/\text{min}$  som inneholder  $0,1 \text{ mg/l}$  ozon

Filtervolum:  $4,2 \text{ m}^3$



**Figur 10.** Deoxygenering av sjøvann ved filtrering i aktivkull.  
Vanntemperatur:  $10,7-11,0 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 4.3.4 Dannelse av ozoneringsbiprodukter

Etter ozonering av rent sjøvann til en stabil konsentrasjon på 0,9 mg/l TRO ved 9,5°C, ble det målt m.h.p. 7 halogenerte organiske forbindelser pluss bromat etter 20 minutter og 80 minutter. Etter 80 minutters eksponering ble sjøvannet filtrert gjennom aktivkull (AC-filtrer) med en "empty bed contact time" (EBCT) på 4,2 min. Som det framgår i tabell 12 var det bare bromoform (CHBr<sub>3</sub>) som ble dannet i noen grad av de halogenerte organiske forbindelsene. Bromat ble dannet i høyere nivåer. Alle forbindelsene ble redusert ved AC-filtrering.

**Tabell 13.** Konsentrasjon av 7 halogenerte organiske forbindelser pluss bromat etter 20 minutter og 80 minutter ozonkontakt ved en TRO-verdi på 0,9 mg/l i sjøvann ved 9,5°C. Konsentrasjoner etter AC-filtrering er også vist.

	Råvann	etter 20 min ved 0,9 mg/l TRO	etter 80 min ved 0,9 mg/l TRO	etter AC- filtrering
Salinitet, ‰	33,9			
pH	7,9			
NPOC, mg/l	1,2			
TRO, mg/l	0,00	0,9	0,9	0,00
Redoks, mV	-	752	752	270
CCl <sub>4</sub> , µg/l	-	<0,03	<0,03	<0,03
CHBr <sub>3</sub> , µg/l	-	7,7	16	1,6
CHCl <sub>3</sub> , µg/l	-	<0,30	<0,30	<0,03
DBrCM, µg/l	-	0,10	0,22	<0,05
DCBrM, µg/l	-	<0,05	<0,05	<0,05
TECE, µg/l	-	<0,03	<0,03	<0,03
TRCE, µg/l	-	0,12	0,21	<0,05
BrO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , µg/l	-	50	70	<10

#### 4.4 Konklusjon

I deozoneringsforsøk ble det registrert en halveringstid på ca. 15 min i rent ferskvann. Ved lufting gikk deozoneringen betydelig raskere. I sjøvann dannes oksidanter (i hovedsak aktivt brom) som har en langt høyere stabilitet, og som er giftige for fisk ved lave konsentrasjoner. Det må derfor utvises stor forsiktighet ved bruk av ozonert sjøvann i fiskeoppdrett. Deozonering av sjøvann kan gjøres med natriumtiosulfat (5 mg natriumtiosulfat pr. mg oksidant), eller ved filtrering gjennom aktivkull med en oppholdstid i filteret på minimum 4,2 min. Det skal imidlertid påpekes at disse forsøkene ble gjennomført i løpet av kort tid, så eventuelle endringer over tid er ikke studert.

Det ble analysert m.h.p. 7 ulike halogenerte organiske forbindelser i ozonert i naturlig sjøvann (9,5°C). Ved en TRO konsentrasjon på 0,9 mg/l var det bare bromoform (CHBr<sub>3</sub>) og bromat (BrO<sub>3</sub><sup>-</sup>) som ble funnet i noen grad. Etter 20 og 80 minutters virketid var bromoformkonsentrasjonene henholdsvis 7,7 og 16,0 µg/l, mens bromatkonsentrasjonene var 50 og 70 µg/l. Filtrering gjennom aktivkull reduserte effektivt begge forbindelsene i korttidsforsøk.

## 5. Felling av slakteriavløp med naturlige organiske fellingsmidler

### 5.1 Innledning

Forsøk ble gjennomført for å vurdere mulighetene for å fjerne organisk stoff fra slakteriavløp (lakselakteri) v.h.a. naturlige organiske fellingsmidler. Dette for lettere å kunne behandle og desinfisere avløpsvannet med ozonering i etterfølgende behandlingstrinn.

### 5.2 Materialer og metoder

Slakteriavløp ble hentet på et slakteri ved Ålesund tirsdag 04.09.2001, og flysendt til Kristiansand samme dag. Avløpsvannet ble satt i kjøleskap til neste dag, 05.09.2001, da forsøkene ble gjennomført.

Slakteriavløpet som ble mottatt hadde ikke gjennomgått noen former for grovavskilling, så det inneholdt rester av slo og avskjær. For avskilling av grove partikler ble vannet silt gjennom en duk med lysåpninger på 0,5 mm før fellingsforsøkene. Fellingsforsøkene ble utført med et Kemira jar-test apparat med individuelle omrørere og tilhørende styring (figur 8). Hvert begerglass ble fylt med 1 liter avløpsvann. Det ble gjennomført forsøk uten å justere fellings-pH, og forsøk med å senke fellings-pH. Bakgrunnen for å senke pH-verdien ved felling av proteinholdig avløpsvann er at 60-70% av proteinene har sitt isoelektriske punkt (pI) (nøytralpunkt) mellom pH 4.5 og 5.5. Ved å redusere pH i innkommende prosessvann til verdier rundt 5, vil proteinenes ladninger reduseres, noe som kan medføre at proteinmolekyler koagulerer.

Fellingsmiddel ble tilsatt ved hurtigomrøring (400 rpm i 0,5 min). For senking av fellings-pH ble det benyttet fortdynnet saltsyre (10 ml kons. saltsyre i 100 ml vann). Deretter fulgte sakteomrøring (30 rpm) i 5 min. Etter sakteomrøring ble begrene stående i ca. 10 min. I denne perioden floterde fettholdig og utfelt organisk materiale. Mengden som ble dannet var avhengig av hvor godt fellingen fungerte. Det synes å være mulig å fjerne dette floterde slammet ved siling gjennom duk med lysåpninger på 90 µm. Imidlertid tettet slammet duken raskt, noe som medførte at slammet ble helt av før prøvene ble filtrert gjennom 90 µm-duken. Etter filtrering ble prøvene analysert med hensyn på organisk karbon. Analysen som ble benyttet var NPOC/DC (non-purgeable organic carbon) som egner seg for sjøvannsprøver.

Vanntemperaturen under fellingsforsøkene var ca. 10°C.

Det ble benyttet 3 ulike fellingsmidler, nemlig kitosan, alginat og lignosulfonat av ulike kvaliteter. Det ble laget 0,5% doseringsløsninger av alle 3 fellingsmidlene. Kitosan ble løst i fortdynnet saltsyre, mens alginat og lignosulfonat ble løst i vann:

Kitosan: BN599 (høyviskøs) og TM381 (lavviskøs). Begge fra Primex Ingrediens ASA, Avaldsnes, Karmøy. Kitosan er en naturbasert organisk polymer fremstilt fra reke- og krabbeskall.

Aminogruppene på de deacetylerede enhetene gir kitosan en kationisk karakter (positivt ladet) i hele det sure pH-området (pK<sub>a</sub> ligger i området 6.2-7.0), og vil dermed kunne nøytralisere og destabilisere negativt ladede partikler i vann.

Alginat: S20 (høyviskøs) og XL-RB (lavviskøs). Begge fra FMC Biopolymers, Drammen. Alginat er en naturlig polymer fremstillet av tang og tare. I likhet med kitosan er alginat en polysakkarid, men i

motsetning til kitosan, er det knyttet reaktive karboksyl-grupper til polysakkaridene. Dette gjør at alginat er løselig i vann og negativt ladet (anionisk). Kostnadmessig er alginat rimligere enn kitosan.

Lignosulfonat: Borresperse CA fra Lignotech AS.



Figur 11. Jar-test apparat med omrørere og begerglass

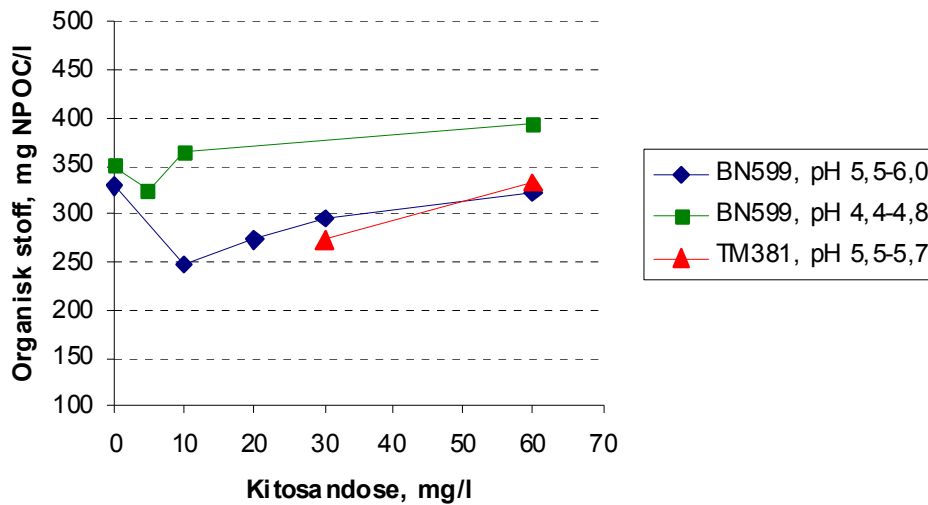
### 5.3 Resultater

Ingen av fellingsmidlene ga god felling. Vannet var fortsatt rødfarget eller brunfarget (avhengig av pH) etter felling. Dette framgår også av analyseresultatene (figur 9).

Best resultat ble oppnådd uten pH-justering (pH 5,5-6,0) med lave kitosandoser. Kitosanløsningen er sur, noe som forklarer at fellings-pH var så lav som 5,5-6,0 selv uten ekstra syredosering.

Ved 10 mg/l av kvaliteten BN599 uten pH-justering var NPOC verdien 247 mg/l noe som tilsvarer 25% reduksjon i organisk karbon. Kvaliteten TM381 synes å gi tilsvarende resultater, uten at denne ble prøvd ved de laveste doseringene.

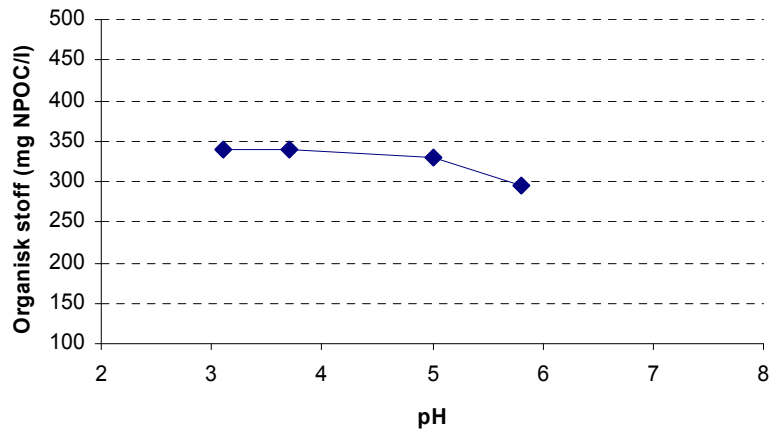
Ved å senke fellings-pH til 4,4-4,8 med syre ble resultatene dårligere (figur 9). Bare en svak reduksjon i organisk stoff ble registrert ved en kitosandose på 5 mg/l. Ved høyere doseringer var konsentrasjonene høyere i vann tilsatt kitosan enn i kontrollen uten kitosan.



**Figur 12.** Konsentrasjon av organisk stoff (NPOC) etter felling og filtrering ved ulike kitosandoser og ulike fellings-pH. Det ble benyttet kitosan av kvalitetene BN599 og TM381.

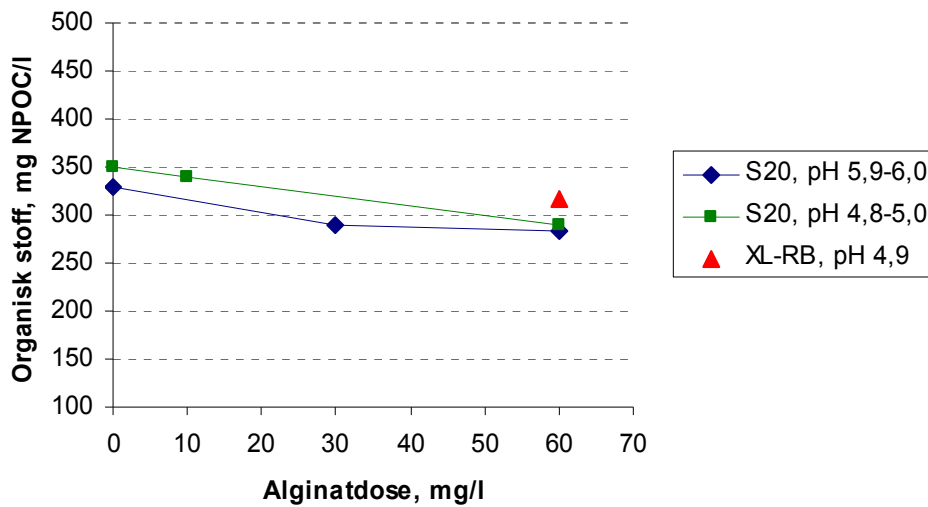
Også ved en fast dosering på 30 mg/l kitosan (BN599) ble det oppnådd lavest konsentrasjon av organisk stoff ved høy pH (figur 10). Best resultat ble oppnådd ved en fellings-pH på 5,8. Dette kan tyde på at koagulerings-effekten er mer styrt av brobygging enn av ladningsnøytralisering. Ved brobygging vil de lange kitosanmolekylene danne bindinger mellom partikler i avløpsvannet og derved forårsake koagulering. Dersom ladningsnøytralisering hadde vært den dominerende mekanismen ville det være naturlig at koaguleringen fungerte best ved lavere pH, da kitosan har en større positiv ladning i det lave pH-området.

Resultatene kan tyde på at det bør gjøres noen flere forsøk i pH-området mellom 6 og 7 med ferskt blodvann. Blodvannet som ble benyttet i denne undersøkelsen var ca. 1 døgn gammelt, og hadde overraskende lav pH-verdi (6,1) i forhold til at det ble benyttet sjøvann i slakteprosessen. Normalt vil sjøvann ha pH-verdier over 7. Den lave pH-verdien kan forklares med at det dannes organiske syrer i nedbrytingsprosessen av blod og protein. Vannets lukt indikerte at slike prosesser allerede var igang. Forsøk som er gjennomført tidligere ved NIVA med andre fellingsmidler tyder på at det er lettere å oppnå gode resultater med ferskt blodvann enn med vann hvor nedbrytingsprosessen har startet.



**Figur 13.** Konsentrasjon av organisk stoff (NPOC) etter felling og filtrering ved ulike pH- verdier ved en fast kitosandosering på 30 mg/l kitosan (BN599).

I motsetning til resultatene som ble oppnådd med kitosan, fungerte alginat best ved høye doseringer (figur 11). Det var små forskjeller i effekt ved å justere fellings-pH. Ved en alginatdose på 60 mg/l uten justering av fellings-pH (pH 5,9-6,0), ble det oppnådd en reduksjon i NPOC på 14%.



**Figur 14.** Konsentrasjon av organisk stoff (NPOC) etter felling og filtrering ved ulike alginatdoser og ulike fellings-pH. Det ble benyttet alginat av kvalitetene S20 og XL-RB.

I forsøkene hvor lignosulfonat ble benyttet ble det ikke registret utfellinger i det hele tatt. Konsentrasjonene av organisk stoff var høyere i vann tilsatt lignosulfonat enn i kontrollen uten lignosulfonat (tabell 11).



**Tabell 14.** Konsentrasjon av organisk stoff (NPOC) etter felling og filtrering ved ulike doser lignosulfonat og lav fellings-pH. Det ble benyttet lignosulfonat av kvaliteten Borresperse CA.

Dose, mg/l	0	30	60
fellings-pH	4,8	4,7	4,6
NPOC, mg/l	349	355	410

## 5.4 Konklusjon

Ved desinfisering av blodvann fra lakseslakterier med ozon, er det en fordel å fjerne så mye organisk stoff som mulig før ozoneringen. Blodprotein kan fjernes ved bruk av et fellingsmiddel. I denne undersøkelsen ble effekten av noen naturlige organiske fellingsmidler (kitosan, alginat og lignosulfonat) undersøkt. Ingen av fellingsmidlene ga god utfelling. Best resultat (25% reduksjon i organisk karbon) ble oppnådd ved pH 5,5-6,0 og en kitosandose på 10 mg/l. Blodvannet som ble benyttet var ikke helt ferskt (1 døgn gammelt), noe som kan ha bidratt til de dårlige resultatene.

## 6. Referanser

1. Aylward G.H. og Findlay T.J.V. (1986) SI Chemical data. 2. utg. John Wiley & Sons, Jacaranda, Australia, ISBN 0 471 03851 2.
2. Wedemeyer G.A., Nelson N.C. og Yasutake W.T. (1979) Physiological and biochemical aspects of ozone toxicity to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Fish. Res. Board Can., 36, s. 605-614.
3. Fisher D.J., Burton D.T., Yonkos L.T., Turley S.D. and Ziegler G.P. 1999. The relative acute toxicity of continuous and intermittent exposures of chlorine and bromine to aquatic organisms in the presence and absence of ammonia. Water Research, 760-768.
4. J. Hoigné og H. Bader (1983a) Rate constants of reaction of ozone with organic and inorganic compounds in water – I. Non-dissociating organic compounds. Wat. Res. 17, s. 173-183.
5. J. Hoigné og H. Bader (1983b) Rate constants of reaction of ozone with organic and inorganic compounds in water – II. Dissociating organic compounds. Wat. Res. 17, s. 185-194.
6. W.H. Glaze et al. (1987) The chemistry of water treatment processes involving ozone, hydrogen peroxide, and ultraviolet radiation. Ozone Sci. Eng. 9 (4), s. 335-?
7. W.H. Glaze og J.W. Kang (1988) Advanced oxidation processes for treating groundwater contaminated with TCE and PCE: Laboratory studies. J. AWWA. 88 (5), s 57-63.
8. Hutchinson T.H, Hutchings M.J. and Moore K.W. 1997. A review of the effects of bromate on aquatic organisms and toxicity of bromate to oyster (*Crassostrea gigas*) embryos. Ecotox. and Environ. Safety, 38, 238-243.
9. Harboe M. og Poleo B.S. 1997. Halogenforbindelser i det marine miljøet: Forekomst, kjemi, og giftighet. Rapport, Biologisk Institutt, Universitetet i Oslo, 55 s.
10. Greenberg A.E., Clesceri L.S. og Eaton A.D. (eds.) (1992) Standard methods for the examination of water and wastewater. 18. utg. APHA, AWWA og WEF. ISBN 0-87553-207-1.
11. Gordon G., Cooper W.J., Rice R.G. og Pacey G.E. (1992) Disinfectant Residual Measurement Methods, 2. utg. AWWARF og AWWA, Denver, CO.
12. Shechter H. (1973) Spectrophotometric method for determination of ozone in aqueous solutions. Wat. Res. 7, s. 729-?.
13. Gordon G., Rakness K., Vornehm D. og Wood D. (1989) Limitations of the iodometric determination of ozone. J. AWWA 81(6), s. 72-76.
14. Longley K.E. (ed.) (1986) Wastewater disinfection. Manual practice No. FD-10. Water Pollution Control Federation, Alexandria, Virginia, USA.
15. Ward S.B. og Larder D.W. (1973) The determination of ozone in the presence of chlorine. Water Treatment Examination. 22, s. 222-229.
16. Liebermann J. et al. (1980) Development of the FACTS procedure for combined forms of chlorine and ozone in aqueous solutions. Env. Sci. Techn. 14, s. 1395.
17. EPA (1999) Alternative disinfectants and oxidants. Guidance manual. United States Environmental Protection Agency, Office of water, EPA 815-R-99-014, 346 s.
18. Wuhrmann K. og Meyrath J. (1955) The bactericidal action of ozone solution. Schweiz. J. Allgen. Pathol. Bakteriol. 18, s. 1060.
19. Dominigue E.L. et al. (1988) Effects of three oxidizing biocides on *Legionella pneumophila*, serogroup 1. Appl. Environ. Microbiol. 40, s. 11-30.
20. Bablon G. et al. 1991. Practical application of ozone: principles and case studies. Ozone in Water Treatment Application and Engineering. AWWARF.
21. Vaughn J.M. et al. 1987. Inactivation of human and simian rotaviruses by ozone. Appl. Env. Microbiol. 53, s. 2218-2221.
22. Korich D.G., Mead J.R., Madore M.S., Sinclair N.A. and Sterling C.R. 1990. Effects of ozone, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 56, s. 1423-1428.

23. Finch, G. R., Black E.K. og Gyürék L.L. 1994. Ozone and chlorine inactivation of *Cryptosporidium*. Proceedings, Water Quality Technology Conference, Part II, San Francisco, CA.
24. Wickramanayake G.B. 1991. Disinfection and sterilization by ozone. In Disinfection, Sterilization, and Preservation. (Block ed.), Lea & Febiger, Pennsylvania, USA., s. 182-190.
25. Kawamura, K., Kaneko M., Hirata T., and Taguchi K. 1986. Microbial indicators for the efficiency of disinfection processes. *Water Sci. Technol.*, 18, 175-184.
26. Sugita H., Asai T., Hayashi K., Mitsuya T. Amanuma K., Maruyama C. and Deguchi Y. 1992. Application of ozone disinfection to remove *Enterococcus seriolicida*, *Pasteurella piscicida*, and *Vibrio anguillarum* from seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 4072-4075.
27. Liltved H., Hektoen H. og Efraimsen H. 1995. Inactivation of bacterial and viral fish pathogens by ozonation or UV irradiation in water of different salinity. *Aquacult. Eng.* 14, s. 107-122.
28. Wedemeyer G.A. og Nelson N.C. 1977. Survival of two bacterial fish pathogens (*Aeromonas salmonicida* and Enteric Redmouth Bacterium) in ozonated , chlorinated and untreated waters. *J. Fish. Res. Board Can.* 34, s. 429-432.
29. Liltved H. og Landfald B. 1995. Use of alternative disinfectants, individually and in combination, in aquacultural wastewater treatment. *Aquacult. Res.* 26, s. 567-576.
30. Ito, S., Yoshimizu M, and Ezura Y. 1997. Disinfection effects of low level of total residual oxidants in artificial seawater on fish pathogenic microorganisms. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish*, 63, 97-102.
31. Wedemeyer G.A., Nelson N.C. og Smith C.A. 1978. Survival of the salmonid viruses infectious hematopoietic necrosis (IHNV) and infectious pancreatic necrosis (IPNV) in ozonated, chlorinated, and untreated waters. *J. Fish. Res. Board Can.* 35, s.875-879.
32. Liltved H., Vogelsang C., Modahl I. and Dannevig B. 2006. High resistance of fish pathogenic viruses to UV irradiation and ozonated seawater. *Aquacultural Engineering*, 34, 72-82.
33. Riesser J. et al. 1977. Possible mechanisms of poliovirus inactivation by ozone. I: Forum on zone Disinfection. International Ozone Institute, New York, N.Y.

NIVA: Norges ledende kompetansesenter på vannmiljø

NIVA gir offentlig vannforvaltning, næringsliv og allmennheten grunnlag for god vannforvaltning gjennom oppdragsbasert forsknings-, utrednings- og utviklingsarbeid. NIVA kjennetegnes ved stor faglig bredde og godt kontaktnett til fagmiljøer i inn- og utland. Faglig tyngde, tverrfaglig arbeidsform og en helhetlig tilnæringsmåte er vårt grunnlag for å være en god rådgiver for forvaltning og samfunnsliv.



Norsk institutt for vannforskning

Gaustadalléen 21 • 0349 Oslo  
Telefon: 02348 • Faks: 22 18 52 00  
[www.niva.no](http://www.niva.no) • [post@niva.no](mailto:post@niva.no)