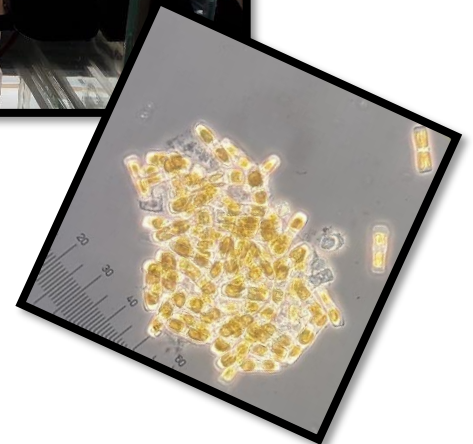


Screening av flerumettede fettsyrer i nordlige og spanske marine mikroalger, med hovedvekt på EPA og DHA innhold ved 10°C og 15°C



Hege Myrdal Kvamme
Masteroppgave i Biologi - Mikrobiologi



Institutt for Biologi
Universitetet i Bergen



Juni 2017

Forord:

Først og fremst vil jeg takke min veileder, Svein Rune Erga, for mye god hjelp og veiledning gjennom det skriftlige arbeidet med oppgaven min. Jeg vil gjerne takke Pia Steinrücken og Siv Kristin Prestegard for god opplæring og mye tålmodighet på laboratoriet. Jeg vil også takke Svein Are Mjøs for god hjelp med fettsyreprøvene mine. Ellers vil jeg takke alle på gruppen som har hjelp til med store og små spørsmål som har dukket opp underveis i arbeidet. Jeg vil også takke Jeroen Hendrik de Vree for godt samarbeid, og god planlegging rundt bruk av kjølerom og annet utstyr.

Til slutt vil jeg gjerne takke familien min som har motivert meg og støttet meg gjennom de travle tidene, og hjelp til med barna når det har vært nødvendig. Vil også takke min samboer Christian og mine to barn, Nicholas og Mathias, som har vært tålmodig med meg i disse to travle årene på masterstudiet. Selv under de mest stressende dagene har dere vært der og oppmuntret meg, dere har gjort sjongleringen mellom skole og familielivet mye bedre enn forventet!

Takk for at jeg fikk muligheten til å jobbe på denne spennende oppgaven, jeg har hatt et kjekt år og er nå klar for å fortsette ut i arbeidslivet!

Hege Myrdal Kvamme

Bergen, 1. juni 2017

*Forsidebilde: Bilde fra screeningen¹ og mikroskopbilde av *Thalassiosira hispida*²*

^{1, 2} tatt av Hege Kvamme

Abstract

Microalgae from northern waterbodies (Svalbard and Bergen) and some strains from Spain were grown at 10°C and 15°C, biomass was harvested in exponential and stationary phase to check the content of essential fatty acids, as well as health-promoting carotenoids. The algae were grown in 300 mL culture tubes in a screenatorium with light intensity of about 160 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. All the 15 strains were first grown at 10°C, then at 15°C. Dry weight was measured on the days when samples were taken for fatty acids/pigments, mainly to determine how much fatty acids, chlorophyll *a* and carotenoids the algae contained per gram dry weight.

Optical density at 750 (OD750) was measured every day to see what growth phase the strains were in, and to find out when it was time to harvest. In addition, Quantum yield (QY) was measured every day to see what physiological condition the algae were in. The fatty acids were extracted and measured using GC-MS (gas chromatography and mass spectrometry), data handling was performed in Chrombox. The extraction was done by myself, and the driving of GC-MS was done by Svein Are Mjøs at the Department of Chemistry, UIB.

The results showed quite high EPA content in percent of dry weight in several of the strains, and almost every strain had higher % EPA per dry weight when grown at 10°C than 15°C. The local strains M117, M122, M138 and M139 of the diatom *Entomoneis* sp. from Store Lungegårdsvann contained EPA far above the lower limit of 4 %, with a percentage of 6.7 %, 9.9 %, 9.3 % and 7.8 % respectively, in stationary phase grown at 10°C. At 15°C, the diatom strain from Svalbard M88 (*Thalassiosira hispida*) achieved the highest % EPA per dry weight in exponential phase (6.7 %), in addition, the EPA level is also well above 4 % in stationary phase in this strain (5.0 %). The strains from Store Lungegårdsvann (*Entomoneis* sp.) achieved high % EPA levels in stationary phase also at 15°C, but not as high as at 10°C. At 15°C they were 5.9 % (M117), 5.3 % (M122), 6.6 % (M138) and 5.9 % (M139).

In addition to high content of the essential fatty acids, it was also important to look at the growth rate in the exponential phase, it should preferably be $\geq 0.7 \text{ d}^{-1}$, which corresponds to a doubling in the number of cells per day. The strains with a growth rate of $\geq 0.7 \text{ d}^{-1}$ in this study were the local strains M117, M122, M138 and M139 in exponential phase at 10°C. At 15°C, the Arctic diatom strain M88 (*Thalassiosira hispida*), the local strains M117, M122,

M138, M139, B58 (the diatom *Phaeodactylum tricornutum*) and the Spanish strains *Isochrysis galbana* (Prymnesiophyceae) and *Phaeodactylum tricornutum* reached the criterion of a growth rate of $\geq 0.7 \text{ d}^{-1}$ in the exponential phase.

The “winner” strains of my study are M122 and M138 from Store Lungegårdsvann grown at 10°C, both strains achieved a growth rate of 0.9 d^{-1} , in addition to a % EPA per dry weight of 9.9 % and 9.3 %, respectively. Carotenoids showed normal values for all strains and no special pattern could be revealed. None of the strains reached the lower limit of 12 % DHA per TFA (total fatty acids) neither in exponential nor in stationary phase.

Sammendrag

Mikroalger fra nordlige vannmasser (Svalbard og Bergen) og noen stammer fra Spania ble dyrket ved 10°C og 15°C, det ble høstet biomasse i eksponentiell og stasjonær fase for å sjekke innholdet av essensielle fettsyrer, samt helsefremmende karotenoider. Algene ble dyrket i 300 mL dyrkningsrør i kjølerom med en kontinuerlig lysintensitet på ca. 160 $\mu\text{mol fotoner m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Alle de 15 stammene ble først dyrket ved 10°C, deretter ved 15°C. Tørrvekt ble målt de dagene det ble tatt prøver til fettsyrer/pigmenter, hovedsakelig for å finne ut hvor mye fettsyrer, karotenoider og klorofyll *a* algene inneholdt per gram tørrvekt.

Optisk tetthet ved 750 (OD750) ble målt hver dag for å få en oversikt over hvilke faser stammene var i, og for å finne ut når det var tid for høsting. I tillegg ble det målt Quantum yield (QY) hver dag for å følge med på den fysiologiske tilstanden til algene. Fettsyrene ble ekstrahert og målt ved hjelp gasskromatografi og massespektrometri (GC-MS) og datahåndtering ble utført i Chrombox. Ekstraksjonen utførte jeg selv, mens kjøring av GC-MS ble gjort av Svein Are Mjøs på Kjemisk institutt ved UIB.

Resultatene viste høyt innhold av EPA i % av tørrvekt i flere av stammene, og de fleste hadde høyere % EPA per tørrvekt dyrket ved 10°C enn ved 15°C. De lokale stammene M117, M122, M138 og M139 av diatomeen *Entomoneis* sp. fra Store Lungegårdsvann ligger langt over grenseverdien på 4 % med henholdsvis 6,7 %, 9,9 %, 9,3 % og 7,8 % i stasjonær fase dyrket ved 10°C. Ved 15°C er det den arktiske stammen fra Svalbard, M88 (diatomeen *Thalassiosira hispida*), som oppnår den høyeste % EPA per tørrvekt. Dette ble oppnådd i eksponentiell fase med 6,7 %. I tillegg er EPA nivået også over 4 % i stasjonær fase i denne stammen med en verdi på 5,0 %. Stammene fra Store Lungegårdsvann (*Entomoneis* sp.) oppnådde høy % EPA i stasjonærfase også ved 15°C, men ikke like høy som ved 10°C. Ved 15°C ligger de på 5,9 % (M117), 5,3 % (M122), 6,6 % (M138) og 5,9 % (M139).

I tillegg til høyt innhold av essensielle fettsyrer er det viktig å se på veksthastigheten i eksponentiell fase, den bør helst ligge på $\geq 0,7 \text{ d}^{-1}$, som tilsvarer en dobling av antall celler per døgn. Stammene som kommer bra ut her, med en veksthastighet på $\geq 0,7 \text{ d}^{-1}$, er de lokale stammene M117, M122, M138 og M139 ved 10°C. Ved 15°C er det den arktiske stammen M88 (*Thalassiosira hispida*), de lokale stammene M117, M122, M138, M139, B58 (diatomeen *Phaeodactylum tricornutum*) og de spanske stammene *Isochrysis galbana* (prymnesiophyceae) og *Phaeodactylum tricornutum* som nådde kriteriet på en

veksthastighet på $\geq 0,7 \text{ d}^{-1}$ i eksponentiell fase. Stammene som kommer best ut i denne studien er M122 og M138 fra Store Lungegårdsvann dyrket ved 10°C, begge oppnådde en veksthastighet på $0,9 \text{ d}^{-1}$, i tillegg til en % EPA per tørrvekt på henholdsvis 9,9 % og 9,3 %. Karotenoider viste normale verdier for alle stammene og ingen spesielle trekk ble oppdaget. Ingen av stammene nådde grenseverdien på 12 % DHA per TFA (totale fettsyrer) hverken i eksponentiell eller stasjonær fase.

Innhold

Forord:.....	3
Abstract	5
Sammendrag	7
Forkortelser:.....	11
1. Innledning.....	13
1.1. Hva er alger?.....	13
1.1.1. Mikroalgevekst i forhold til næringstilførsel og klimaendringer	14
1.1.2. Diatomeer.....	16
1.1.3. Dyrking av alger	19
1.2. Karotenoider.....	20
1.3. Fettsyrer	20
1.3.1. Viktige helseeffekter av fettsyrer	23
1.3.2. Eikosapentaensyre (EPA) og Dokosaheksaensyre (DHA)	23
2. Material og metoder	25
2.1. Bakgrunn:	25
2.2. Forarbeid	28
2.2.1. Klargjøring av Walne's medium:.....	29
2.2.2. Klargjøring av screenatorium	29
2.3. Optisk tetthet (OD) og Quantum yield (QY)	29
2.4. Tørrvekt	31
2.5. Screening	32
2.6. Pigmenter	33
2.7. Fettsyreanalyser	34
2.8. Mikroskopi og kamera.....	36
2.9. Statistikk	36
3. Resultat.....	37
3.1. Optisk tetthet	38
3.2. Tørrvekt	40
3.3. Klorofyll <i>a</i> og karotenoider.....	43
3.4. Fettsyrer	45
4. Diskusjon	53
4.1. Vekstområder:.....	53

4.1.1.	Svalbard	53
4.1.2.	Store Lungegårdsvann	55
4.1.3.	Spania	56
4.2.	Vekst og temperatur:	58
4.3.	Temperatur og fettsyreproduksjon	59
5.	Konklusjon:	64
	Videre arbeid:	66
	Referanser:	67
	Appendiks 1:	73
	Walne's medium:	73
	Tørrvekt data:	74
	OD750 data:	77
	Fettsyrer data:	81
	Pigment data:	89
	Appendiks 2:	96
	Statistikk:	96

Forkortelser:

µL – Mikro liter

ATP – Adenosine triphosphate

CCFM- Culture Colection Fitoplancton Marino

CO₂ – Karbondioksid

DHA – Dokosaheksaensyre

DW – Dry weight (Tørrvekt)

EPA – Eikosapentaensyre

FAME - Fettsyre-metylester

FID - Flammeioniserings-detektor

GC - Gasskromatografi

GC-MS - Gasskromatografi i kombinasjon med massespektroskopi

LcPUFA – Lang-kjedete flerumettede fettsyrer

mbar – Millibar

mg – Milligram

mL – Milliliter

MS - Massespektroskopi

n-3 – Omega 3

nm – Nanometer

OD – Optical density (optisk tetthet)

PSII – Fotosystem II

PUFA – Polyunsaturated fatty acid (flerumettede fettsyrer)

QY - Quantum yield (kvante utbytte)

TAG - Triacylglycerol

TFA – Total fatty acids (totale fettsyrer)

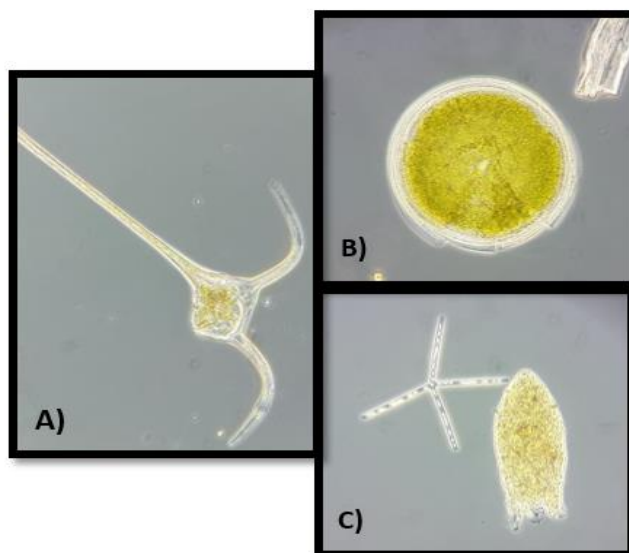
1. Innledning

1.1. Hva er alger?

Alger er en heterogen gruppe organismer (Figur 1) som i milliarder av år har spilt en stor rolle på jorden og gjør dette fortsatt i dag. Gjennom fotosyntesen produserer algene store mengder oksygen som er tilstede i jordens atmosfære, i tillegg til å produsere organisk karbon som andre organismer kan utnytte som næring (Graham *et al.* 2009). Moderne alger er vidt utbredt, og med sin fotosyntese står de for rundt 50 % av oksygenproduksjon på jorda (Graham *et al.* 2016). Vi har beviser i form av fossiler som daterer *Cyanobakteriene* hele 3,6 milliarder år tilbake. Disse fossilene er blitt funnet i bergarter på Grønland og i Australia (Nakrem & Manum 2009), og det blir hevdet at det er *Cyanobakterier* som er hovedårsaken til at atmosfæren på jordkloden ble oksygenrik (Tebbani *et al.* 2014).

Marine mikroalger er primærprodusenter som man finner i bunnen av næringskjeden, de gir dermed næringsgrunnlaget til nesten alt liv i havet (Thronsdén 2015). Deres tilpassingsevner og kapasitet til overlevelse gjør at de kan kolonisere alle typer omgivelser, og man finner dem i alt fra varme kilder til isblokker, i syrlige og ekstremt salte vann, i åpent hav og grotter, og til og med som parasitter på mennesker (Tebbani *et al.* 2014).

Mikroalger spiller en viktig rolle i havbruk som mat for larver og juvenile bløtdyr, krepsdyr og fiskearter, hvor de blir brukt både som levende fôr og som tørrfôr. Den ernæringsmessige verdien av mikroalger er relatert til deres biokjemiske sammensetning, spesielt lipid og fettsyreblandinger. I tillegg inneholder de andre viktige produkter som



Figur 1: Mikroalger er en heterogen gruppe og kan variere mye i form og størrelse, her er noen eksempler på forskjellige former mikroalger kan ha:

A) *Ceratium longipes*

B) *Cosinodiscus*

C) *Thalassionema nitzschioides* (det nederst til høyre er en ciliat som er et flimmerdyr og ikke en alge).

Foto: Hege Kvamme

pigmentene klorofyll, karotenoider (Jacobsen & Erga 2011) og fykobiliner (Graham et al. 2016), samt vitaminer og mineraler. Deres høye næringsinnhold er en viktig ressurs i blant annet helsekostprodukter (Orr & Borgvang 2016). Prymnesiophyceen *Isochrysis galbana* for eksempel, inneholder forholdsvis store mengder av verdifulle lipider, og blir vanligvis dyrket som matkilde for kommersiell produksjon i akvakultur (Sukenik & Wahnou 1991). Kvaliteten og kvantiteten av mikroalgelipid er viktig for ernæring av marine dyr, hvor noen av de flerumettede fettsyrene (PUFA) syntetisert av alger har vist seg å være essensielle for veksten og utviklingen av disse marine dyrene (Dunstan et al. 1993). Tilstedeværelsen av langkjedede n-3 fettsyrer er viktig ved valg av encellede marine alger til akvakulturformål, spesielt viktige er eikosapentaensyre (EPA), 20:5 n-3, og dokosaheksaensyre (DHA), 22:6 n-3 (Fidalgo et al. 1998).

Haptofytter, med blant annet slektene *Pavlova* og *Isochrysis*, anses å være høykvalitets fôr for marint dyreplankton som hoppekreps, dette er på grunn av liten størrelse, rask vekst, lett fordøyelighet og høyt næringsinnhold. *Pavlova lutheri* inneholder høye nivåer av flerumettede fettsyrer (PUFA) slik som EPA og DHA, som er forbindelser som dyrene får gjennom diettene sine. Til sammenligning er verdien av fisk og annen sjømat i menneskets diett delvis basert på slike omega-3-fettsyrer som fisk oppnår fra alger, direkte eller indirekte. *Pavlova* og andre mikroalger anvendes direkte som mat for fisk, krepsdyr og muslinger, eller som mat for rotatorier, hoppekreps, og saltvannsreker som igjen forbrukes av større dyr (Graham et al. 2016).

1.1.1. Mikroalgevekst i forhold til næringstilførsel og klimaendringer

For at alger skal vokse normalt er de avhengig av lys, vann og uorganisk karbon, i tillegg til en rekke mineralske næringsstoffer. De essensielle næringsstoffene som trengs i større mengder er nitrogen og fosfat, samt silikat hos diatomeer. Algeoppblomstringer i havet blir ofte begrenset av et av disse essensielle næringsstoffene (Graham et al. 2016).

Forskjeller i vekstresponsene til alger ved lave og høye nivåer av mineralnæringsstoffer kan observeres i naturen ved å sammenligne oligotrofe og eutrofe vannsystemer. Oligotrofe akvatiske systemer er kjennetegnet ved å ha forholdsvis lave næringskonsentrasjoner og lav algebiomasse. I motsetning til dette er eutrofe vannsystemer områder med relativt høye nivåer av næringsstoffer, store vedvarende populasjoner av alger, og forholdsvis lav

artsdiversitet. Derfor er det viktig å vite hvilket næringsstoff som er begrensende for algevekst i forskjellige områder (Graham *et al.* 2016).

Siden klimaet styrer de grunnleggende parameterne som regulerer algeveksten, inkludert vanntemperatur, næringsstoff og lys, vil endringer i klimaet forventes å føre til endringer i algeoppblomstringsdynamikken. Ekspansjonen av algeoppblomstringer kan være delvis relatert til storskala værmønstre og klimaforandringer. Disse forandringene er ikke bare positive, siden ikke bare alger man ønsker får en oppblomstring, men også skadelige alger som blant annet produserer giftstoffer som skader mennesker og dyr. I Nordøst Atlanteren har en økning i dinoflagellater som skader og fortrenger diatome populasjoner, vært knyttet til regionale økninger i overflatetemperaturer koblet til North Atlantic Oscillation (Edwards *et al.* 2006). Man kan generelt sett si at klimaet styrer de fundamentale parameterne som regulerer algevekst. Det kan dermed forventes at klimaet kan føre til endringer i artssammensetning, trofisk struktur og funksjonen av marine økosystemer (Friocourt *et al.* 2012).

I tillegg til endringer i klima, har menneskelig aktivitet endret næringsregimene i kystnære farvann enormt, først og fremst som følge av kloakkutslipp og økt anvendelse av syntetisk gjødsel. Tilførsel av fosfor til kystsonen har økt minst tre ganger i forhold til førindustrielt nivå, mens utslipp av nitrogen har økt i enda større grad (Glibert *et al.* 2005). Men tiltak er i de senere årene satt i gang for å blant annet minke avrenning fra jordbruk (Erlandsen *et al.* 2017).

I de kystnære områdene i Nordsjøen er *Dinophysis acuminata*, samt andre dinoflagellater, ofte forbundet med forholdsvis høye temperaturer, lav saltholdighet i vannoverflaten og/eller forholdsvis sterk lagdeling. Disse forholdene oppstår vanligvis under sensommeren (evt. tidlig høst) og er ofte ugunstig for diatomeer på grunn av lite tilgjengelig silikat (Friocourt *et al.* 2012).

Populasjonsveksten hos alger kan bli begrenset av abiotiske faktorer slik som lys, temperaturer og næring, men i tillegg kan det også bli begrenset av interaksjoner mellom mikroorganismer, slik som beiting, parasittisme, virus og bakterie angrep, samt konkurranse om ressursene. Selv om man ofte antar at skadelige algeoppblomstringer oppnår høy biomasse og dominans på grunn av høye vekstrater, er det ikke alltid slik. Mange dinoflagellater for eksempel, vokser relativt langsomt og er dårlige næringskonkurrenter sammenlignet med samtidige diatomeer (Medlin & Cembella 2013). Dette er på grunn av at

diatomeer er såkalte r-strateger (Klais *et al.* 2011) som betyr at de vanligvis lever i ustabile, omrørte omgivelser og har evnen til å reproducere raskt. Den "strategiske hensikten" er å oversvømme habitatet med avkom, slik at uansett predasjon eller dødelighet, vil i det minste noen av avkommene overleve for å reproducere (Bozeman Science 2012). K-strateger derimot, slik som dinoflagellater (Klais *et al.* 2011), foretrekker mer stabile miljøer. De er større i størrelse, vokser langsommere og produserer færre avkom (Bozeman Science 2012).

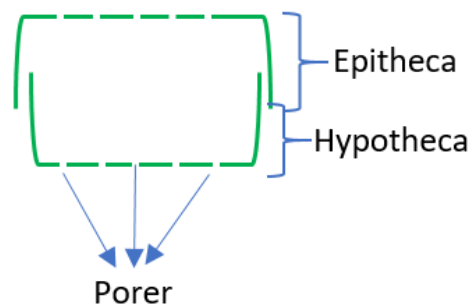
Effektene av global oppvarming har vært spesielt tydelig i Arktis og Antarktis hvor varmere temperaturer fører til smelting av havis. Tidligere ble planteplankton oppblomstringene over kontinentalsoklene i Polhavet normalt begrenset av lys, og skjedde derfor bare når vannet var fritt for havis. Men i juli 2011 observerte Arrigo *et al.* (2014) en stor diatome oppblomstring under pakkisen på Chukchi sjøen (området nordvest i Alaska) som strakte seg fra kanten av isen og 100 km inn i isdekket. På den tiden var pakkisen 0,8 til 1,2 m tykk, men isen var 30 % - 40 % dekket av smeltesdammer. Tynn havis og smeltesdammer tillatte lysgjennomtrengning til den underliggende vannsøylen og fremmet en oppblomstring av pelagiske diatomeer dominert av *Chaetoceros*, *Thalassiosira*, og *Fragilariopsis* (Graham *et al.* 2016).

Økende vanntemperatur og vannsøylelagdeling kan forventes å ha en sterk innvirkning på planteplanktonet på grunn av ressursbehovet og temperaturnivåer som arter er tilpasset. Vind bestemmer forekomsten av oppstrømninger og nedstrømninger, som i sin tur påvirker sterkt tilførselen av makronæringsstoffer til overflaten (Hallegraeff 2010). Stigende havtemperatur forbundet med global oppvarming kan forventes å favorisere en bred utvidelse av vekstområder mot høyere breddegrader, men dette vil også gi en uforholdsmessig stor økning i antall marine flagellater, som har en tendens til å trives i varmere stratifisert vannområder. Stigende havtemperaturer har allerede vært assosiert med økning av dinoflagellater i Nord-Atlanteren, Nordsjøen og Østersjøen, samt sesongmessige endringer i tidspunktet for oppblomstringer av dinoflagellater i planktonets årssyklus (Medlin & Cembella 2013).

1.1.2. Diatomeer

Diatomeer er hovedfokuset i denne masteroppgaven, hvor 13 av mine 15 stammer er diatomeer, de blir derfor presentert litt nærmere her.

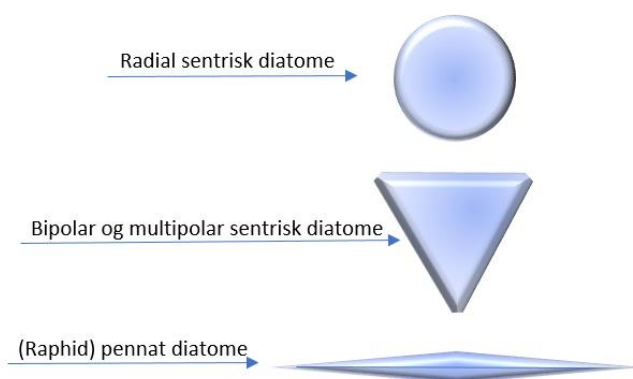
Diatomeer er en diverse gruppe mikroalger med ca. 100 000 beskrevne arter på verdensbasis, og rundt 220 slekter (Naustvoll 2014). I tillegg er de viktige primære produsenter som anslagsvis er ansvarlig for 20 % av den globale karbon fikseringen (Graham *et al.* 2016). Diatomeene dominerer blant planteplankton i kaldt, næringsrikt vann, som blant annet oppstrømningsområder i havene og nylig sirkulerte innsjøer. Diatomeenes celler er innesluttet i en stiv beholder med lokk, frustule eller theka, som er bygd opp av silikat. Frustulen består av en bunn (hypotheca) og ett lokk (epitheca) hvor lokket overlapper bunnen og er dermed noe større (Figur 2). Diatomeer er oppkalt etter sin karakteristiske todelte cellevegg, hvor «diatomos» kommer fra gresk og betyr «delt i to» (Graham *et al.* 2016).



Figur 2: Skjematisk framstilling av frustulen til en diatome hvor det er illustrert at den består av ett lokk (epiteca) og en bunn (hypoteca).
Laget av Hege Kvamme

Selv om diatomeene bare forekommer som ikke-flaggelerte enkeltceller eller som celle-aggregater blir de sett på som veldig vellykket gjennom evolusjonen. Det er estimert at det finnes ca. 200 000 arter, hvor nye arter kontinuerlig blir beskrevet fra fossile avleiringer og moderne habitater (Graham *et al.* 2016).

Molekylære og fossile beviser indikerer at de tidligste diatomeene var radially symmetriske, i likhet med noen av de moderne diatomeene. Radially symmetrisk vil si at porene er arrangert i linjer (Striae) som går fra midten og ut mot randen. Radiale symmetriske diatomeer med mer eller mindre sirkulært omriss er kalt for radiale sentriske diatomeer (Figur 3).

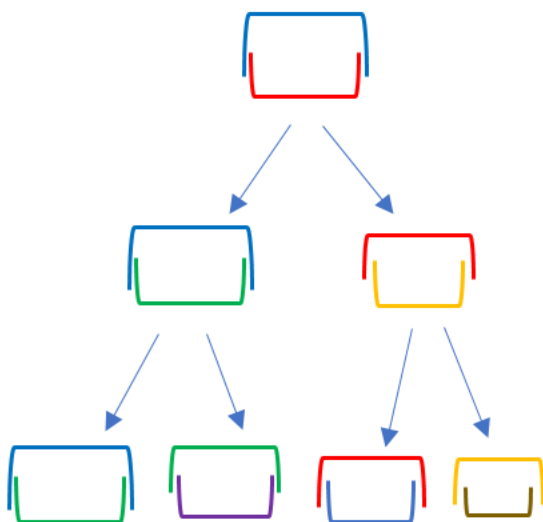


Figur 3: Skjematiske framstillinger av en radial sentrisk diatome, en bipolar/multipolar sentrisk diatome og en pennat diatome.
Laget av Hege Kvamme

Senere utviklet det seg diatomeer med mer langstrakte, bipolare eller multipolare former (f.eks trekantet omriss), disse blir kalt for bipolare eller multipolare sentriske diatomeer. En linje av de bipolare sentriske diatomeene ga senere opphav til de pennate diatomeene som har

bilateral symmetri. Videre utviklet noen av de pennate diatomeene en slisse som blir kalt en rafe, disse diatomeene blir kalt for raphid pennate diatomeer. Utviklingen av rafe var en viktig del i evolusjonen, den gjorde dem i stand til å skille ut slim fra spalten, noe som førte til rask bevegelse på fast underlag, hvor de kunne bevege seg bortover som en slags beltevogn. De kunne nå okkupere nye naturområder. Utviklingen av rafe er så viktig økologisk sett at den er blitt sammenlignet med utviklingen av flyving hos fugler (Graham *et al.* 2016).

Silikat som frustulen er laget av er et forholdsvis tungt materiale, som kan gi ballast og dermed regulere oppdriften hos diatome celler, slik kan de synke og dra nytte av mineralske næringsstoffer tilgjengelig i dypere farvann (Raven & Waite 2004). Frustulen er også karakteristisk pyntet med trange porer som er kjent som aerolae, som kan ha mange utforminger, blant annet slisser, rør, børster eller tråder, disse er ofte artsspesifikke (Naustvoll 2014; Graham *et al.* 2016). Slike åpninger hjelper til med oppdrift ved å lette den tunge frustulen, i tillegg gir de økt kontakt mellom cytoplasma og ytre miljø, og kan ofte bidra til cellemotilitet (Graham *et al.* 2016).



Figur 4: skjematisk fremstilling av celledeling hos Diatomeene. Her ser vi at hver del fra den opprinnelige blir til ett lokk (Epitheka) i neste generasjon, og at de må syntetisere en ny bunn (Hypotheka). Den gjennomsnittlige størrelsen på populasjonen blir etter hvert redusert. Laget av Hege Kvamme

Gjennom celledelingen hos diatomeene beholder begge dattercellene den ene delen fra morcellen som en epitheka (lokk), og de må begge syntetisere en ny hypotheka (bunn) (Figur 4). Siden hypotheka er noe mindre enn epitheka vil den gjennomsnittlige celledørrelsen i diatomepopulasjonene etterhvert bli redusert. For å unngå å bli alt for små skjer det en seksuell reproduksjon når størrelsen når et kritisk lavt nivå, og den opprinnelige størrelsen til diatomeene blir dermed gjenopprettet (Graham *et al.* 2016).

1.1.3. Dyrking av alger

Laboratorieforsøk og dyrking av marine mikroalger i småskala (Figur 5) har foregått i lang tid, mens dyrking i storskala (Figur 6) er fremdeles i startfasen. Derfor er det begrenset tilgang på data om storskala mikroalgedyrking, noe som betyr at det fort kan bli en del utfordringer når man begynner med dette. Det



Figur 5: Et lite utendørs algedyrkingsanlegg.
Foto: Hege Kvamme

er blant annet tidkrevende å screene mange stammer for å finne lovende kandidater til videre dyrking, samt å dyrke produktive lipid-rike alger og samtidig klare å holde disse



Figur 6: Storskala utendørs algedyrkingsanlegg.
Hentet fra: <https://pbs.twimg.com/media/Cl8-F1wWgAAAF3IB.jpg>

kulturene rene i et stort utendørs anlegg. I tillegg er det veldig energikrevende med CO₂ og næringsoverføring, samt vannpumping og høsting av algene. Men fordelene er også mange, både med tanke på bruk av viktige fettsyrer, og til utvinning av biodiesel. Blant annet kan mikroalger

bli dyrket i sjøvann eller brakkevann, noe som legger mindre beslag på ferskvannet. De kan samtidig utnytte CO₂ overskudd fra blant annet industrielle prosesser, og på denne måten redusere utslippet til atmosfæren. I tillegg kan næringsstoffer som algene trenger, slik som nitrogen og fosfor, fås fra avfallsvann. Mikroalger legger ikke beslag på landjord slik som landplanter gjør, og dermed blir det heller ingen konkurranse om ressursene med konvensjonelt landbruk (Rodolfi *et al.* 2009). Mikroalger er effektive å dyrke siden de kan doble biomassen sin på et døgn, og de nordlige artene (som jeg blant annet skal se mer på i denne oppgaven) har relativt høy produksjon selv ved lav temperatur, lite næring og svakt lys (Elvevoll *et al.* 2014).

1.2. Karotenoider

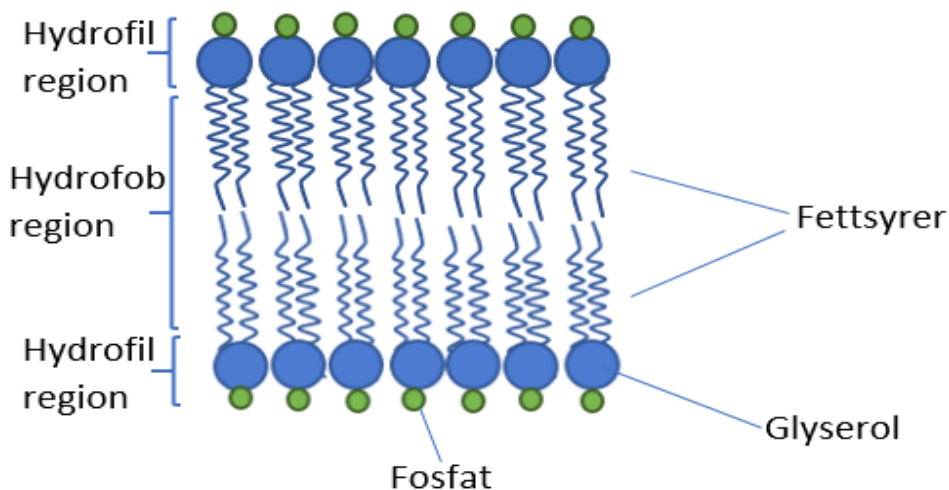
Karotenoider er plantepigmenter som er ansvarlige for lyse-røde, gule og oransje nyanser i mange frukter og grønnsaker. Disse pigmentene spiller en viktig rolle i plantehelse, og folk som spiser mat som inneholder karotenoider vil få beskyttende helsemessige fordeler.

Karotenoider finnes i cellene i et bredt utvalg av planter, alger og bakterier. De hjelper til med å absorbere lys energi til fotosyntesen.

Karotenoider virker også som antioksidanter i menneskekroppen. Noen karotenoider blir omdannet til vitamin A i kroppen, noe som er avgjørende for synet, og for normal vekst og utvikling. Karotenoider har også anti-inflammatoriske og immunsystem fordeler, og er noen ganger forbundet med kardiovaskulær sykdomsforebygging (Szalay 2015). Karotenoider er også antatt å redusere risikoen for visse kreftformer og øyensykdom (Johnson 2002).

1.3. Fettsyrer

Fettsyrer er tilstede i mikrobielle algelipider, som er en viktig komponent i cytoplasma og thylakoid membranen. De membranlipidene det finnes mest av er fosfolipider (Figur 7).



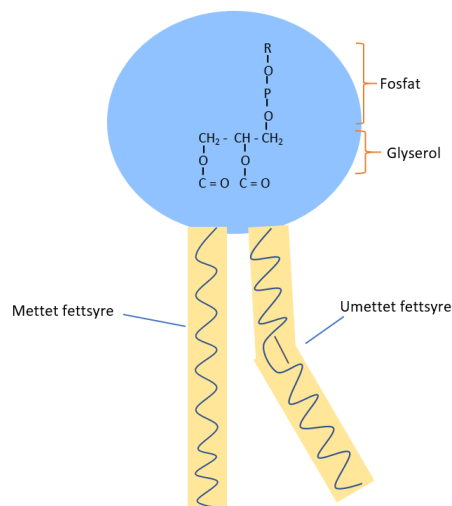
Figur 7: Skjematisk framstilling av en thylakoid membran med fosfolipider som illustrerer hvor fettsyrene er plassert. Fettsyrene danner en hydrofob region i membranen, mens glyserol i lag med fosfat danner en hydrofil region. Laget av Hege Kvamme

Kloroplaster er de organelle i alger som står for fotosyntesen og ligner på mange måter på mitokondrier i sin oppbygging. Begge har som funksjon å generere metabolsk energi, men kloroplastene er større og mer komplekse enn mitokondrier, og utfører flere oppgaver enn å

generere ATP. Blant annet syntetiserer kloroplastene aminosyrer, fettsyrer og lipidkomponenter i sine egne membraner (Cooper 2000).

Lipider eller fettmolekyler utgjør omtrent 50 % av massen til de fleste dyrecellemembraner, nesten alt av det gjenværende er proteiner. Alle lipidmolekylene i cellemembraner er amfipatisk (eller amfifile) som vil si at de har en hydrofil (“vannelskende”) og en hydrofob (“vann-fryktet”) ende (Alberts *et al.* 2002).

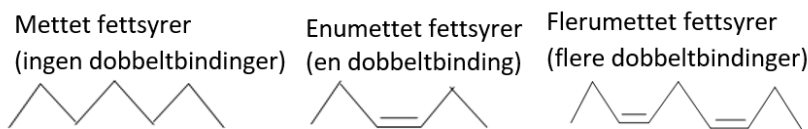
Fosfolipidene har en polar hodegruppe og to hydrofobe hydrokarbonhaler (Figur 8). Halene er vanligvis fettsyrer, og de kan variere i lengde (de inneholder normalt mellom 14 og 24 karbonatomer). Den ene halen har vanligvis en eller flere *cis*-dobbeltbindinger (umettede fettsyrer), mens den andre halen ikke har denne dobbeltbindingen (dvs. det er en mettet fettsyre). Hver dobbeltbinding danner en liten knekk i halen. Forskjeller i lengde og metning av fettsyre-halene er viktig fordi de påvirker evnen til fosfolipid molekylene til å pakke seg mot hverandre, og påvirker dermed flyten i membranen (Alberts *et al.* 2002).



Figur 8: Skjematisk figur av et fosfolipidmolekyl hvor det er et hydrofilt (vanntiltrekkende) hode som består av glyserol og fosfat, og en hydrofob (vannavstøtende) ende av fettsyrer. Fettsyrer med en knekk er umettet fettsyrer. Laget av Hege Kvamme (Tegnet etter: OpenStax Biology).

Fettsyrer består av en kjede av karbonatomer, med en karboksylsyrergruppe (COOH) i den ene enden og en metylgruppe (CH₃) i den andre enden. Karbonatomene i umettede fettsyrer er bundet sammen ved hjelp av dobbeltbinding(er), hvor fettsyrer med én dobbeltbinding kalles monoumettede fettsyrer (også kalt enumettede fettsyrer), og fettsyrer med flere dobbeltbindinger

kalles flerumettede fettsyrer (PUFA – polyunsaturated fatty acid) (Figur 9) (Lande 2009).



Figur 9: Skjematisk fremstilling av fettsyrer hvor man ser at mettet fettsyrer ikke har dobbeltbindinger, enumettet fettsyrer har én dobbeltbinding og flerumettet fettsyrer har mer enn en dobbeltbinding. Laget av Hege Kvamme

Dobbeltbindingene i

umettede fettsyrer kan være i *cis*- eller *trans*- konfigurasjon (Figur 10), men i mat er det vanligst med fettsyrer i *cis*-konfigurasjon, da dette minker smeltepunktet slik at de holder

seg flytende ved romtemperatur (Lunn & Theobald 2006).

Det er de flerumettede fettsyrene jeg skal se nærmere på

i denne oppgaven, disse fettsyrene kan deles inn i grupper

ut fra hvor dobbeltbindingen sitter. Sitter den første

dobbeltbindingen tre karbonatomer fra metylenden av

karbonkjeden kalles de omega-3-fettsyrer. På samme

måte har omega-6-fettsyrer den første dobbeltbindingen

6 karbonatomer fra metylenden av karbonkjeden (Lande

2009). Fettsyrekjedene varierer i lengde, og kan være alt fra 2 til 80 karbonatomer lang. I

mat er det vanligst å finne fettsyrer med en lengde på 14, 16, 18, 20 og 22 karbonatomer

(Lunn & Theobald 2006).

Fettsyresammensetningen til algeceller varierer mellom forskjellige stammer, men kan også variere i rene kulturer avhengig av temperatur, lys og næring. Vekst under lave temperaturer fremmer biosyntese av kort-kjedete fettsyrer, mens varmere temperaturer fremmer syntese

lang-kjedete fettsyrer (Madigan *et al.* 2015). Oljesyre (18:1), linolsyre (18:2) og linolensyre (18:3) er de vanligste umettede fettsyrene man finner i planter (Aarnes 2011). Ser vi på for

eksempel linolsyre ser vi at det er skrevet 18:2 i parentes, dette betyr at det er 18 karbonatomer i fettsyren, og at den

har 2 dobbeltbindinger. Disse

har 2 dobbeltbindinger. Disse

har 2 dobbeltbindinger. Disse

har 2 dobbeltbindinger. Disse

har 2 dobbeltbindinger. Disse

har 2 dobbeltbindinger. Disse

har 2 dobbeltbindinger. Disse

har 2 dobbeltbindinger. Disse

har 2 dobbeltbindinger. Disse

har 2 dobbeltbindinger. Disse

har 2 dobbeltbindinger. Disse

har 2 dobbeltbindinger. Disse

har 2 dobbeltbindinger. Disse

har 2 dobbeltbindinger. Disse

har 2 dobbeltbindinger. Disse

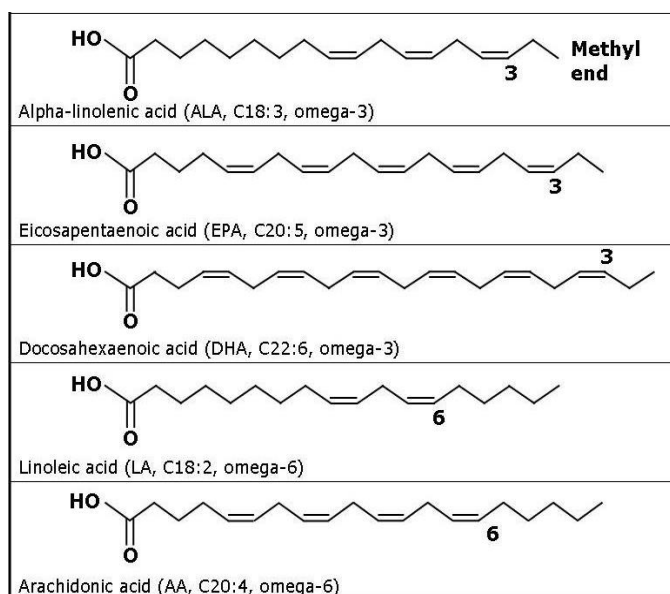
Trans-form
(rett form)

Cis- form
(bøyd form)



Figur 10: Skjematiske framstillinger av dobbeltbindingene i umettet fettsyrer. De kan enten være i Trans-form som er en rett form, eller i en Cis-form som er en bøyd form.

Laget av Hege Kvamme



Figur 11: Skjematiske framstillinger av noen av de vanligste flerumettede fettsyrene, vi ser her at linolensyre har tre dobbeltbindinger, 18 karbonatomer, og første dobbeltbinding er plassert 3 karbonatomer fra metylenden, derfor er dette kalt en omega-3 fettsyre (18:3). EPA (20:5) og DHA (22:6) er også omega-3 fettsyrer, mens linolsyre og arakidonsyre er omega-6 fettsyrer.

(Hentet fra: <http://www.eufic.org/en/food-today/article/the-importance-of-omega-3-and-omega-6-fatty-acids>)

linolensyre, eikosapentaensyre og dokosaheksaensyre, og omega-6 fettsyrene linolsyre og arakidonsyre.

1.3.1. Viktige helseeffekter av fettsyrer

Tilskudd av omega-3 fettsyrer har vist seg å være nyttig for mennesker ved at det forebygger (og i noen tilfeller kurerer) forskjellige sykdommer. Det er blant annet vist at tilførsel av EPA og DHA er viktig for gravide i siste del av svangerskapet, og for barn som er for tidlig født, dette er på grunn av at disse fettsyrene skal ha en positiv effekt på utviklingen av sentralnervesystemet. EPA og DHA har også positiv effekt på hjerte- og karsykdommer, det er vist at personer med hjerte- og karsykdommer som får tilskudd av disse fettsyrene har større sjans for overlevelse, samt redusert risiko for å få tilbake denne sykdommen (Frøyland *et al.* 2011).

Studier har også vist at omega-3 fettsyrer kan ha en positiv effekt i behandling av depresjon, men mer forskning er fremdeles nødvendig for å slå fast noe sikkert (Maisch & Oelze 2007). I følge Hedelin *et al.* (2007) ser det ut til at hyppig inntak av fet fisk og marine fettsyrer er med på å redusere risikoen for prostatakraft. Omega-3 fettsyrer er også viktig i forhold til andre typer kreft, hvor det ser ut som at EPA og DHA kan fremme programmert celledød hos kreftceller og hindre cellevekst. Dette er spesielt studert i forbindelse med brystkreft, prostatakraft og tykktarmkreft (Calviello & Serini 2010; Fossen 2014).

1.3.2. Eikosapentaensyre (EPA) og Dokosaheksaensyre (DHA)

Fisk og annen sjømat inneholder de langkjedete flerumettede omega-3 fettsyrene; dokosaheksaensyre (22:6) og eikosapentaensyre (20:5), og dette er en av grunnene til at sjømat har en positiv effekt på helsen vår (Ruxton *et al.* 2004).

De viktige omega-3 fettsyrene vi høster fra fisken blir produsert av algene. Deretter går det oppover i næringskjeden via dyreplankton (raudåte og krill) og tilslutt til fisk, hvor vi utvinner omega-3 fettsyrene fra fiskelever (Haugan 2013). Planter inneholder et enzym, desaturase, som kan sette inn dobbeltbindinger på 3., 6. og 9. karbonatom fra metylenden, mens mennesker og dyr sitt desaturase enzym bare kan sette inn dobbeltbindinger på spesielle steder etter det 6. karbonatomet på fettsyren (Lunn & Theobald 2006). Siden kroppen bare i liten grad klarer å syntetisere DHA og EPA selv, er menneskene avhengig av å få tilført disse

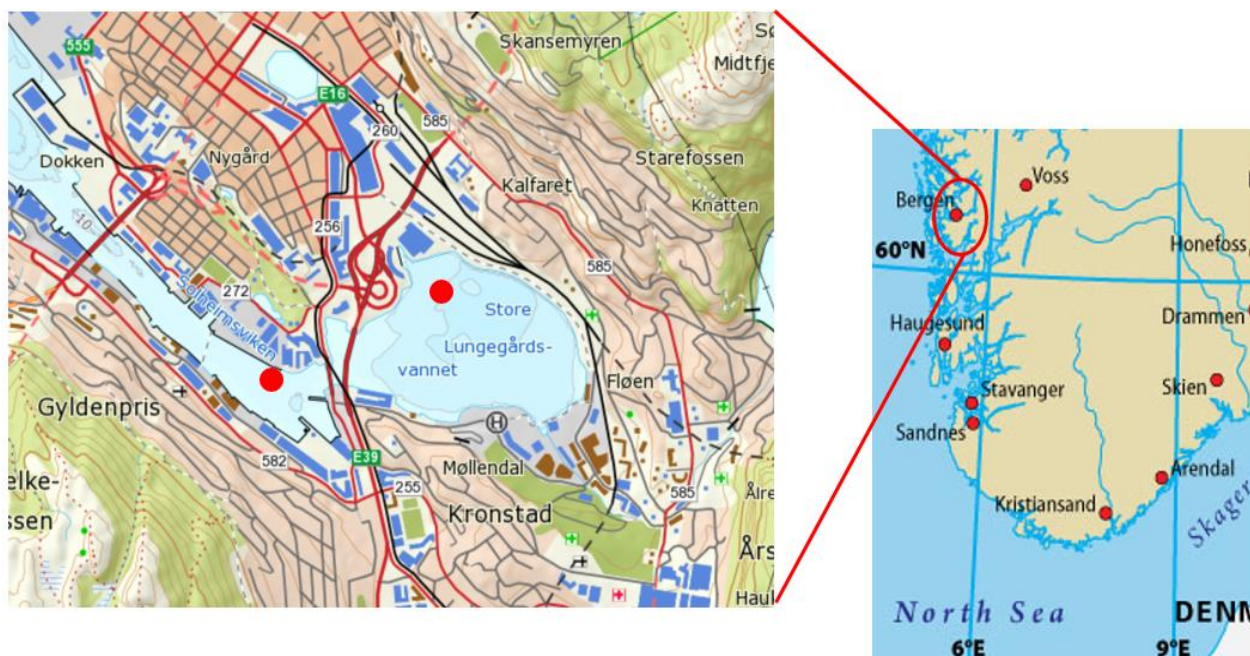
viktige flerumettede fettsyrene gjennom kosten (Frøyland et al. 2011). Det er derfor viktig å finne alger som inneholder mye av de essensielle fettsyrene, og som i tillegg er lett å dyrke og har en høy veksthastighet. I denne oppgaven har jeg 15 stammer som skal dyrkes for å finne de mest lovende kandidatene med hensyn til EPA og DHA innhold, og det skal bestemmes om det blir produsert mest av de essensielle fettsyrene når algene er dyrket ved 10°C eller ved 15°C.

2. Material og metoder

2.1. Bakgrunn:

Alger fra nordlige vannmasser, og tre arter fra Spania, var på forhånd blitt innsamlet, isolert og rendyrket. De fleste stammene ble innsamlet i november 2014, noen fra området rundt Svalbard, noen lokale stammer fra Store Lungegårdsvann og Bergens fjorder, og noen fra spanske vannmasser.

Store Lungegårdsvann (N60°22.586, Ø5°20.166) (Figur 12) er plassert nær sentrum av Bergen, Norge.



Figur 12: Til høyre vises et utsnitt av Norgeskartet som viser hvor Bergen er plassert med koordinater (Kart hentet fra: http://www.mapsofworld.com/lat_long/norway-lat-long.html).

Til venstre vises forstørret kart over Bergen som viser Store Lungegårdsvann hvor M117, M122, M138 og M139 er innsamlet fra, samt Bergens fjorder hvor *Craspedostauros australis*, B59 (*Craspedostauros britannicus*) og B58 (*Phaeodactylum tricornutum*) er isolert. Prøvetakingsstasjonene er merket med røde sirkler. (Kart hentet fra: Norgeskartet.no)

Stammene som er brukt fra Store Lungegårdsvann er M117, M122, M138, og M139 (nærmeste treff ved bruk av Blast er diatomeen *Entomoneis* sp. (90 % likhet)). I tillegg er diatomeene *Craspedostauros australis*, B59 (*Craspedostauros britannicus*) og B58 (*Phaeodactylum tricornutum*) også innsamlet fra Bergens fjorder.

Stammene fra Svalbard som er brukt i denne oppgaven er M24 (N 80.5°, Ø 15°), M78, M88, M97 og M107 (N 78° 59.66', Ø 10° 00.17') (Figur 13). Identifisering var på forhånd gjennomført, og nærmeste treff ved bruk av Blast på disse fem stammene er diatomeen *Thalassiosira hispida*.

Stammene fra sør Spania er innsamlet og isolert av Fitoplankton Marino som er lokalisert i Cádiz, og jeg antar derfor at disse stammene er innsamlet fra området rundt sørkysten av Spania. De er blitt hentet fra "Culture Colection Fitoplancton Marino" (CCFM) og består av *Isochrysis galbana* (Prymnesiophyceae) (CCFM 02), *Nannochloropsis gaditana* (Eustigmatophyceae) (CCFM 01), og *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) (CCFM 06).

Alle stammene ble dyrket i Walne's medium (Walne 1970) (Appendiks 1, Tabell A1), med en konstant lysstyrke på 150-160 $\mu\text{mol fotoner m}^{-2} \text{s}^{-1}$ og ved både 10°C og 15°C (Tabell 1).



Figur 13: Kart over Svalbard hvor de to røde merkene viser hvor algene er blitt innsamlet. Det øverste røde merket viser hvor M24 er fra, og det nederste røde merket viser hvor M78, M88, M97 og M107 er innsamlet fra.

Kart hentet fra Räsänen (2017).

Tabell 1: Oversikt over Stamme ID, hvilken art de er identifisert som, klasse, hvor de er isolert fra (sted og koordinater), medium dyrket i, lysstyrken som er brukt og hvilke temperaturer de er dyrket ved. * døde ved 15°C. Lysstyrken er oppgitt i $\mu\text{mol P m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($\mu\text{mol fotoner per kvadratmeter per sekund}$).

Nr.	Stamme ID	Identifikasjon	Klasse	Fra:	Koordinater	Medium	Lysstyrke ($\mu\text{mol P m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Temp
1	M24	<i>Thalassiosira hispida</i>	Mediophyceae	Svalbard	N 80.5°, 15° E	Walne's	150-160	10°C*
2	M78	<i>Thalassiosira hispida</i>	Mediophyceae	Svalbard	N 78° 59.66', E 10° 00.17'	Walne's	150-160	10°C, 15°C
3	M88	<i>Thalassiosira hispida</i>	Mediophyceae	Svalbard	N 78° 59.66', E 10° 00.17'	Walne's	150-160	10°C, 15°C
4	M97	<i>Thalassiosira hispida</i>	Mediophyceae	Svalbard	N 78° 59.66', E 10° 00.17'	Walne's	150-160	10°C, 15°C
5	M107	<i>Thalassiosira hispida</i>	Mediophyceae	Svalbard	N 78° 59.66', E 10° 00.17'	Walne's	150-160	10°C*
6	M117	<i>Entomoneis sp.</i> (90%)	Bacillariophyceae	Store Lungegårdsvann	N 60° 22.586', E 5° 20.166'	Walne's	150-160	10°C, 15°C
7	M122	<i>Entomoneis sp.</i> (90%)	Bacillariophyceae	Store Lungegårdsvann	N 60° 22.586', E 5° 20.166'	Walne's	150-160	10°C, 15°C
8	M138	<i>Entomoneis sp.</i> (90%)	Bacillariophyceae	Store Lungegårdsvann	N 60° 22.586', E 5° 20.166'	Walne's	150-160	10°C, 15°C
9	M139	<i>Entomoneis sp.</i> (90%)	Bacillariophyceae	Store Lungegårdsvann	N 60° 22.586', E 5° 20.166'	Walne's	150-160	10°C, 15°C
10	<i>Isochrysis</i>	<i>Isochrysis galban</i>	Prymnesiophyceae	Spania	-	Walne's	150-160	10°C, 15°C
11	<i>Nannochloropsis</i>	<i>Nannochloropsis gaditana</i>	Eustigmatophyceae	Spania	-	Walne's	150-160	10°C, 15°C
12	<i>P.tricornutum</i>	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Bacillariophyceae	Spania	-	Walne's	150-160	10°C, 15°C
13	B58	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Bacillariophyceae	Bergen	-	Walne's	150-160	10°C, 15°C
14	B59	<i>Craspedostauros britannicus</i>	Bacillariophyceae	Bergen	-	Walne's	150-160	10°C, 15°C
15	<i>C.australis</i>	<i>Craspedostauros australis</i>	Bacillariophyceae	Bergen	-	Walne's	150-160	10°C, 15°C

Mikroalgeprøvene var blitt innsamlet ved bruk av vertikale håvtrekk (porestørrelse 10 μm), gjentatt mange ganger for å oppnå høyt nok celletall (Figur 14). Prøver ble også hentet fra maksimum klorofyll dyp, enten med vannpumper eller med Niskin vannhentere. Prøvene ble oppbevart i 50 mL Falkonrør i 4°C inntil videre isolering.



Figur 14: Illustrasjonsbilde av vertikal håv trekk.
Foto: Hege Kvamme

Senere ble prøvene tilført til Walne's medium og oppbevart i inkubasjonsskap med lysstyrke på 50-80 $\mu\text{mol fotoner m}^{-2} \text{s}^{-1}$ til man kunne se tydelig vekst. De spanske stammene ble

oppbevart i inkubasjonsskap som holdt 15°C, mens de arktiske stammene ble oppbevart i skap som holdt ca. 8°C.

For å oppnå rene kulturer måtte videre isolering skje. Dette ble gjort ved hjelp av FACS Aria flow cytometer på BB-bygningen, UiB (Steinrücken 2014). Stammene ble oppbevart på BIO, UiB, i Bergen Marine BioBank. 12 stammer ble valgt ut fra denne samlingen til videre arbeid, samt 3 stammer fra Fitoplankton Spania (*Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis gaditana* og *Phaeodactylum tricornutum*).

Av de ferdige innsamlete, isolerte og rendyrkede stammene ble de 15 utvalgte stammene dyrket i sterile Erlenmeyer kolber med Walne's næringsmedium (Walne 1970). Screeningen ble gjennomført på 2 forskjellige temperaturer, 10°C og 15°C, så algene måtte derfor bli dyrket i to forskjellige klimaskap, det ene klimaskapet holdt 15°C og det andre holdt ca. 8°C (optimalt burde det vært på 10°C, men grunnet samarbeid med andre som trengte lavere temperaturer ble klimaskap på 8°C brukt).

2.2. Forarbeid

Før screeningen kunne starte måtte algene dyrkes opp, dette ble gjort ved inokulering fra små reagensrør til større Erlen Meyer kolber (50 mL) som var tilsatt ferdig laget 80 % sjøvann med Walne's medium. Dette ble inkubert i klimaskap i 2-4 uker, til tettheten var blitt høy og man tydelig kunne se fargeforandringer på kulturene. De ble da videre overført til større



Figur 15: Algekulturene i klimaskapet. Her er de overført til større Erlen Meyer kolber, noen på 250 mL og noen på 500 mL.

Foto: Hege Kvamme

glasskolber (500 mL) som var tilsatt nytt Walne's medium, og ble plassert tilbake i klimaskap for videre vekst (Figur 15). Når tettheten i de store Erlen Meyer kolbene var blitt høy kunne man begynne med klargjøringen til screening. Alle flasker med medium og kolber var på forhånd blitt autoklavert, og ble under arbeidet avbrent på gassbrenner for å unngå kontaminering, i tillegg ble benkeplater vasket med etanol før bruk.

2.2.1. Klargjøring av Walne's medium:

Får å lage medium til algedyrking måtte man først lage klart 80 % sjøvann. Til dette brukes 800 mL eldet sjøvann blandet med 20 % destillert vann. Dette ble filtrert på to filter som ble lagt oppå hverandre, det første filteret (nederst) var et Whatman Polycarbonate filter med porestørrelse på 0.2 μm og 47 mm i diameter, det andre filteret var et Whatman Glass Mikrofiber filter G/FF (nominell porestørrelse 0.7 μm) med diameter på 47 mm.

Etter filtrering ble vannet helt tilbake i flasken og autoklavert i en Getinge autoklave (Figur 16). Deretter måtte det kjøles ned før man kunne tilsette 1 mL/L av stamløsning A, 1 mL/L av stamløsning B, 1 mL/L med silikat stamløsning, og 0,1 mL/L med vitamin stamløsning fra Walne's medium (Walne 1970). Innholdet i de forskjellige stamløsningene er beskrevet i Appendiks 1, Tabell A1.



Figur 16: Getinge autoklave som ble brukt til autoklaving av vann og utstyr som skulle brukes i forsøket.

Foto: Hege Kvamme

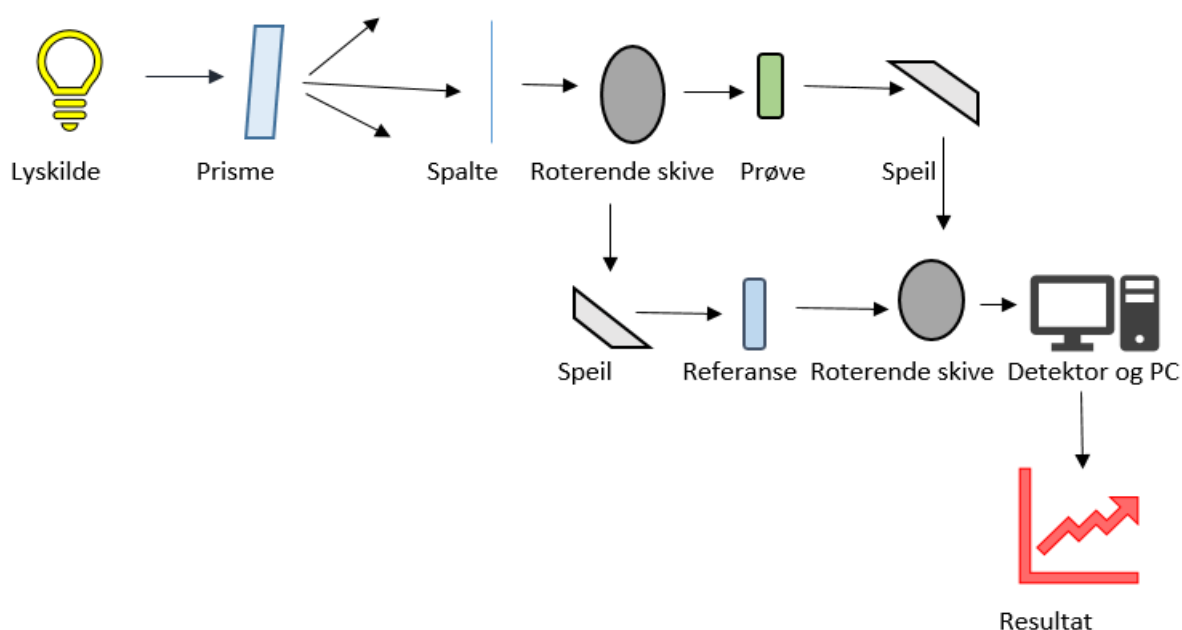
2.2.2. Klargjøring av screenatorium

Før screeningen kunne begynne måtte det termostaterte rommet med regulerbare lyskilder gjøres klart. Akvariene ble tømt for gammelt vann, vasket, og fylt med destillert vann. Pumper og termostater ble vasket og plassert i akvariene. Termostatene ble stilt inn på rett temperatur en dag før screeningen skulle begynne for å sikre riktig temperatur fra starten av forsøket. Rommet ble også innstilt på rett temperatur, og lyset ble regulert til 150-160 μmol fotoner $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Lyset ble målt med en Biospherical lysmåler med 4π sensor som ble plassert ned i et 300 mL dyrkingsrør med vann, som igjen var plassert i akvariet med vann. På denne måten ble målingen mest mulig korrekt i forhold til lyset algene kom til å motta. Lysstyrken ble holdt konstant gjennom døgnet i hele forsøket, uten døgnlige lys/mørke sykluser. Gummislanger med bakteriefilter (0,2 μm) og klyper ble autoklavert slik at de var klar til bruk

2.3. Optisk tetthet (OD) og Quantum yield (QY)

Optisk tetthet er et mål på hvor mye lys som blir absorbert, og hvor mye lys som slippes igjennom prøven. Jo mer lys som blir absorbert, jo større er tettheten. Optisk tetthet ble

målt med spektrofotometer (UV2401) som fungerer ved at en lyskilde sender lys igjennom et prisme som deler lyset, deretter er det en spalte som samler ønsket lys. En roterende skive med reflekterende plater og forskjellige hull sender lyset i to forskjellige retninger. Et speil sørger for å sende den ene lysstrålen igjennom en referanse prøve (i vårt tilfelle er dette 80 % sjøvann), mens den andre lysstrålen blir sendt igjennom prøven. Lyset blir samlet igjen og det blir en sammenligning mellom absorpsjonen av lyset i prøven og i referansecellen, og tettheten kan dermed bli beregnet (Klingenberg 2012). Figur 17 viser en forenklet skjematisk fremstilling av et spektrofotometer.



Figur 17: Forenklet skjematisk fremstilling av hvordan et spektrofotometer virker, laget av Hege Kvamme.

Optisk tetthet ble målt hver dag på bølgelengde 750nm, dette ble notert ned og plottet inn i grafer slik at det var lettere å følge med på når kulturene var i eksponentiell fase og i stasjonær fase. Siden OD750 verdier på over 0,7 gir et unøyaktig resultat ble prøvene fortynnet om de viste verdier over denne terskelen. Veksthastigheten i eksponentiell fase ble regnet ut etter likning [1] hvor N_{t_x} er OD verdien ved tid X (t_x) og $N_{t_{x-1}}$ er OD verdien ved tid X-1 (t_{x-1}). Tiden for eksponentiell fase ble funnet individuelt for hver stamme ut fra grafen man fikk fra OD 750.

$$[1] \quad \mu = \frac{\ln(N_{tx}) - \ln(N_{tx-1})}{t_x - t_{x-1}}$$

Optimum quantum yield (QY) ble bestemt med en AquaPen-C AP-C 100 (Figur 18). Før måling med AquaPen kunne gjennomføres ble 4 mL av kulturen overført til en 5 mL kyvette. Kyvettene ble plassert i en svart plastsekk i et mørkt rom i 15-30 minutter. I de mørke-tilpassete prøvene blir reaksjonssentret i fotosystem II (PS II) åpnet og første fluorescens, F_0 , kan bli målt ved å bruke svake, røde målings lyspulser. Ved å tilføre blinkende lys med kort varighet og høy intensitet, vil PS II reaksjonssenteret lukke seg og maksimal fluorescens, F_m , oppnås. Forskjellen mellom F_0 og F_m gir den variable fluorescens F_v . Optimal kvantutbytte på PS II vil bli beregnet som forholdet mellom variabel og maksimal fluorescens (F_v / F_m). QY blir brukt som et mål på fysiologisk tilstand hos mikroalgene, en høy QY verdi (0,8) er et tegn på at de har det bra, mens en lavere verdi kan bety at de er stresset (Maxwell & Johnson 2000).



Figur 18: AquaPen- C AP-C 100 brukt til måling av QY.

Foto: Hege Kvamme

2.4. Tørrvekt

Prøver til tørrvekt ble tatt ut i eksponentiell fase og i stasjonær fase, og ble bestemt ved hjelp av metodene til Zhu & Lee (1997). Før prøvetaking ble filter av typen Whatman GF/F (diameter 25 mm, pore størrelse 0.7 μm) vasket i destillert vann, og lagt i en liten petriskål av glass. Dette ble plassert i en Termaks ovn for å tørke (95°C i 24 timer) og deretter plassert i dessikator i minimum to timer. Deretter ble de veid på en Mettler Toledo MT5 Mikrovækt (Figur 19), merket og lagt klar til bruk. Når kulturen var klar til å høstes ble filteret lagt inn i et filtersystem som filtrerte ved lavt vakuum (maks 400 mbar). Filteret ble først skylt med litt 0,5 M ammonium format, deretter ble ønsket mengde algekultur overført til et 50 mL Falcon rør som allerede var tilsatt 25 mL ammonium format. Mengde algekultur var avhengig av tettheten til kulturen, og varierte fra 3 mL til 15 mL. Dette ble så filtrert, og filteret ble til slutt skylt med 2 x 25 mL



Figur 19: Mettler Toledo mikrovækten som ble brukt til å veie filterene før og etter bruk.

Foto: Hege Kvamme

0.5 M ammonium format for å fjerne saltet fra filteret. Filteret ble lagt tilbake i petriskålen av glass og plassert i ovnen i ca. 24 timer. Deretter ble det plassert i dessikatoren igjen i minimum 2 timer før det ble veid på nytt ved hjelp av Mettler Toledo MT5 Mikrovækt. Tørrvekten til algene (mg) ble utregnet ved å trekke vekten på filteret før filtrering fra vekten på filteret etter filtrering, og biomassen per volumenhet ble beregnet ved å dividere på volumet som ble filtrert.

2.5. Screening

300 mL dyrkningsrør med gummikork med to glassrør igjennom var gjort klar på forhånd, det ene glassrøret var kort og sørget for utslipp av luft, mens det andre glassrøret gikk til bunnen og var det røret som gassen ble koblet til. I enden av det lengste røret ble det festet en 1 mL plast pipettespiss som var klippet til, dette ble gjort for å sørge for små, kontrollerte bobler. I toppen av begge rørene ble det dyttet ned litt bomull som fungerer som et filter for å unngå partikler å komme ned i kulturen. De klargjorte dyrkningsrørene ble autoklavert før bruk.

For å klargjøre kulturene til screening ble 3 x 50 mL Falcon rør fylt med 35 mL kultur og sentrifugert på 3000 omdreininger i 5 minutter på 10°C og 15°C (avhengig av hvilken temperatur de skulle screenes på). Deretter ble alt gammelt medium helt av, og pelleten ble løst opp i nytt mediet og overført til en steril 1 L flaske. Flasken ble deretter fylt til ca. 650 mL med nytt mediet til tettheten så passe tynn ut (OD750 mellom 0,01 og 0,06). Kulturen på 1 L flasken ble overført til to forskjellige klargjorte 300 mL dyrkningsrør som ble plassert i vannbad som holdt 10°C og 15°C. De klargjorte gummislangene med bakteriefilter ble festet til gasslangene i det termostaterte rommet, samt til det lengste glassrøret i dyrkningsrøret, og gassen ble slått på (Figur 20). Det ble brukt fuktet luft blandet med CO₂ (sluttkonsentrasjon på 1 % CO₂) for å holde stabil pH og for å unngå sedimentering som fører til ujevn lystilførsel. I starten var trykket på gassen svak for å unngå for mye røring for algene, trykket ble økt litt og litt etterhvert som kulturene ble tettere. OD750 og QY ble målt



Figur 20: Dyrkningsrørene plassert i akvariet som er fylt med ferdig temperert vann. På toppen ser vi slangene som er koblet til rørene for å tilføre luft med CO₂.
Foto: Hege Kvamme

hver dag. Når stammene nådde eksponentiell fase og stasjonær fase, ble det tatt ut prøver av kulturene for å måle tørrvekt, og for å høste prøver til fettsyreanalyser og til pigmentprøver.

2.6. Pigmenter

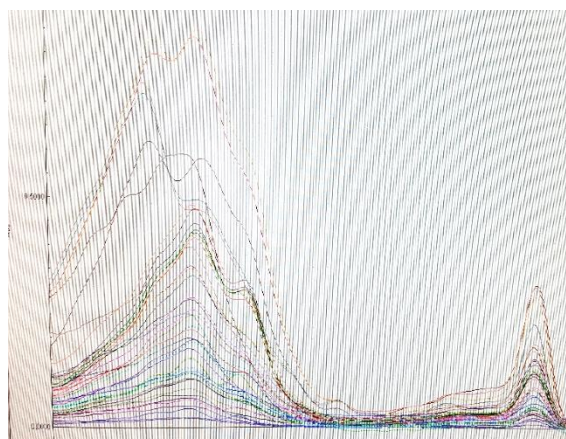
I eksponentiell og stasjonær fase ble det hentet ut prøver til pigmenter. Dette ble gjort ved å overføre 5 mL av kulturen til et 15 mL Falcon rør som ble sentrifugert på 5000 omdreininger i 5 min. Supernatanten ble sugd vekk ved hjelp av en glasspipette som var koblet til en pumpe, og Falcon røret med pelleten ble pakket inn i aluminiumsfolie (for å holde det mørkt) og lagt i frysen til videre behandling.

For å ekstrahere klorofyll *a* og karotenoider ble prøvene tatt opp fra frysen og satt på is, deretter ble det tilsatt 3 til 5 mL metanol (volum varierte i forhold til biomassen i prøven) som fikk virke 1 time. Etter en time ble pelleten sjekket for å se om den var blitt hvit, hvis ikke måtte den stå litt lenger. Når metanolen hadde fått virke lenge nok ble prøvene sentrifugert i 5 minutter på 4000 omdreininger med en Beckman Coulter (Allegra 2IR Centrifuge) (Figur 21), og overført til kyvetter for analysering ved hjelp av et



Figur 21: Beckman Coulter (Allegra 2IR Centrifuge) som ble brukt blant annet til å sentrifugere fettsyreprøvene og pigmentene.
Foto: Hege Kvamme

spektrofotometer. Spektrofotometeret som ble brukt var UV-2401, og programmene UV-2401-PC ble brukt på spekter fra 350 nm til 700 nm. I tillegg ble programmet UVprobe brukt for å se over dataene (Figur 22) og for å få lagret filene i tekst format. Utregning av klorofyll *a* og karotenoider ble gjort etter formlene [2] og [3] hvor abs ved 470 og 666 nm viser hvor mye lys som blir absorbert ved henholdsvis 470 og 666 nm. De andre tallene i formlene er konstanter.



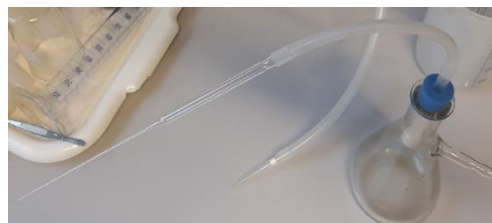
Figur 22: Grafene av klorofyllmengden til de forskjellige stammene slik det ble vist i UVprobe programmet.
Foto: Hege Kvamme

$$[2] \text{ klorofyll } a = 15,65 * \text{abs ved } 666 \text{ nm}$$

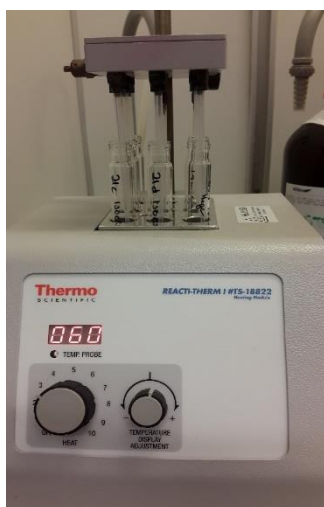
$$[3] \quad \text{Karotenoider} = \frac{1000 * \text{Abs ved } 470 \text{ nm} - 44,76 * \text{Abs ved } 666 \text{ nm}}{221}$$

2.7. Fettsyreanalyser

Prøver til fettsyreanalyser ble høstet i eksponentiell fase og i stasjonær fase, dette ble gjort ved at 10 mL av kulturen ble overført til et 10 mL Pyrex kulturrør med skrukork ved hjelp av en 5 mL pipette. De ble sentrifugert med en Beckman Coulter (Allegra 21R Centrifuge) (Figur 21) ved 3000 omdreininger i 15 minutter og deretter ble supernatanten sugd vekk ved hjelp av en glasspipette som var koblet til en pumpe (Figur 23). Pelleten ble gasset med nitrogen gass for å fortrenge oksygen i røret, og korken ble skrudd hardt på før rørene ble plassert i frysen til videre arbeid.



Figur 23: Glasspipette koblet til en kolbe, som igjen blir koblet til en pumpe. Denne ble brukt til å suge vekk supernatanten fra fettsyreprøvene og pigmentprøvene før pelleten ble lagt i frysen. Foto: Hege Kvamme



Figur 24: Pelleten til tørk under N₂ gass i en Thermo scientific fordampner på 60 grader. Foto: Hege Kvamme

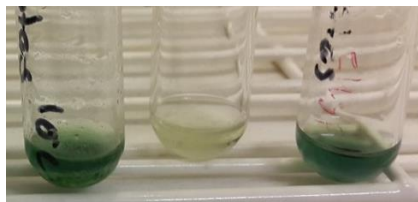
Ekstrahering av fettsyrer ble gjennomført ifølge Meier et al. (2006). Pelleten ble tørket ved 60°C under N₂ gass i en fordampner fra Thermo scientific (Reacti-Therm I #TS-18822) (Figur 24), deretter ble det tilsatt indre standard, hvor mengde var regnet ut på forhånd. Den indre standarden var methyltricosanoate (23:0) i isoctane (konsentrasjonene varierte mellom 0,1941 mg/mL, 0,1861 mg/mL, eller 4,032 mg/mL, og ble regnet ut på bakgrunn av tørrvekten til de forskjellige stammene). Etter at indre standard var tilsatt ble de tørket på nytt under nitrogen gass ved 60°C, og deretter



Figur 25: Miksing av fettsyreprøver på vortex mikser. Foto: Hege Kvamme

tilsatt 0,5 mL methanolysereagens (2,5 M HCl i vannfri metanol (Nofima, Bergen, Norge)) før det ble gasset med nitrogen for å fjerne oksygen i røret. Korken ble skrudd hardt på, og prøven ble inkubert i 2 timer ved 90°C. Etter 2 timer ble prøvene tatt ut av ovnen og nedkjølt før halvparten av methanolysereagensen ble fjernet ved fordampning

ved 60°C under nitrogen-gass. Deretter ble det tilsatt 0,5 mL MilliQ vann og 1 mL isoctan av typen HPLC grad (Sigma-Aldrich). Dette ble mikset på vortex mikser (Figur 25) i 30 sekunder



Figur 26: Fettsyre prøver etter sentrifugering, klar til ekstrahering.
Foto: Hege Kvamme

og sentrifugert i 5 minutter ved 3000 omdreininger. Et tynt fettlag la seg på toppen av prøven og det er dette som er de ekstraherte

fettsyrene (Figur 26).

Fettsyrene som er blitt

ekstrahert ble overført til

2 mL medisinglass med plastlokk som klipses på (snap cap vial), deretter måtte fettsyrene fortynnes til de oppnådde passende konsentrasjon, dette gjøres ved å blande ønsket mengde av ekstraktet til et nytt 2 mL medisinglass med skrukork som inneholder 1 mL isoctan (Figur 27).



Figur 27: Fettsyreprøvene klar til analysering. De bakerste med hvit kork er ufortynnet ekstraherte fettsyrer, mens de fremste med blå skrukork er fortynnete prøver og er de som blir analysert.
Foto: Hege Kvamme

Ved tilsetning av methanolyserereagenset skjer det en reaksjon hvor fettsyrene som er bundet i større lipider, samt frie fettsyrer, konverteres til fettsyremetylester (FAME).

FAME ble analysert av Svein Are Mjøs på Kjemisk institutt ved UIB. Det ble brukt en Agilent 7890A gasskromatograf (Agilent, Santa Clara, CA, USA) utstyrt med automatisk prøvetaker, split-splitless injektor, flammeionisasjonsdetektor (FID) og en 60 m BPX70 kapillær kolonne (SGE, Ringwood, Australia) med indre diameter på 0,25 mm og en filmtykkelse på 0,25 µm. Prøver på 1 µl ble injisert splitless ved 60°C hvor temperaturen ble holdt i 3 minutter før den ble hevet med 40°C /min til 150°C etterfulgt av 1.5°C /min til 230°C. Helium (1,75 mL/min) ble benyttet som bæregass i konstant strømningsmodus med en estimert gjennomsnittlig hastighet ved injeksjon på 30 cm/s. Injektor og detektor temperaturene var på henholdsvis 250°C og 300°C.

Identifisering av fettsyremetylestere ble oppnådd ved å analysere utvalgte prøver på et Agilent 7890/5977 GC-MS-system, ved hjelp av den samme kapillarkolonne som i GC-FID. Betingelser og metodikk var som beskrevet i (Wasta & Mjøs 2013). Data håndtering av GC-FID og GC-MS-data ble utført i henholdsvis Chrombox C og Chrombox Q.

2.8. Mikroskopi og kamera

Algene ble undersøkt i et Leica DMRBE lysmikroskop (Germany). Bilder ble tatt med en Samsung galaxy alfa telefon, mikroskop bilder ble tatt igjennom okularet i mikroskopet.

2.9. Statistikk

Statistiske analyser ble gjort delvis automatisk ved hjelp av et Chrombox program på Kjemisk institutt. Andre statistiske tester ble utført i statistikk programmet R. Det ble utført t-tester for å se etter signifikante forskjeller på fettsyreinholdet i stammene dyrket ved de to forskjellige temperaturene. T-tester ble også gjennomført for å se om det var signifikante forskjeller på innholdet av totale fettsyrer (TFA) i de to fasene (eksponentiell og stasjonær), dette ble gjort for å se om fettsyrene akkumulerte eller minket etter hvert som kulturene ble tettere. R-syntax (og eksempler på data) som ble brukt finnes i Appendiks 2.

3. Resultat

Fettsyresammensetningen og innhold varierer i de forskjellige fasene i kultivering av alger, og stammene ble derfor analysert både i den næringsrike eksponentielle fasen og i den næringsfattige stasjonære fasen. Det som er interessant å se etter i dette studiet er en stamme som har høy veksthastighet, i tillegg til et høyt innhold av de ønskede flerumettete fettsyrene dokosaheksaensyre (DHA) og eikosapentaensyre (EPA). Tilstedeværelse av begge disse egenskapene gjøre en stamme interessant for videre arbeid (Lee *et al.* 2014). På bakgrunn av dette ser vi etter stammer som har en vekstrate på minimum $0,7 \text{ d}^{-1}$, tilsvarende en dobling i antall celler per døgn, i tillegg til EPA på minimum 18 % eller DHA på minimum 12 % av de totale fettsyrer (TFA) tilstede i algen. Innholdet av fettsyrer blir ofte framstilt som prosent av total mengde fettsyrer tilstede, og verdien på 18 % (EPA) og 12 % (DHA) per TFA blir i denne oppgaven brukt på grunn av at det er mengdene som vanligvis blir funnet i søramerikanske rå-oljer (Sciotto & Mjøs 2012). Men dette alene gir ikke tilstrekkelig informasjon om produksjonspotensialet, siden alger med høyt innhold av TFA, men lite prosentvis innhold av EPA kan ha høyere innhold EPA per celle enn alger med en høy prosentvis mengde av EPA per TFA, men lav mengde TFA per alge. Derfor må man også se på hvor mye % EPA cellen inneholder per tørrvekt. Her har jeg valgt en grenseverdi på 4 % av total tørrvekt, dette er valgt siden det representerer gjennomsnittlig øvre nivå av EPA som er funnet i forskjellige arter som blir brukt som fôr innen akvakultur og marinkultur. For eksempel har *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae) blitt funnet med EPA verdier på mellom 2,1 % og 3,2 % av tørrvekt (Hu & Gao 2006), og *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) med en verdi på mellom 2,6 % og 2,8 % (Jiang & Gao 2004; Patil *et al.* 2007), mens *Isochrysis galbana* (Prymnesiophyceae) har blitt funnet med EPA verdier på helt opp til 5,6 % av tørrvekten, og DHA opp til 2,8 % av tørrvekten (Fidalgo *et al.* 1998). Siden vi er interessert i å finne stammer som egner seg like bra, eller helst bedre enn stammer man allerede bruker, setter jeg nivået såpass høyt.

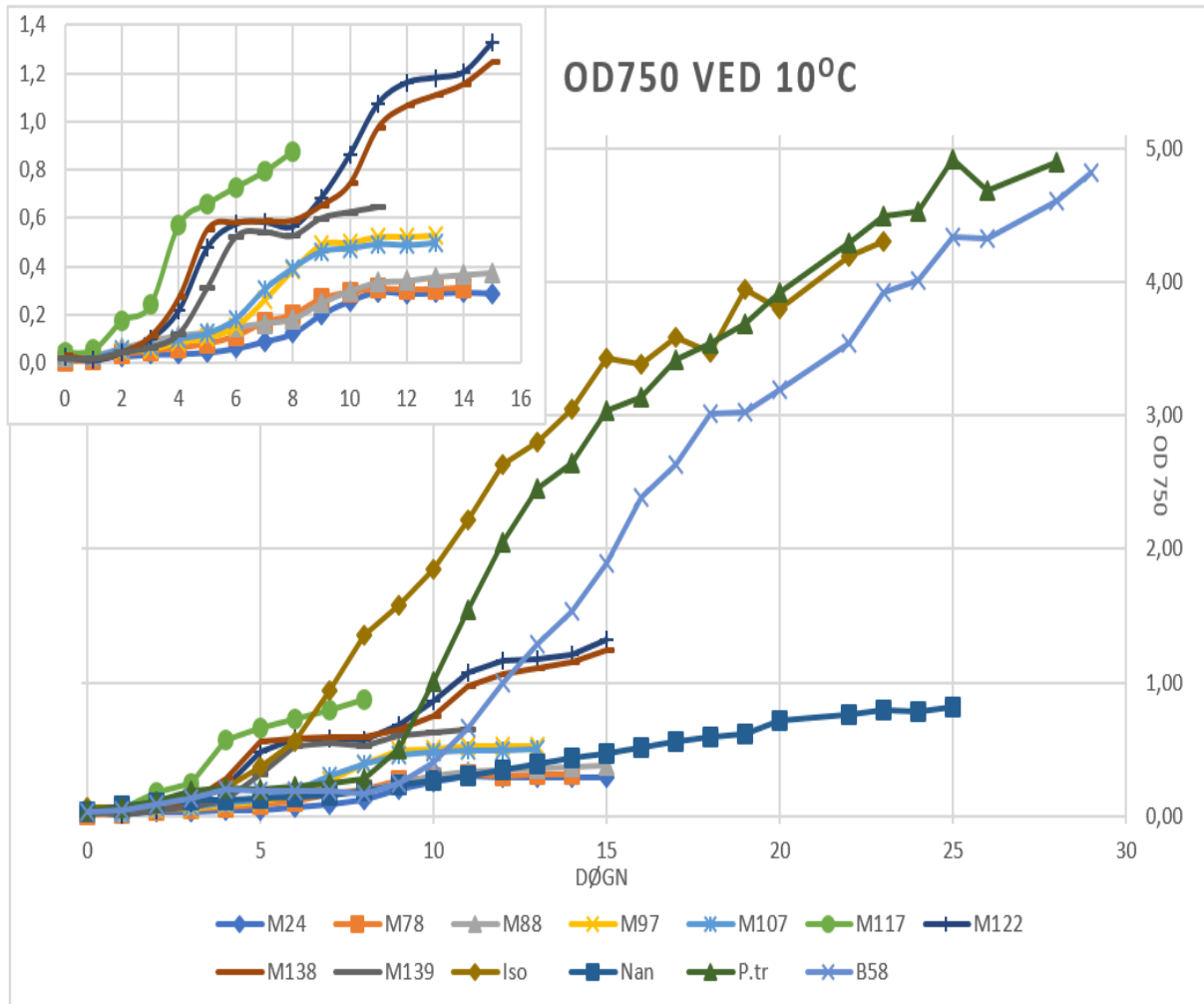
I dette studiet er det femten stammer som er blitt undersøkt, fem av disse er isolert fra Svalbard og er blitt identifisert som *Thalassiosira hispida* (M24, M78, M88, M97 og M107),

tre andre er blitt isolert fra Spania og er identifisert som *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis gaditana* og *Phaeodactylum tricornutum*. Resten av stammene er lokale stammer som er isolert fra Bergens fjordene, fire av disse er identifisert (med 90 % likhet) som *Entomoneis* sp. (M117, M122, M138 og M139), en som *Craspedostauros britannicus*, en som *C. australis*, og den siste som *P. tricornutum* (Tabell 1).

3.1. Optisk tetthet

Optisk tetthet ble målt hver dag for å følge med hvor fort de forskjellige stammene vokste, og veksthastighet ble beregnet for å se om de nådde den optimale veksthastigheten. På stammene B59 (*C. britannicus*) og *C. australis* var det ikke mulig å måle OD pga. ujevn vekst med mye klumper, her måtte vurderingen av vekst skje med øyemål, hvor man fra dag til dag tok bilder og vurderte forandringene. Dette gjaldt også for M78 (*Thalassiosira hispida*) når den ble dyrket på 15°C. Prøver i eksponentiell fase ble tatt når det så ut som kulturen hadde doblet seg fra dag til dag, og prøver i stasjonær fase ble tatt når det hadde vært flere dager på rad med lite forandring.

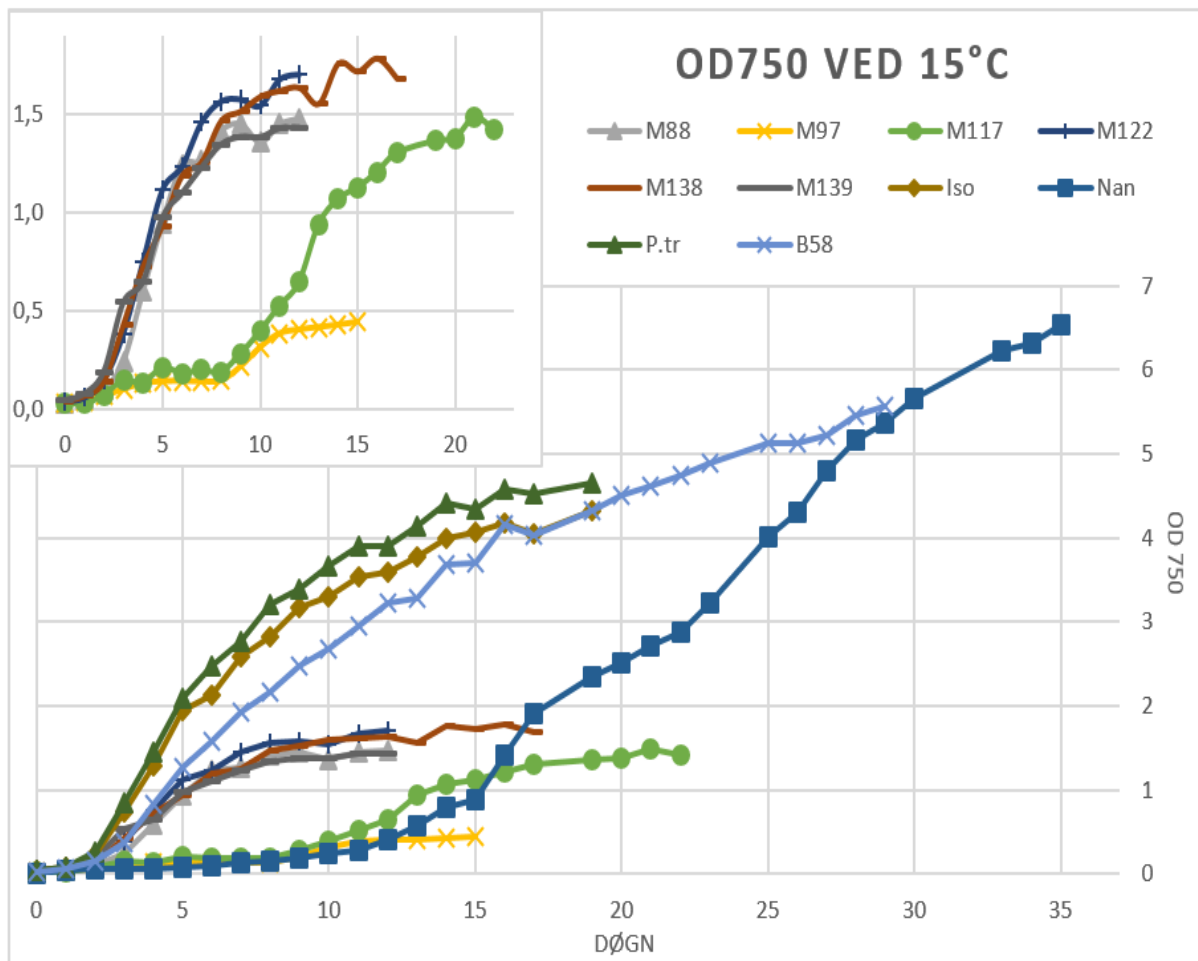
Ved 10°C vokste B58 (*P. tricornutum*, lokal stamme), *I. galbana* og *P. tricornutum* (fra Spania) til mye høyere tetthet enn alle de andre, men de brukte også mange flere døgn på å nå denne tettheten (Figur 28). De andre stammene kom raskt i stasjonær fase, selv om det var ved mye lavere tetthet. *Nannochloropsis gaditana* brukte mange døgn på å nå stasjonær fase ved 10°C, uten å nå høy tetthet. Ved 10°C var det de lokale stammene M117, M122, M138 og M139 (*Entomoneis* sp.), fra Store Lungegårdsvann som nådde kriteriet om en veksthastighet på $\geq 0,7 \text{ d}^{-1}$ i eksponentiell fase på henholdsvis $0,76 \text{ d}^{-1}$, $0,92 \text{ d}^{-1}$, $0,85 \text{ d}^{-1}$ og $0,71 \text{ d}^{-1}$.



Figur 28: OD 750 målt hver dag med spektrofotometer i vekstfasen til stammene M24, M78, M88, M97, M107, M117, M122, M138, M139, *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis gaditana*, *Phaeodactylum tricornutum* og B58 under screening forsøket utført vår og høst 2016, grafen viser gjennomsnittet for to parallelle kulturer per stamme. Stammene var her dyrket ved 10°C. Figur oppe til venstre viser stammene M24, M78, M88, M97, M107, M117, M122, M138 og M139 fra dag 0-16 (Uten *Isochrysis*, *Nannochloropsis*, *P.tricornutum* og B58), for å få et bedre inntrykk av hvordan disse stammene vokser ved eksponentiell fase. Y-aksen viser også her OD750, og X-aksen viser antall døgn.

Ved 15°C døde to av de arktiske stammene, M24 og M107 (*Thalassiosira hispida*), før screeningen fikk startet, trolig på grunn av at temperaturen ble for høy. *Phaeodactylum tricornutum* og *Isochrysis galbana* fra Spania og B58 (*Phaeodactylum tricornutum*, lokal stamme) vokste veldig godt også ved 15°C (Figur 29). *Phaeodactylum tricornutum* og *Isochrysis galbana* stabiliserte seg fint før det var gått 20 døgn, og de vokste noe raskere ved 15°C enn ved 10°C. *Nannochloropsis gaditana* vokste veldig dårlig ved 10°C og nådde aldri den tettheten man ønsket, mens ved 15°C endte den opp som den stammen som hadde høyest tetthet (OD750 på 6,5), selv om det tok veldig lang tid før den vokste eksponentielt. Ved 15°C var det den arktiske stammen M88 (*Thalassiosira hispida*), de lokale stammene M117, M122, M138, M139 (*Entomoneis* sp.), B58 (*Phaeodactylum tricornutum*) og de

spanske stammene *I. galbana* og *P. tricornutum* som nådde kriteriet på en veksthastighet på $\geq 0,7 \text{ d}^{-1}$ i eksponentiell fase. De lå på $0,73 \text{ d}^{-1}$ (M88), $0,83 \text{ d}^{-1}$ (M117), $0,74 \text{ d}^{-1}$ (M122), $0,79 \text{ d}^{-1}$ (M138), $0,83 \text{ d}^{-1}$ (M139), $0,94 \text{ d}^{-1}$ (B58), $0,94 \text{ d}^{-1}$ (*I. galbana*) og $0,85 \text{ d}^{-1}$ (*P. tricornutum*).



Figur 29: OD 750 målt hver dag med spektrofotometer i vekstfasen til stammene M88, M97, M117, M122, M138, M139, *Isochrysis galban*, *Nannochloropsis gaditana*, *Phaeodactylum tricornutum* og B58, under screening forsøket utført vår og høst 2016, grafen viser gjennomsnittet for to parallelle kulturer per stamme. Stammene var her dyrket ved 15°C. Figur oppe til venstre viser stammene M88, M97, M117, M122, M138 og M139 fra dag 0-22 (Uten *Isochrysis*, *Nannochloropsis*, *P. tricornutum* og B58), for å få et bedre inntrykk av hvordan disse stammene vokser ved eksponentiell fase. Y-aksen viser også her OD750, og X-aksen viser antall døgn.

3.2. Tørrvekt

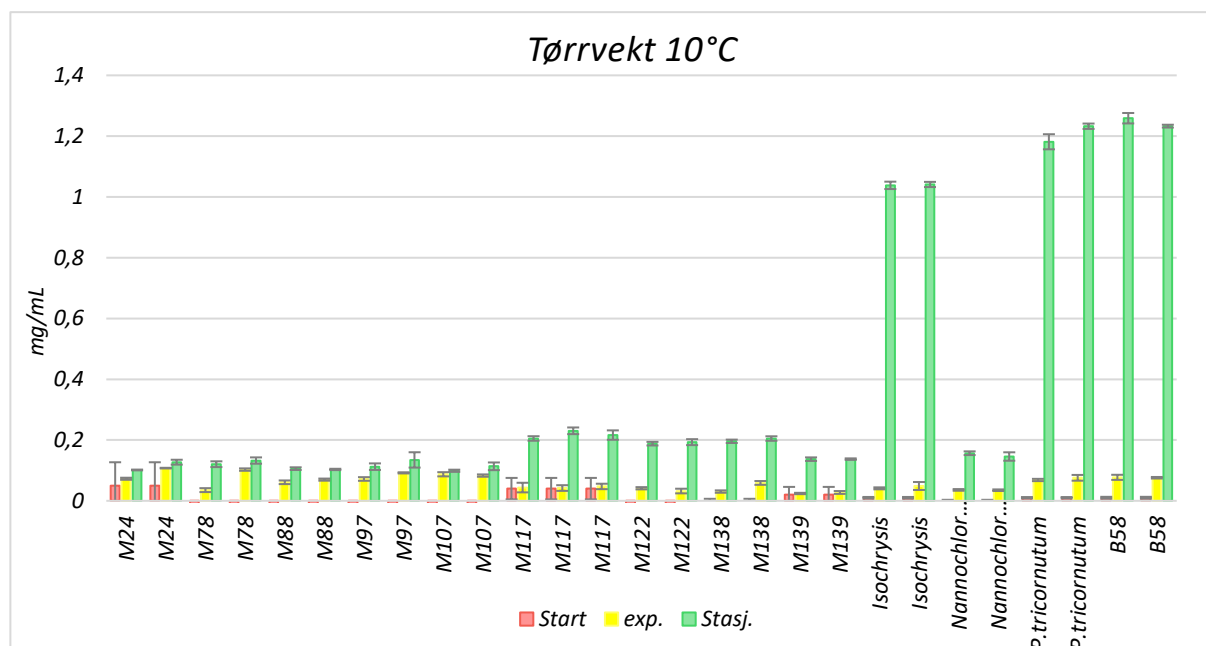
Tørrvekt ble målt ved oppstart av screeningen, i eksponentiell fase og i stasjonær fase. Det ble tatt 3 paralleller fra hvert rør til hver måling. Tørrvekten ble brukt til å regne ut hvor mye fettsyrer, karotenoider og klorofyll *a* stammene hadde per gram tørrvekt. Tidspunktet for prøvetaking til tørrvekt, fettsyrer og pigmenter varierte fra stamme til stamme på grunn av forskjeller i veksthastighet og tetthet, men stort sett ble det tatt i tidlig eksponentiell fase, og

etter 5 døgn i stasjonær fase. Tabell 2 viser en oversikt over hvilke dager de forskjellige stammene ble høstet i eksponentiell fase og stasjonær fase, ved 10°C og 15°C.

Tabell 2: Oversikt over hvilke dager de forskjellige stammene ble høstet i eksponentiell og stasjonær fase. Blått viser 10°C og rødt viser 15°C.

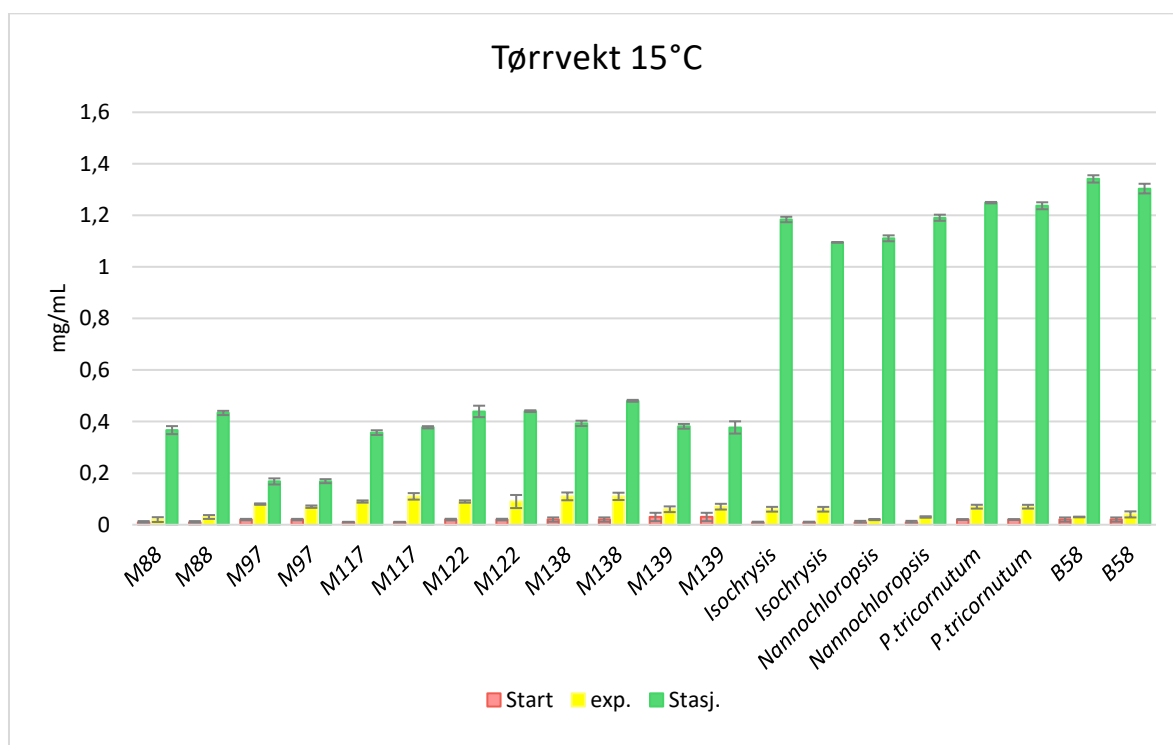
Stamme ID	Dag for høsting 10°C		Dag for høsting 15°C	
	Eksponentiell fase	Stasjonær fase	Eksponentiell fase	Stasjonær fase
M24	Dag 9	Dag 15	-	-
M78	Dag 7	Dag 14	-	-
M88	Dag 7	Dag 15	Dag 3	Dag 12
M97	Dag 7	Dag 13	Dag 9	Dag 15
M107	Dag 7	Dag 13	-	-
M117	Dag 3	Dag 9	Dag 9	Dag 22
M122	Dag 3	Dag 15	Dag 3	Dag 12
M138	Dag 3	Dag 15	Dag 3	Dag 17
M139	Dag 3	Dag 11	Dag 2	Dag 12
<i>Isochrysis</i>	Dag 4	Dag 23	Dag 2	Dag 19
<i>Nannochloropsis</i>	Dag 9	Dag 25	Dag 9	Dag 35
<i>P.tricornutum</i>	Dag 8	Dag 28	Dag 2	Dag 19
B58	Dag 9	Dag 29	Dag 2	Dag 29

Craspedostauros britannicus og *C. australis* ble det ikke tatt tørrvekt av på grunn av veldig klumpete og ujevn vekst, det samme gjaldt for M78 ved 15°C. M24 og M107 døde ved 15°C og er derfor ikke med i Tabell 2 ved denne temperaturen.



Figur 30: Tørrvekt (oppgitt i mg per mL, gjennomsnitt \pm SD, n=3) av stammene M24, M78, M88, M97, M107, M117, M122, M138, M139, *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis gaditana*, *Phaeodactylum tricornutum*, og B58 ved dyrking i 10°C. Figuren viser tørrvekt for de to parallelle rørene per stamme. Tørrvekten ble målt ved oppstart, i eksponentiell fase og i stasjonær fase.

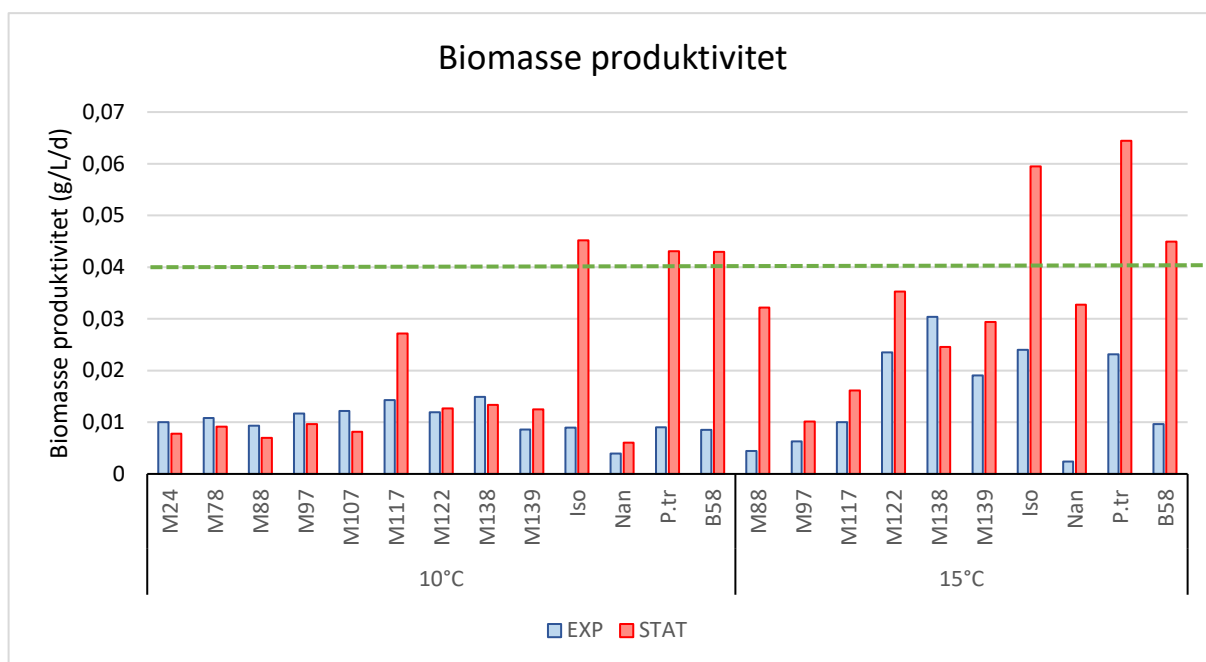
Ved 10°C hadde *I. galbana*, *P. tricornutum* og B58 veldig høy tørrvekt i stasjonær fase i forhold til de andre stammene (Figur 30), mens ved 15°C var *I. galbana*, *N. gaditana* og *P. tricornutum* (fra Spania) og B58 (*P. tricornutum*, fra Bergen) som hadde den høyeste tørrvekten (Figur 31). Generelt hadde alle stammene noe høyere tørrvekt ved 15°C enn ved 10°C.



Figur 31: Tørrvekt (oppgitt i mg per mL, gjennomsnitt \pm SD, n=3) av stammene M88, M97, M117, M122, M138, M139, *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis gaditana*, *Phaeodactylum tricornutum* og B58 ved dyrking i 15°C. Figuren viser tørrvekt for de to parallelle rørene per stamme. Tørrvekten ble målt ved oppstart, i eksponentiell fase og i stasjonær fase.

Ved hjelp av veksthastigheten og tørrvekten kan man finne biomasse produktiviteten per stamme oppgitt som gram produsert per liter per døgn (Figur 32). *I. galbana*, *P. tricornutum* og B58 var de stammene med høyest produktivitet ($\geq 0,04$ g/L/d) i stasjonær fase ved 10°C og lå henholdsvis på 0,045 g/L/d, 0,043 g/L/d og 0,043 g/L/d. Ved 15°C var det flere stammer som hadde høy produktivitet i stasjonær fase, men det var likevel bare *I. galbana*, *P. tricornutum* og B58 som hadde produktivitet over 0,04 g/L/d her også, med henholdsvis 0,059 g/L/d, 0,064 g/L/d og 0,045 g/L/d. Totalt sett var det *P.*

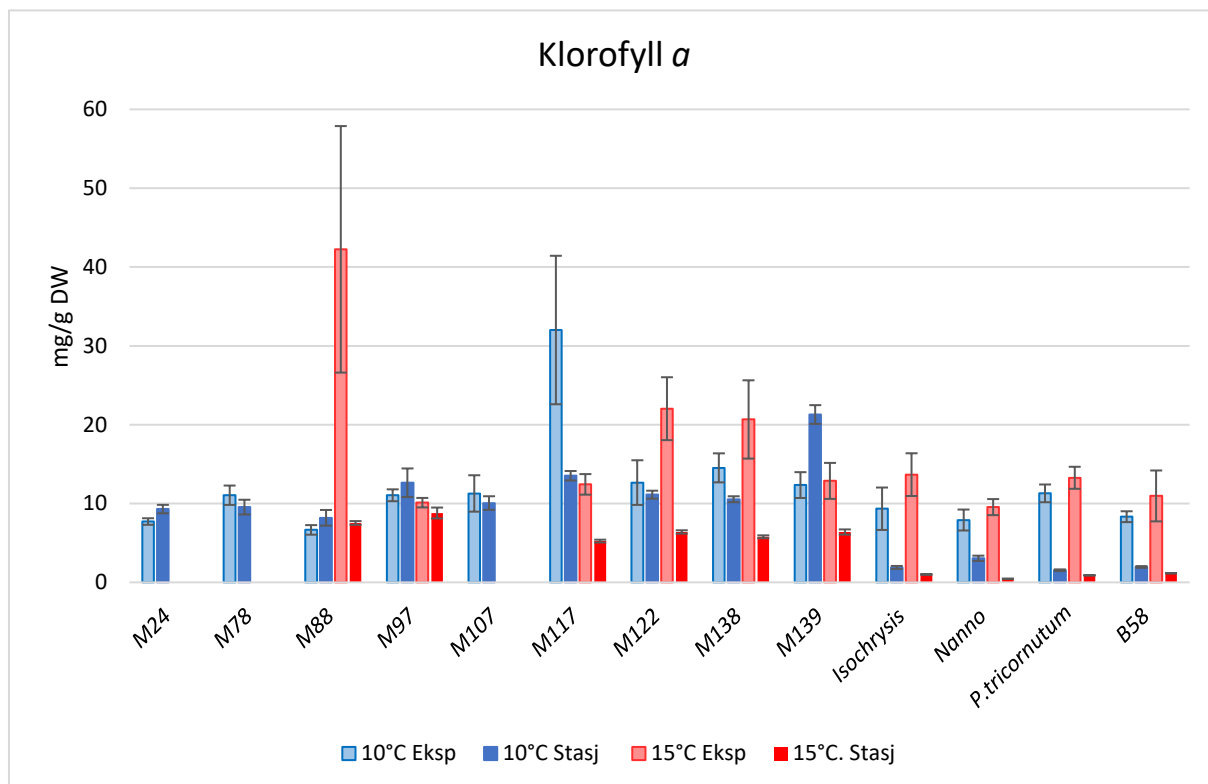
tricornutum (fra Spania) som oppnådde den høyeste biomasseproduktiviteten, og dette var oppnådd i stasjonær fase ved 15°C.



Figur 32: Biomasse produktiviteten (oppgitt i gram per liter per døgn) hos stammene dyrket ved 10°C og 15°C, blå søyler viser produktiviteten i eksponentiell fase, mens røde søyler viser produktiviteten i stasjonær fase. Den grønne stiplede streken viser grenseverdien på 0,04 gram per liter per døgn (selvvalgt grenseverdi).

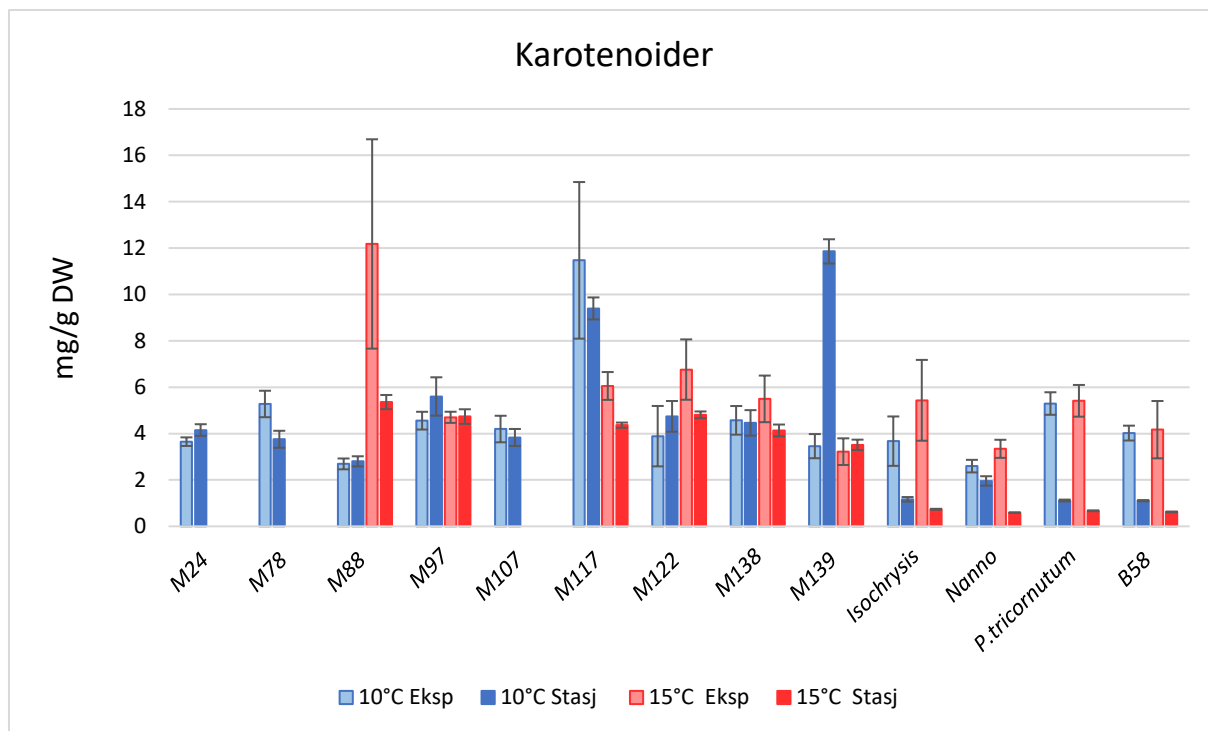
3.3. Klorofyll *a* og karotenoider

Klorofyll *a* og karotenoider viste normale verdier for alle stammene undersøkt i dette eksperimentet, med den høyeste klorofyll *a* mengden på 42,2 mg/g DW ved 15°C. Dette var hos stammen M88 i eksponentiell fase (Figur 33). Men den har et veldig høyt standardavvik på hele 15,6 mg/g DW, noe som vil si at ikke resultatene er veldig til å stole på i dette tilfellet. Ved 10°C var det M117 som hadde høyest mengde klorofyll *a* på $32,2 \pm 9,4$ mg/g DW, dette var også i eksponentiell fase. Alle de andre stammene lå under 20 mg/g DW ved begge temperaturene bortsett fra M122 og M138 ved 15°C i eksponentiell fase og M139 ved 10°C i stasjonær fase som lå rett over 20 mg/g DW.



Figur 33: Klorofyll a (oppgitt i mg per gram tørrvekt, gjennomsnitt \pm SD, $n=4$) hos stammene dyrket ved 10°C og 15°C. Blå stolper viser klorofyll a hos stammene ved 10°C og røde stolper viser klorofyll a mengde ved 15°C. Lyse farger illustrerer eksponentiell fase, mens mørke farger er stasjonær fase. Barene på toppen viser standardavvik.

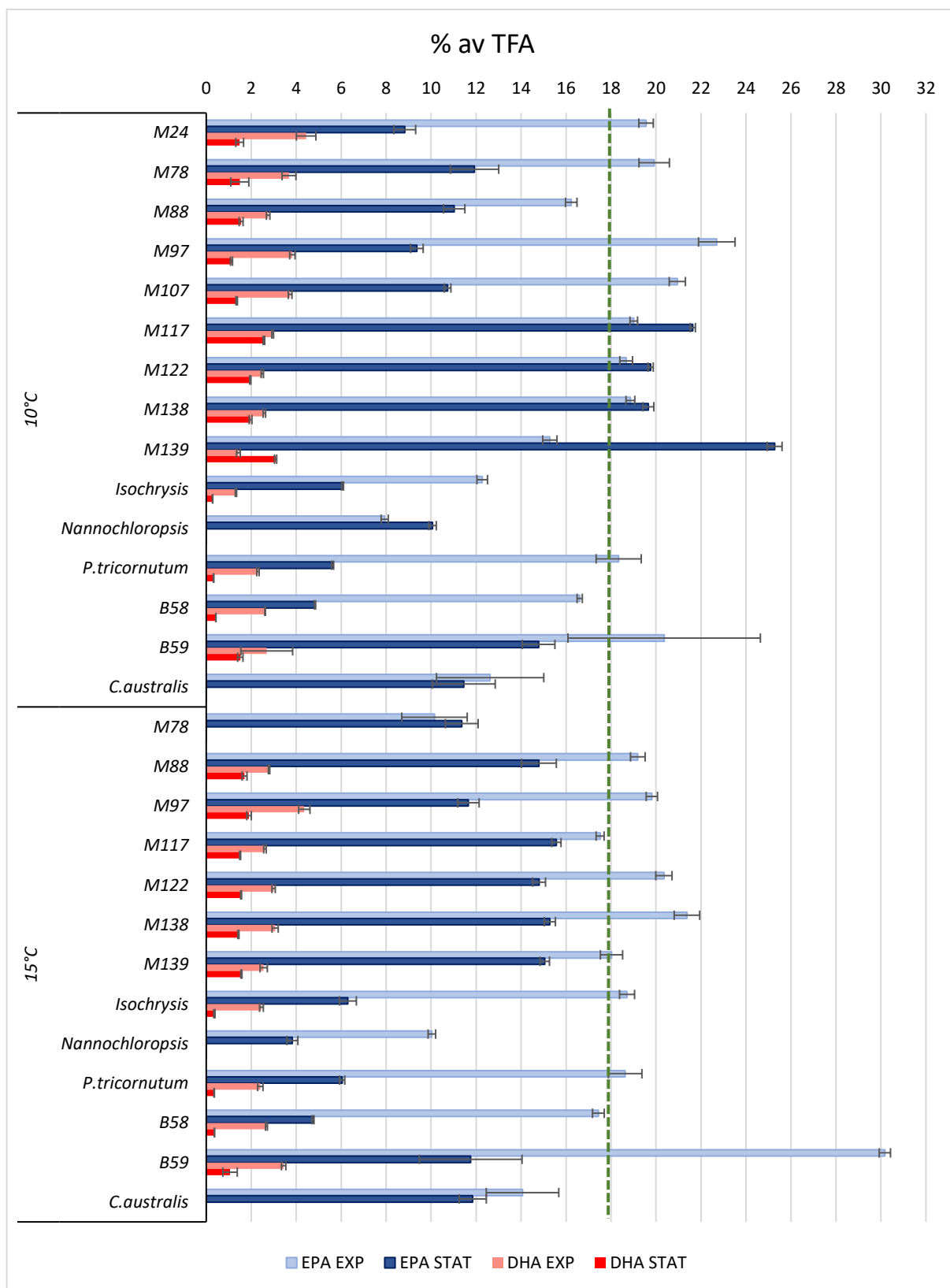
Karotenoidene ble funnet i relativt lave konsentrasjoner, med den høyeste verdien på 12,2 mg/g DW (M88) i eksponentiell fase ved 15°C, og 11,9 mg/g DW ved 10°C (M139 i stasjonær fase) (Figur 34). Ved 10°C hadde også M117 høyere verdier enn gjennomsnittet, med 11,5 mg/g DW i eksponentiell fase og 9,4 mg/g DW i stasjonær fase.



Figur 34: Karotenoider (oppgitt i mg per gram tørrvekt, gjennomsnitt \pm SD, $n=4$) hos stammene dyrket ved 10°C og 15°C. Blå stolper viser karotenoider hos stammene ved 10°C og røde stolper viser karotenoider ved 15°C. Lyse farger illustrerer eksponentiell fase, mens mørke farger er stasjonær fase. Barene på toppen viser standardavvik.

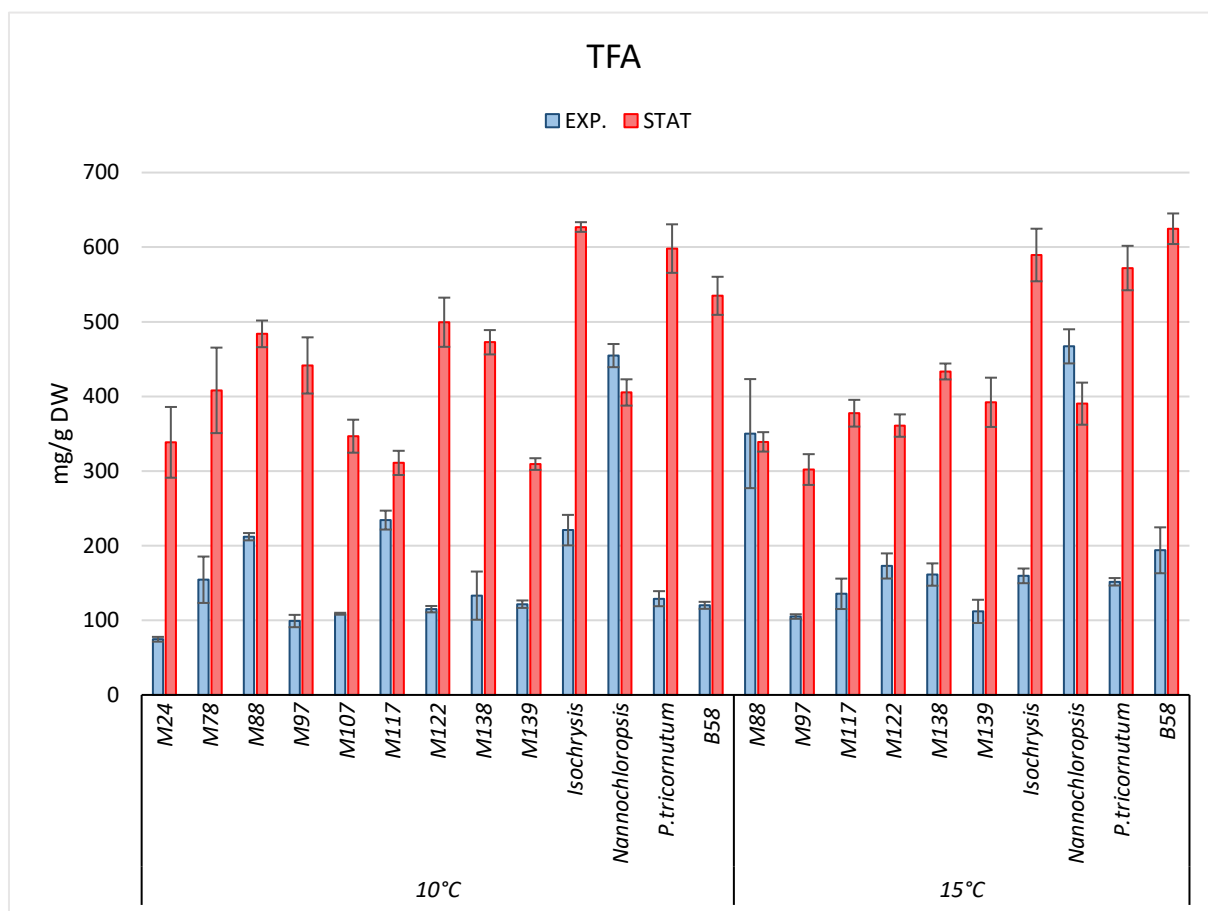
3.4. Fettsyrer

Prosentvis EPA og DHA av totale mengder fettsyrer (TFA) ble regnet ut, og B59 ved 15°C kom ut som den kandidaten med høyest % EPA per TFA, med 30,2 % per TFA i eksponentiell fase (Figur 35). Ved 10°C var det M139 som kom best ut i stasjonær fase med 25,3 % per TFA. Stammene som ikke nådde grenseverdien på 18 % EPA per TFA er M88 (*Thalassiosira hispida*), *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis gaditana*, B58 (*Phaeodactylum tricornutum*, lokal stamme) og *Craspedostauros australis* ved 10°C, i tillegg til M78 (*T. hispida*), M117 (*Entomoneis* sp.), *N. gaditana*, B58 (*P. tricornutum*, lokal stamme) og *C. australis* ved 15°C. Ingen av stammene nådde grenseverdien på 12 % DHA per TFA hverken i eksponentiell eller stasjonær fase.



Figur 35: EPA (Blått) og DHA (Rødt) vist som prosent av totale fettsyrer (TFA) (gjennomsnitt \pm SD, n=4). Grønn stiplet linje viser grenseverdien for EPA som prosent av totale fettsyrer og ligger på 18%. De lyse fargede stolpene viser % av TFA i eksponentiell fase (blå for EPA og rød for DHA), mens de mørke fagene viser stasjonær fase (blå for EPA og rød for DHA).

Den totale mengden fettsyrer oppgitt i mg per g tørrvekt ble regnet ut, og alle hadde ganske høye verdier av TFA i stasjonær fase (Figur 36). Ved 10°C var det *Isochrysis galbana*, *Phaeodactylum tricornutum* og B58 som hadde de høyeste verdiene av totale fettsyrer per gram tørrvekt på henholdsvis 625,9 mg/g DW, 598,1 mg/g DW og 534,8 mg/g DW, og vi ser at mer enn 50 % av tørrvekten er fettsyrer. Ved 15°C var det også *I. galbana*, *P. tricornutum* og B58 som hadde de høyeste verdiene av totale fettsyrer per gram tørrvekt, her lå verdiene på henholdsvis 589,5 mg/g DW, 572,0 mg/g DW og 624,7 mg/g DW.



Figur 36: Totalt fettsyreinnhold (oppgitt i mg per gram tørrvekt, gjennomsnitt \pm SD, $n=4$) for hver av stammene dyrket ved både 10 og 15°C. Blå stolper viser fettsyreinnholdet i eksponentiell fase, mens røde stolper viser fettsyreinnholdet i stasjonær fase.

Alle stammene dyrket ved både 10°C og 15°C hadde en signifikant økning ($P < 0,05$) i mengde totale fettsyrer per tørrvekt fra eksponentiell fase til stasjonær fase, noe som kan tyde på akkumulering av fettsyrer (bortsett fra M88 ved 15°C og *N. gaditana* ved både 10°C og 15°C, disse stammene hadde nedgang i TFA fra eksponentiell til stasjonær fase).

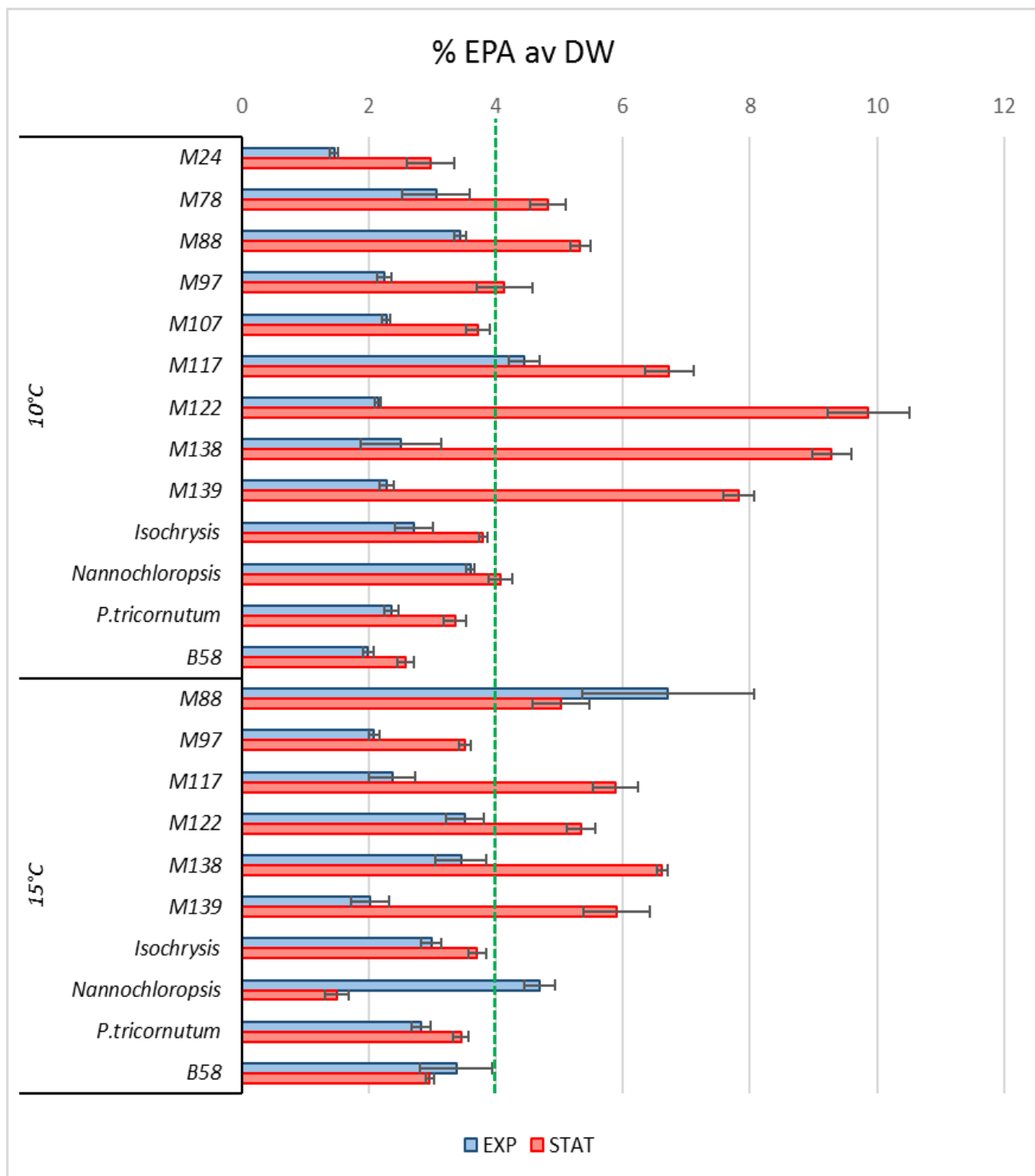
EPA nivået ble også utregnet som % av tørrvekten, og en grenseverdi på 4 % ble satt. Ved 10°C inneholdt alle stammene 4 % eller mer i stasjonær fase utenom M24, M107, *I. galbana*, *P. tricornutum* og B58 (Figur 37).

M117, M122, M138 og M139 som er de lokale stammene (*Entomoneis* sp.) fra Store Lungegårdsvann lå langt over grenseverdien med en prosent på henholdsvis 6,7 %, 9,9 %, 9,3 % og 7,8 % i stasjonær fase.

Ved 15°C inneholdt alle stammene høyere verdi av EPA enn 4 % av tørrvekten utenom M97, *I. galbana*, *P. tricornutum* og B58. Noen oppnådde dette i eksponentiell fase, men de fleste oppnådde det i stasjonær fase når kulturen var blitt næringsfattig. Det var stammen fra Svalbard M88 (*Thalassiosira hispida*) som oppnådde den høyeste prosenten EPA per tørrvekt ved 15°C, det ble oppnådd i eksponentiell fase og lå på 6,7 %, i tillegg var EPA nivået også over 4 % i stasjonær fase hos denne stammen, og lå på 5,0 %.

M117, M122, M138 og M139 oppnådde høy % EPA i stasjonærfase også ved 15°C, men ikke like høy som ved 10°C. Ved 15°C lå de på henholdsvis 5,9 %, 5,3 %, 6,6 % og 5,9 %.

Nannochloropsis gaditana hadde høy % EPA per tørrvekt ved 15°C, og dette ble oppnådd i eksponentiell fase, da lå EPA nivået på 4,7 % av tørrvekten.



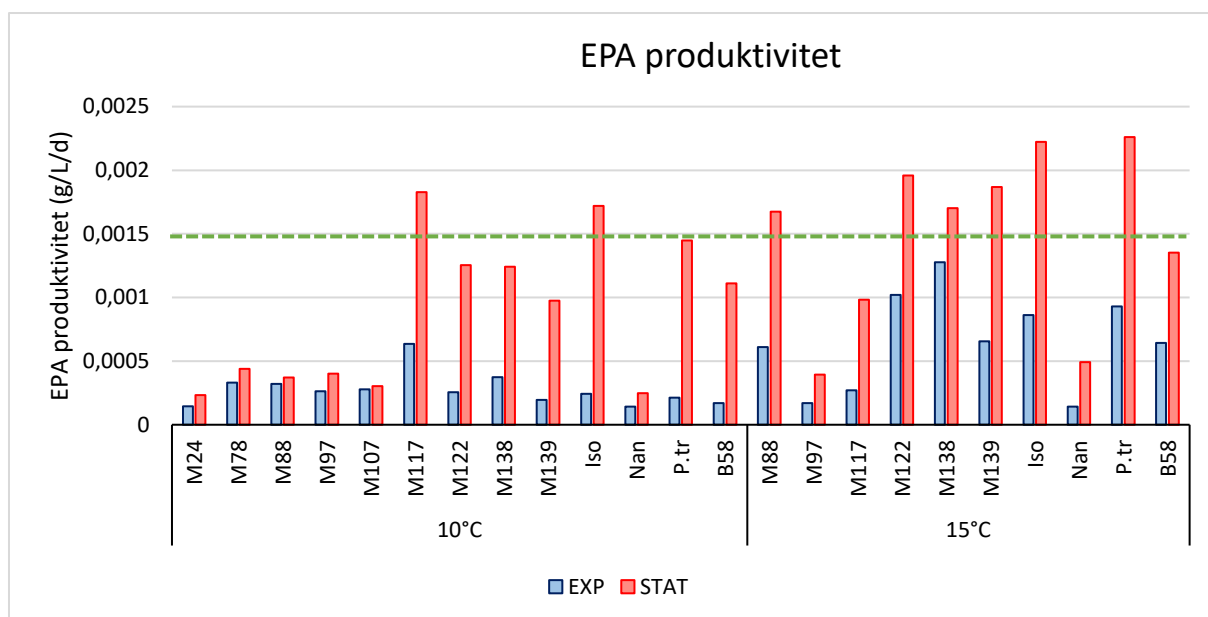
Figur 37: EPA som prosent av tørrvekten (gjennomsnitt \pm SD, n=4). Den grønne stiplede linjen viser grenseverdien som er satt til 4 % av tørrvekten. Den nederste gruppen viser stammene dyrket i 15°C og den øverste gruppen viser stammene dyrket i 10°C. De øverste stolpene per stamme viser EPA nivået per tørrvekt i eksponentiell fase (blå), mens den nederste stolpen per stamme viser EPA nivået per tørrvekt ved stasjonær fase (rød).

Statistisk t-tester ble utført i R for å se om det var signifikant forskjell på mg EPA per gram tørrvekt mellom stammene når de var dyrket ved 10°C og 15°C ($P < 0,05$). Her fant jeg at i eksponentiell fase var det signifikant forskjell på mengde EPA på stammene dyrket ved 10°C og 15°C på stamme M88 (P-verdi = 0.017), M117 (P-verdi = 0.00018), M122 (P-verdi = 0.0023), *Nannochloropsis gaditana* (P-verdi = 0.0019), *Phaeodactylum tricornutum* (P-verdi = 0.0032) og B58 (*P. tricornutum*, lokal stamme) (P-verdi = 0.015). Alle disse stammene hadde den høyeste mengden EPA per gram tørrvekt ved 15°C i eksponentiell fase, unntatt M117 som hadde høyest mengde EPA ved 10°C.

I stasjonær fase var det stammene M117 (P-verdi = 0.017), M122 (P-verdi = 0.00028), M138 (P-verdi = 0.00018), M139 (P-verdi = 0.0021), *N. gaditana* (P-verdi = 1.191e-06) og B58 (P-verdi = 0.0041) som hadde signifikant forskjell på EPA mengde når de var dyrket ved de to temperaturene. I denne fasen var det dyrking ved 10°C som ga mest EPA per gram tørrvekt hos alle stammene, unntatt hos B58 som hadde høyest mengde EPA ved 15°C.

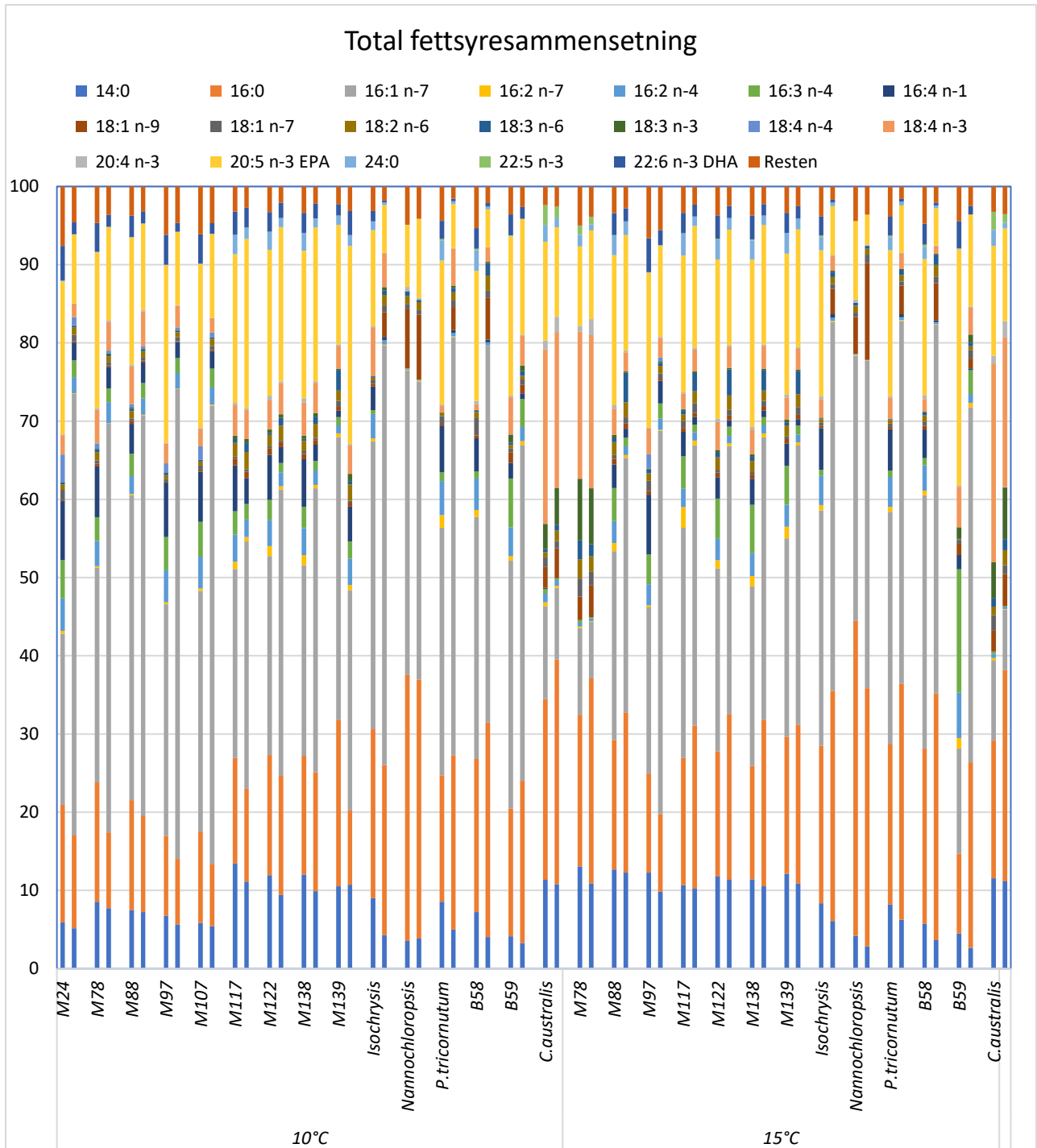
EPA produktiviteten kan også bli utregnet og gir oss et mål på hvor mye EPA (g/L) som blir produsert hvert døgn. I stasjonær fase var EPA produktiviteten høy hos M117 og *Isochrysis galbana* dyrket ved 10°C, i tillegg var den relativt høy hos M122, M138, M139, *Phaeodactylum tricornutum* og B58, men verdiene her lå under grenseverdien som var satt til 0,0015 g/L/d (Figur 38).

Ved 15°C var det M88, M122, M138, M139, *I. galbana* og *P. tricornutum* i stasjonær fase som hadde den høyeste EPA produktiviteten. B58 hadde også ganske høy produktivitet og lå rett under grensen på 0,0015 g/L/d. Generelt hadde alle stammene i stasjonær fase høyere EPA produktivitet ved 15°C enn ved 10°C, bortsett fra M117 som hadde høyest produktivitet ved 10°C



Figur 38: EPA produktivitet (gram per liter per døgn) for stammene dyrket ved 10°C og 15°C. Blå søyle viser produktiviteten i eksponentiell fase, mens røde søyler viser produktiviteten i stasjonær fase. Den grønne stiplede linjen viser (en selvvalgt) grenseverdi på 0,0015.

Det totale fettsyreinnholdet inndelt i prosent viste at 16:1 (n-7) fettsyren (palmitolensyre) var den fettsyren de fleste stammene inneholdt mest av, i tillegg inneholdt de ganske mye 16:0, palmitinsyre (Figur 39). Men av fettsyrene som vi var interessert i, som omega-3 og omega-6, var det EPA (20:5 n-3) som kom best ut hos alle stammene, både ved 10°C og 15°C. I tillegg hadde *Craspedostauros australis* ved begge temperaturer, og M78 (*Thalassiosira hispida*) ved 15°C, mye 18:4 (n-3) (Stearidonsyre). Dette er interessant siden *C. australis* vokste veldig klumpete ved begge temperaturene, i tillegg vokste M78 klumpete ved 15°C. Ved 10°C vokste M78 jevnt og da inneholdt den lite 18:4 fettsyre.



Figur 39: Total fettsyresammensetning per stamme som viser hvor mange prosent av hver fettsyre hver stamme består av. Den første søylen per stamme viser fettsyresammensetningen i eksponentiell fase, mens den siste søylen per stamme viser sammensetningen i stasjonær fase. De første 15 stammene (fra M24 til *C. australis*) viser fettsyresammensetningen dyrket ved 10°C, mens de siste 13 stammene (fra M78 til *C. australis*) viser fettsyresammensetningen dyrket ved 15°C. Alle fettsyrer som var tilstede med mindre enn 0,2% er blitt samlet i en gruppe kalt «resten».

4. Diskusjon

Jeg har i denne oppgaven studert prymnesiophyceen *Isochrysis galbana* og eustigmatophyceen *Nannochloropsis gaditana*, i tillegg til diatomeene *Thalassiosira hispida*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Entomoneis* sp., *Craspedostauros britannicus* og *Craspedostauros australis*. Jeg har valgt å diskutere algenes vekst i sammenheng med hvor de er isolert fra og med de spesielle miljøforholdene som råder der. I tillegg vil jeg diskutere hvordan de to forskjellige temperaturene (10°C og 15°C) påvirker vekst og EPA innholdet i de forskjellige stammene. Innholdet av DHA var lavt ved alle stammene som ble undersøkt og vil ikke bli videre diskutert. Innholdet av karotenoider var også svært lavt og vil bare bli oppsummert i korthet.

4.1. Vekstområder:

Mikroalgene jeg har jobbet med kommer som nevnt fra forskjellige områder med ganske forskjellig klima og det er dermed forventet at veksten og fettsyresammensetningen i disse stammene kan være svært forskjellige. Noen arter er vant til varme, mens andre er vant til kulde og mørke. I tillegg til forskjeller i lys og temperatur er det også variasjoner i tilgjengelig næring i de ulike vekstområdene, noe som fører til at algene må være spesielt tilpasset det miljøet de lever i.

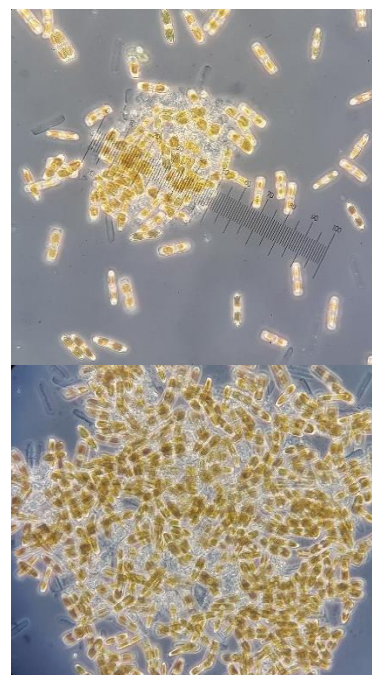
4.1.1. Svalbard

Stammene jeg har undersøkt fra Svalbard er fire stammer av diatomeen *Thalassiosira hispida*, kalt M24, M78, M88 og M107. Ved 10°C vokser alle litt, men de oppnår ikke høy tetthet eller rask veksthastighet (Figur 28), dette kan være på grunn av at de er vant med enda lavere temperaturer enn 10°C. I havene rundt Svalbard er temperaturen ned mot frysepunktet, og temperaturen her har til og med blitt målt til -1,98°C som er 0,037 °C under frysepunktet for vann, noe man ikke trodde var mulig (Hanssen 2009). I tillegg til lave temperaturer er Svalbard kjent for lang mørketid, midnattssol og lite nedbør. Det er store sesongvariasjoner i innstråling av sollys og daglengde, i tillegg til sjøis store deler av året.

Dette fører til at mikroorganismene som lever her må klare seg i lengre perioder i tilnærmet mørke, for så å blomstre når solinnstrålingen øker (Winther *et al.* 2016).

Ved 15°C døde to av stammene (M24 og M107) før jeg fikk kommet i gang med screeningen, dette er nok på grunn av mye høyere temperaturer enn de er vant med, i tillegg til rask overgang fra 8°C (som det kaldeste klimaskapet holdt) til 15°C. Om jeg hadde hatt bedre tid ville jeg prøvd å overføre dem mer varsomt fra 8°C til 10°C og videre til 12°C før jeg hadde tatt dem opp til 15°C, dette kunne gjort at de hadde klart overgangene mellom temperaturene bedre og kanskje overlevd. De to andre stammene (M78 og M88) vokste bra ved 15°C (Figur 29), men M78 vokste ujevnt og klumpete ved så høy temperatur (Figur 40). Dette kan være på grunn av stress som kan føre til at de skiller ut slim (mucilage) som de kan bruke som en slags beskyttelse. *Thalassiosira* vokser vanligvis i kjeder eller innebygd i slim (et tyktflytende geleaktig stoff) som kan «lime» cellene sammen i større kolonier

(Graham *et al.* 2016). I tillegg er diatomeer velkjent for å vokse under isen i den kalde årstiden, og rike samfunn av diatomeer samler seg da i store aggregater i og under sjøis, og i smeltevann (Fernández-Méndez *et al.* 2014). En av fordelene ved å danne aggregater i forhold til å leve som enkelt celler eller kortkjedete celler, er beskyttelse mot høye irradianser. I tillegg er det lettere å fange gassbobler som forbedrer flyteevnen til algene når de vokser i store klumper og filamenter. Innfestningen i isen sent på høsten kan også være en grunn til at arktiske alger danner aggregater (Fernández-Méndez *et al.* 2014). Her ser vi at det kan være stressfaktorer som høy lysinnstråling og bobling som fører til at M78 danner klumper (aggregater) ved høyere temperaturer, og den kan dermed få bedre flyteevne ved å fange gassboblene og unngå å sedimentere. Men dette virker litt mot sin hensikt i mine tette kulturer hvor vi ser at de stammene som danner aggregater er blant de som sedimenterer raskest. De krever mer omrøring enn de andre stammene for å holde seg flytende, men filamentene blir likevel så store og tunge at boblene jeg brukte ikke klarer å holde dem flytende.



Figur 40: *Thalassiosira* (M78) dyrket ved 15°C, her ser man tydelig at cellene limer seg sammen til store klumper.

Foto: Hege Kvamme

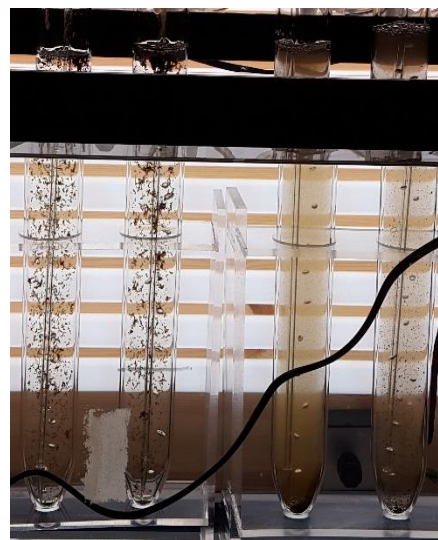
M88 vokste overraskende bra ved 15°C og den oppnådde en veksthastighet på 0,73 d⁻¹, som er over grensen på dobling av antall celler per døgn i vekstfasen. En grunn til dette kan være at denne mikroalgen var isolert i 2014, og har dermed levd i klimaskap som holder 8-9°C i 2-3 år. Så selv om de er isolert fra Svalbard sine kalde omgivelser i utgangspunktet, vil de nå være bedre tilpasset klimaet i klimaskapet. Hvis algene hadde blitt dyrket direkte ved 15°C rett etter de var blitt innsamlet og isolert, er det en større sjanse for at alle stammene hadde dødd, og ikke bare 2 av dem.

4.1.2. Store Lungegårdsvann

Stammene som ble screenet fra Store Lungegårdsvann og området rundt dette var M117, M122, M138 og M139, som er identifisert som diatomeen *Entomoneis* sp., i tillegg til en stamme av diatomeen *Phaeodactylum tricornutum* (B58), og en stamme av diatomeen *Craspedostauros britannicus* (B59) og *C. australis*. Som vi ser av Figur 28 og 29 vokser alle *Entomoneis* sp. stammene fort i eksponentiell fase og har høy veksthastighet både ved 10°C og 15°C, de tåler også godt overgangen mellom de to temperaturene. Dette er mest sannsynlig på grunn av at sjøvannet i Store Lungegårdsvann er påvirket av byområdene som ligger rundt, blant annet av forurenset avløpsvann, i tillegg til store sesongmessige svingninger i miljøforholdene (Olsvik *et al.* 2009). Dette fører til at artene herfra må tilpasse seg varierende forhold, og kan gjerne bli mer robuste enn arter fra mer stabile områder. Det er bare *Entomoneis* sp. stammene som når en veksthastighet på $\geq 0,7$ d⁻¹ både ved 10°C og 15°C, dette kan være på grunn av at disse stammene er vant til store sesongmessige forandringer i temperaturer og andre miljøforhold, noe som gjør dem mer tilpasningsdyktige. Ved 15°C når også B58 (*Phaeodactylum tricornutum*) fra Bergens fjordene en veksthastighet på over 0,7 d⁻¹.

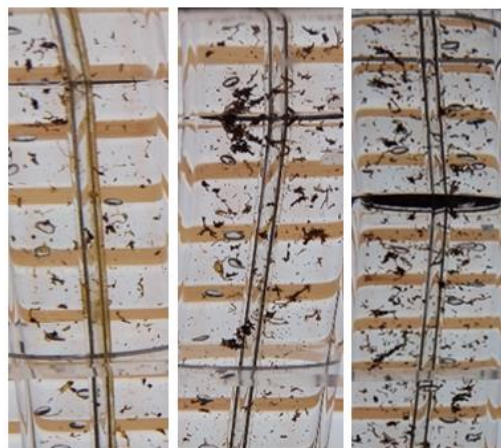
C. australis og *C. britannicus* (B59) danner aggregater ved

10°C og 15°C, og *C. australis* er den eneste stammen i denne studien som har god flyteevne selv om den danner aggregater, det ser ut som at dette kan være fordi den ikke danner store



Figur 41: B59 (*Craspedostauros britannicus*) til venstre og *Craspedostauros australis* til høyre. Vi ser at begge kulturene vokser klumpete, men likevel vokser *C. australis* mye jevnere enn *C. britannicus*
Foto: Hege Kvamme

klumper, men heller jevne tynne flak som lettere kan holde seg flytende ved hjelp av boblene (Figur 41). *C. britannicus* (B59) og *C. australis* vokser likevel for klumpete til at jeg fikk målt tørrvekt og OD, men ut fra bilder og vurdering av kulturene vokser de veldig bra og oppnår ganske høy tetthet. Jeg vil tro at også disse oppnår en dobling i antall celler i eksponentiell fase (Figur 42).



Figur 42: Veksten til B59 ved 15°C 3 dager på rad i eksponentiell fase.

Foto: Hege Kvamme

4.1.3. Spania

Artene fra Spania, eustigmatophyceen *Nannochloropsis gaditana*, prymnesiophyceen *Isochrysis galbana* og en stamme av diatomeen *Phaeodactylum tricornutum*, er tilpasset et klima med mye høyere og mer stabile temperaturer enn arter fra de nordlige vannmassene, men klimaet i Spania er ganske variert i forhold til hvor i Spania man befinner seg.

Fitoplankton Marino (som har isolert disse stammene) er lokalisert i Cádiz, sør i Spania, og jeg vil derfor anta at stammene jeg har er fra området rundt sørkysten av Spania. Her er det middelhavsklima med varme, tørre somre og milde vintre med en del nedbør (Aarli 2013).

De spanske stammene *I. galbana* og *P. tricornutum* når kriteriet på en veksthastighet på $\geq 0,7 \text{ d}^{-1}$ i eksponentiell fase ved 15°C, men ikke ved 10°C. Dette tyder på at de spanske artene krever høyere temperatur for å nå høy nok veksthastighet. De vokser til ganske høy tetthet ved 10°C også (Figur 28), men bruker mye lenger tid, og når derfor ikke kriteriet på en dobling av antall celler per døgn. Grunnene til at de vokser raskere ved 15°C er nok fordi dette ligger nærmere temperaturen de er vant til, siden vanntemperaturen rundt området der de mest sannsynlig er isolert fra vanligvis ligger på mellom 17°C og 20°C (Meteodb.com 2017).

Nannochloropsis gaditana når ikke rask veksthastighet ved noen av temperaturene, denne krever nok enda høyere temperaturer for å vokse optimalt. Ved 15°C når den en ganske høy tetthet med en OD750 på 6,5, men den bruker 35 døgn på å nå denne tettheten (Figur 29). Det kunne vært interessant å dyrke denne ved høyere temperaturer for å se om den kan oppnå like høy tetthet på kortere tid. Ved 10°C når ikke *N. gaditana* høy tetthet og bruker veldig lang tid før den i det hele tatt begynner å vokse, dette er nok på grunn av alt for kalde

temperaturer i forhold til hva den er vant med. Hadde den fått stått enda lengre kan det være den ville begynt å vokse mer til slutt, men den ville nok uansett hatt en lav veksthastighet. I tillegg kan det se ut som at *N. gaditana* ikke tålte dyrkingsforholdene så godt, og da hovedsakelig boblingen i kulturene. Jeg tror dette kan være grunnen til at det tok ganske mange døgn før det ble noe særlig vekst ved 15°C også (Figur 29). Ved 10°C fikk vi som nevnt aldri noe bra vekst, men når kulturen stod i klimaskap som holdt 8-9°C var det mye mer vekst (sett ut fra fargen på kulturen), og den største forskjellen mellom dyrkingen i klimaskapet og dyrkingen i kulturrørene er at rørene ble boblet med luft tilsatt 1 % CO₂. Hovedgrunnen til at de ble boblet med luft tilsatt 1 % CO₂ var for å sikre en stabil pH, hindre CO₂ begrensning, i tillegg til å unngå sedimentering, men ut fra resultatene mine på *N. gaditana* ville jeg ved en senere anledning prøvd å dyrke dem på nytt med svak bobling, og heller brukt en svak magnetrører for å unngå sedimentering. Eventuelt kunne man brukt en pH sensor som slår på bobler når pH verdien blir for høy, og slår seg av igjen når pH verdien er normalisert.

Jeg har nå diskutert litt miljøforholdene i sammenheng med veksten til de forskjellige stammene og vil videre se nærmere på forskjellene mellom de to stammene av *P.tricornutum*, som er isolert fra helt forskjellige miljøer. Den ene er isolert fra Spania, mens den andre er isolert fra Bergens fjordene. Hvis vi begynner med å sammenligne B58 (*P.tricornutum* fra Bergen) og *P.tricornutum* (fra Spania) med tanke på OD og tørrvekt ser vi at det ikke er store forskjeller her, stammen fra Bergen vokser til litt høyere tetthet, men den når også stasjonærfase senere enn stammen fra Spania, spesielt ved 15°C (Figur 28 og Figur 29). Begge stammene av *P.tricornutum* når en veksthastighet på $\geq 0,7$ ved 15°C, og ingen av dem når denne veksthastigheten ved 10°C. Vi ser den samme trenden på tørrvekt, hvor begge stammene ligger ganske jevnt, men stammen fra Bergen har litt høyere tetthet enn stammen fra Spania (Figur 30 og 31). Biomasseproduktiviteten som er antall gram biomasse produsert per liter per døgn viser like resultater for begge stammene ved 10°C, men ved 15°C har stammen fra Spania en god del høyere produktivitet (Figur 32). Dette er på grunn av at stammen fra Bergen tok lengre tid før den stabiliserte seg skikkelig og den vokste da i mange flere døgn enn stammen fra Spania før den ble høstet i stasjonær fase. Den vokste ganske lite per døgn på slutten, og produktiviteten går dermed ned, siden omtrent samme biomasse deles på flere antall døgn. EPA innholdet per tørrvekt er også

ganske likt for begge stammene (Figur 37), men EPA produktiviteten som er hvor mange gram EPA per liter som blir produsert per døgn blir ganske forskjellig ved 15°C (Figur 38), dette er på grunn av forskjell i antall døgn de fikk vokse, som er det samme som beskrevet for biomasseproduktiviteten.

I følge et forsøk gjort av Fremming (2014) ble det vist at diatomeen *Phaeodactylum tricornutum* produserte mye EPA og DHA ved lave temperaturer, samt høy næringskonsentrasjon. I mitt forsøk ser vi at innholdet av EPA hos *P. tricornutum* er nesten det samme ved 10°C og 15°C. De når heller ikke grensen på 4 % EPA per gram tørrvekt ved noen av temperaturene, så kanskje det må enda lavere temperaturer og høyere næringstilførsel til for at denne arten skal produsere mer EPA.

Ved å studere disse to stammene som er isolert fra forskjellige miljøer ser vi at det ikke nødvendigvis betyr så mye hvor stammene opprinnelig er isolert fra, men at det viktigste er vekstforholdene de blir kultivert under. Vi skal dermed se nærmere på vekstforholdene til stammene, med hovedvekt på temperatur.

4.2. Vekst og temperatur:

Når vi sammenligner tørrvekten og OD750 til alle stammene ved 10°C og 15°C ser vi at stammene generelt vokser bedre ved 15°C enn ved 10°C (Figur 28-31). De oppnår høyere tetthet og vokser fortere. Ved 10°C er det bare de fire stammene fra Store Lungegårdsvann som oppnår ønsket veksthastighet, mens ved 15°C er det syv stammer som oppnår ønsket veksthastighet, dette er de fire fra Store Lungegårdsvann (de samme som oppnår høy veksthastighet ved 10°C), M88 fra Svalbard, og *I. galbana* og *P. tricornutum* fra Spania. Nordlige arter er kjent for å ha forholdsvis høy vekst ved lave temperaturer, lite lys og lite næringstilførsel (Elvevoll *et al.* 2014), noe som kan være grunnen til at de fire stammene av *Entomoneis* sp. vokser bra ved 10°C. Men dette stemmer ikke helt for M88 som vokser bedre og til høyere tetthet ved 15°C enn ved 10°C, samt oppnår høyere % EPA per DW ved 15°C enn ved 10°C. Det kan være flere grunner til at M88 oppfører seg uforutsigbart ved 15°C, og en av grunnene kan være at M88 ikke opprinnelig kommer fra Svalbard, og vokser derfor bedre under andre forhold enn hva man ville forventet. Mikroalger er ikke alltid bare lokalisert ett sted, og samme art kan leve mange steder, og under forskjellige forhold. Som man kan se i innledningen mener Medlin & Cembella (2013) at stigende havtemperaturer i

forbindelse med klimaendringer kan føre til bred utvidelse av vekstområder mot høyere breddegrader, noe som kan være en av grunnene til at M88 kan ha trukket seg Nordover.

Veksten og de biokjemiske prosessene hos mikroalger er avhengig av temperaturen og det er funnet at temperatur kan forårsake endringer i den cellulære strukturen, spesielt i volumet til alger hvor en temperatur høyere enn den optimale verdien induserer en økning i cellevolumet (Tebbani *et al.* 2014). Dette kan være en av grunnene til at tettheten er større ved dyrking i høyere temperaturer. Det er ikke nødvendigvis flere celler ved høyere temperaturer, det er også mulig at det bare er større celler som gir høyere tørrvekt og OD.

Men det er vanskelig å

konkludere med noe her med

hensyn til mine stammer. Ut fra

mine mikroskopbilder av

Craspedostauros britannicus

(B59) og *Craspedostauros*

australis (Figur 43) ser det ut

som at innholdet i cellene

forandrer seg ved 10°C og 15°C.

Stammene dyrket ved 10°C ser

mer gul ut gjennom hele cellen,

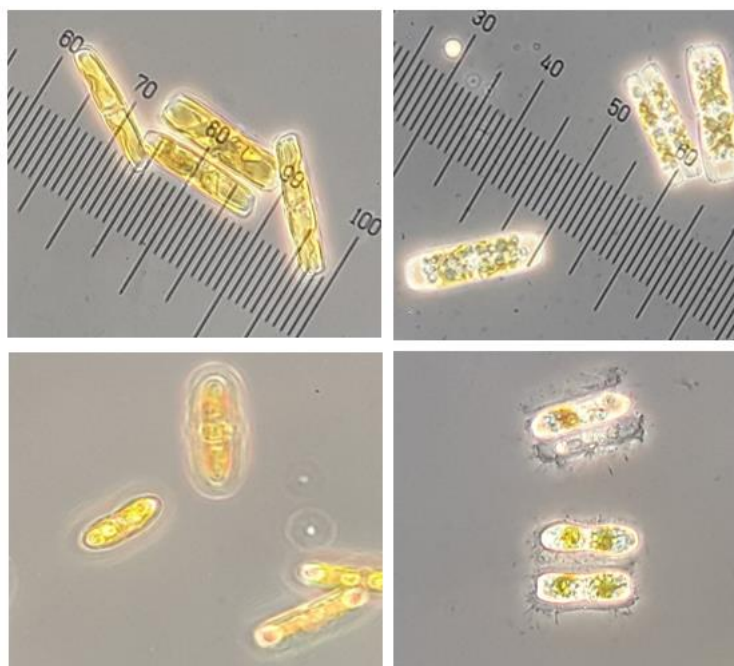
mens ved 15°C er de mer hvit

med gule prikker fordelt rundt i

cellen, i tillegg ser de mer lange

og tynne ut ved 10°C, og litt

tykkere ved 15°C.



Figur 43: Øverst ser vi B59 dyrket ved 10°C (til venstre) og 15°C (til høyre). Nederst ser vi *Craspedostauros australis* dyrket ved 10°C (til venstre) og 15°C (til høyre).

Foto: Hege Kvamme

4.3. Temperatur og fettsyreproduksjon

Som nevnt tidligere er vekst og fettsyreproduksjon hos mikroalger avhengig av miljøforhold, og de viktige faktorene her en temperatur, lys og næring. På grunn av at det er veldig tidskrevende å dyrke alle stammene ved forskjellig belysning, forskjellig næringstilførsel og forskjellige temperaturer, ble det i denne oppgaven fokuset på forandringer ved to forskjellige temperaturer. Næringstilførselen var akkurat den samme for alle stammene ved

begge temperaturene, Walne's medium, (Appendiks 1, Tabell A1), og lysstyrken var konstant på ca. 160 $\mu\text{mol fotoner m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Det er hovedsakelig fokusert på forandringer i EPA og DHA innholdet til de forskjellige stammene ved de to forskjellige temperaturene. Dette ble valgt på grunn av at det er dokumentert at fettsyre-sammensetning og innhold varierer ved dyrking i forskjellige temperaturer. Zhu *et al.* (1997) mener at det er et omvendt forhold mellom andelen av flerumettede fettsyrer i lipider og temperatur, hvor de viser at kulturer dyrket ved lave temperaturer hadde et relativt høyt innhold av PUFA, mens James *et al.* (1989) kunne vise et økende EPA innhold med økende temperaturer opp til 25°C innen et temperatur spekter på 15-35°C. I en studie av Hu & Gao (2006) fant de akkumulering av PUFA og EPA ved lavere temperaturer. De fant også ut at forhøyet CO₂, lav saltholdighet, moderat fosfat og overdrevne nitratnivåer er gunstige faktorer for å øke EPA utbyttet i *Nannochloropsis sp.*, i tillegg til lave temperaturer. Ut fra mine resultat ser vi at alle stammene inneholdt lite DHA, derfor har jeg valgt å bare fokusere videre på EPA.

De statistiske testene som jeg gjennomførte viste at i eksponentiell fase er det signifikant forskjell på mengde EPA dyrket i 10°C og 15°C hos stammene M88, M117, M122, *Nannochloropsis gaditana*, *Phaeodactylum tricornutum* og B58 (*P. tricornutum*, lokal stamme). Alle disse stammene har den høyeste mengden EPA per gram tørrvekt ved 15°C, unntatt M117 som har høyeste mengde EPA ved 10°C.

I stasjonær fase er det stammene M117, M122, M138, M139, *N. gaditana* og B58 som har signifikant forskjell i EPA mengde når de er dyrket ved de to temperaturene. I denne fasen er det dyrking ved 10°C som gir mest EPA per gram tørrvekt hos alle stammene med unntak av B58, som har høyest mengde EPA ved dyrking ved 15°C.

I tillegg har nesten alle stammene et høyere innhold av EPA i stasjonær fase enn i eksponentiell fase. Dette viser at mine resultater er mye lik på resultatene Zhu *et al.* (1997) og Hu & Gao (2006) fant, hvor det er økende mengde EPA ved minkende temperaturer.

Hvis vi ser på hvor mange prosent EPA av totale fettsyrer (TFA) stammene inneholder ved 10°C og 15°C, ser vi at i eksponentiell fase inneholder *Craspedostauros australis*, B59, B58, *Nannochloropsis*, *Isochrysis*, M139, M138 og M122 høyest prosent EPA av TFA ved 15°C, mens M117, M97, M88 og M78 oppnår høyest prosent EPA ved 10°C (Figur 35). Her ser vi en trend hvor artene fra Spania og de fleste fra Store Lungegårdsvann produserer mest EPA per TFA ved høyere temperaturer, mens stammene fra Svalbard produserer mest EPA ved lavere

temperaturer. *P. tricornutum* fra Spania produserer samme mengde EPA ved 10°C og 15°C, så her er ikke temperaturen avgjørende for EPA innholdet.

EPA innholdet i prosent av TFA er generelt lavere i stasjonær fase enn i eksponentiell fase, bortsett fra hos stammene M117, M122, M138, M139 (fra Bergen) og *Nannochloropsis* ved 10°C, og hos M78 ved 15°C. Samtidig øker innholdet av TFA fra eksponentiell fase til stasjonær fase, noe som kan være grunnen til at EPA/TFA minker. *Craspedostauros britanicus* (B59) har et veldig høyt innhold av EPA per TFA ved 15°C i eksponentiell fase, da ligger det på ca. 30 % av den totale mengden fettsyrer. Dette er et veldig høyt innhold, og det vil være veldig interessant å studere denne videre for å finne ut mer om hvordan de andre miljøparameterne, både hver for seg og i kombinasjoner, påvirker EPA innholdet.

Når vi sammenligner EPA innholdet som prosent av tørrvekten i de forskjellige fasene, ser vi at alle stammene ved 10°C har høyere innhold EPA i stasjonær fase enn i eksponentiell fase, noe som tyder på akkumulering av fettsyrer ved denne temperaturen (Figur 37). Ved 15°C har M88 *Thalassiosira hispida* (Svalbard), *Nannochloropsis galbana* (Spania) og B58 *Phaeodactylum tricornutum* (Bergen) høyere innhold EPA i eksponentiell fase enn i stasjonær fase, resten oppnår høyest innhold i stasjonær fase.

Når vi sammenligner EPA innholdet i stasjonær fase med hensyn til temperatur har alle stammene unntatt B58 høyere EPA innhold per tørrvekt ved 10°C enn ved 15°C, selv om noen ligger nesten helt likt. *Entemoneis* stammene fra Bergen, M117, M122, M138 og M139, har mye høyere innhold EPA per tørrvekt ved 10°C enn ved 15°C. Grunnen til dette kan være at arter som lever under kalde omgivelser ofte har høyere innhold av umettede og kortkjedede fettsyrer. Dette hjelper cellemembranen til å opprettholde en halv-flytende tilstand slik at viktig transport over membranen kan fortsette. Flerumettede fettsyrer holder seg elastisk selv under veldig kalde omgivelser, i motsetning til monoumettede fettsyrer og mettede fettsyrer, som har en tendens til å stivne ved lave temperaturer (Madigan *et al.* 2015).

I et forsøk gjort av Van Wagenen *et al.* (2012) fant de at etterhvert som algekulturene ble tette og selvskyggende i den eksponentielle vekstfasen, minket EPA innholdet ved økende temperaturer. Det totale fettsyreinholdet hos kulturene i eksponentiell fase var omtrent omvendt proporsjonal med vekstraten. Dette kan tyde på at hurtigere voksende kulturer bruker mer materiale til strukturelle komponenter, og ikke akkumulerer lipider like fort. Det betyr videre at veksthastighet, samt temperatur, kan bestemme fettsyreinhold. De

fant også at prosentandelen eikosapentaensyre (EPA) økte på bekostning av palmitinsyre etter hvert som lyset ble redusert, eller når kulturtettheten økte og dermed skygget for seg selv. I tillegg kan det se ut som, ifølge Brown *et al.* (1996), at en lavere lysstyrke (100 $\mu\text{mol fotoner m}^{-2} \text{s}^{-1}$) med en døgnlig lys/mørke syklus på 12 timer lys og 12 timer mørke kan øke innholdet av PUFA og minke innholdet av mettede og monoumettede fettsyrer.

Dette kan være en av grunnene til at mine stammer (med noen unntak) har akkumulering av fettsyrer ved stasjonærfase. De er da blitt tettere og selvskyggende, noe som fører til at lysintensiteten hver celle mottar minker. Som vi ser har også lysintensiteten, i tillegg til temperatur, mye å si både for vekst og fettsyresammensetningen hos alger. Hu *et al.* (2008) fant at svakt lys, med noen få unntak, favoriserer dannelsen av PUFA og at høy lysintensitet er med på å produsere flere av de mettede og monoumettede fettsyrene som hovedsakelig utgjør nøytrale lipider. Dette kan tyde på at mine stammer kan oppnå enda høyere innhold av EPA ved å minke lysstyrken ytterligere, i tillegg til å ha en døgnlig lys/mørke syklus på 12 timer lys og 12 timer mørke. Det vi ikke vet da er hvordan dette vil slå ut på veksthastigheten og biomassen. En mulighet kan derfor være å minke lyset etter kulturene er kommet i stasjonær fase.

Det er ved flere anledninger påvist at mikroalger øker innholdet av essensielle fettsyrer under næringsbegrensninger og stressforhold, hvor nitrogenbegrensning ser ut til å påvirke lipidmetabolismen i alger mest. En generell trend er opphopning av lipider, spesielt TAG, som respons på nitrogenmangel (McGinnis *et al.* 1997; Fidalgo *et al.* 1998; Hu *et al.* 2008; Chen *et al.* 2011; Bondioli *et al.* 2012). Fosfat er også et viktig næringsstoff, og forsøk er gjort som viser at fosfatbegrensning mest sannsynlig begrenser syntesen av PUFA (Reitan *et al.* 1994), noe som tyder på at fosfat er viktig å ha i større mengder om man ønsker å optimalisere innholdet av blant annet EPA. Hos diatomeer er også silisium et viktig næringsstoff som er kjent for å begrense veksten ved manglende tilførsel (Graham *et al.* 2016). Det kan se ut som de optimale næringsforholdene for å øke PUFA syntesen vil være å minke nitrogentilførsel (nitrogensult), i tillegg til å sørge for rikelig fosfattilførsel. Det er forsket lite på om silikat har noe innvirkning på PUFA syntesen, men det vi vet er at dette kan være med å begrense veksten hos de fleste diatomeene, og vil derfor være viktig å ha i større grad om man ønsker optimal vekst. Så i tillegg til forandringer i temperaturer spiller også de andre miljøforholdene, som lys og næringsstoffer en viktig rolle i veksten og EPA produksjonen hos mikroalger. Man må finne ut hvordan man best kan kombinere disse

faktorene gjennom vekstsyklusen for å oppnå ønsket resultat. En stor utfordring i videre studier blir her å finne de optimale kombinasjoner med hensyn til: lys kvalitet (spektral sammensetning) og intensitet; konsentrasjon av nitrogen, fosfor og silisium; og temperatur nivå.

Når vi ser på innholdet av karotenoider hos de forskjellige stammene (Figur 34) ser vi at det ligger på mellom 0,59 og 12,18 mg/g DW, dette tilsvarer 0,059 – 1,22 % av tørrvekten til algene, noe som ifølge (Auran *et al.* 1999) er innenfor det som er normalt for mikroalger. De har funnet at karotenoidene vanligvis utgjør mellom 0,1 og 2 % av tørrvekten, men under spesielle vekstbetingelser kan de nå så høye verdier som 14 % av tørrvekten. Ahmed *et al.* (2014) fant i et forsøk, hvor de undersøkte 12 forskjellige stammer, at de 4 mest lovende stammene hadde karotenoidinnhold på 4,68-6,88 mg/g tørrvekt. Dette er lavere enn hva jeg fant hos mine mest lovende kandidater med hensyn til karotenoider. I eksponentiell fase hos stammene dyrket ved 10°C ligger karotenoid innholdet på 2,60 – 11,47 mg/g DW, mens ved 15°C ligger det på 3,22 – 12,18 mg/g DW, dette viser at innholdet er litt høyere ved 15°C enn ved 10°C. I stasjonær fase ser vi at innholdet ligger på 1,11 – 11,86 mg/g DW ved 10°C, mens ved 15°C ligger de på 0,59 – 5,36 mg/g DW, dette viser at innholdet er mye høyere ved 10°C enn ved 15°C i stasjonær fase. Det er hovedsakelig M88, M117 og M139 som har verdier som skiller seg litt ut fra resten, hvor M88 har høyt innhold av karotenoider i eksponentiell fase ved 15°C, M117 har høyt innhold både i eksponentiell fase og stasjonær fase dyrket ved 10°C, og M139 har høyt innhold i stasjonær fase dyrket ved 10°C. Men selv om disse skiller seg litt fra resten av stammene jeg undersøkte, er det likevel ganske lave verdier i forhold til hva som er optimalt om man ønsker å dyrke alger videre for å utvinne karotenoidene.

Når vi ser på klorofyll *a* mengden (Figur 33) ser vi mye av de samme resultatene, hvor M88 har mye høyere innhold i eksponentiell fase ved 15°C (42,2 mg/g DW), og M117 har høyere innhold klorofyll *a* i eksponentiell fase ved 10°C. Generelt har stammene fra Spania, som oppnår høy tetthet i kulturene, veldig lave innhold av både klorofyll *a* og karotenoider i stasjonær fase målt som mg/g DW. Dette er motsatt av hva jeg hadde forventet å finne, siden alger ofte øker innholdet av klorofyll for å kompensere for mindre lys når kulturene blir selvskyggende (Naustvoll & Dahl 2002). Totalt klorofyll per liter er nok likevel høyere i denne fasen på grunn av at det er mye høyere biomasse tetthet her enn i eksponentiell fase.

5. Konklusjon:

Det er gjennom tidene forsket mye på mikroalger i forhold til fettsyrer og fettsyresammensetning, og de mest kjente artene på bakgrunn av deres høye innhold av flerumettede fettsyrer er *Phaeodactylum tricornutum* (Fremming 2014), *Nannochloropsis* sp. (Dunstan *et al.* 1993; Sukenik *et al.* 1993; Graham *et al.* 2016) og *Isochrysis* sp. (Sukenik & Wahnon 1991; Dunstan *et al.* 1993; Fidalgo *et al.* 1998; Graham *et al.* 2016).

Mikroalger har blitt dyrket under mange forskjellige forhold, hovedsakelig for å prøve å optimalisere EPA innholdet. De er blitt dyrket under varierte temperaturer (James *et al.* 1989; Zhu *et al.* 1997; Hu & Gao 2006), forskjellig lysstyrke (Sukenik *et al.* 1989; Van Wagenen *et al.* 2012) og ved forskjellige næringsforhold (McGinnis *et al.* 1997; Hu *et al.* 2008; Bondioli *et al.* 2012). I denne oppgaven har jeg studert vekst og EPA innhold ved 10°C og 15°C.

Blant mine 15 stammer er det B59 (*Craspedostauros britanicus*) ved 15°C som kommer ut som den kandidaten med høyest % EPA per TFA (Tabell 3, Figur 35), men siden denne stammen vokste veldig ujevnt og ikke har noe tørrvekt man kan sammenligne med, er det vanskelig å komme med en konklusjon. EPA innholdet var på hele 30,2 % EPA av TFA, så jeg tror det er trygt å si at dette er verd å studere videre. Kanskje B59 kommer til å bli en fremtidig kandidat til fiskefôr.

Siden det hovedsakelig er stammer som både oppnår høy prosent EPA av DW og en høy veksthastighet som er interessante, ser vi at det er diatomeen *Entomoneis* sp. fra Store Lungegårdsvann som kommer best ut både ved 10°C og 15°C (Tabell 3).

Entomoneis sp. oppnådde høyere enn 4 % EPA av tørrvekt ved begge temperaturene, i tillegg til en vekstrate på over 0,7 d⁻¹ hos alle stammene. Ved 15°C oppnår også M88 (*Thalassiosira hispida*) fra Svalbard kriteriene, men *Entomoneis* sp. har enda bedre resultater. Det er stammene M122 og M138 (*Entomoneis* sp.) som totalt sett oppnår de aller beste resultatene, begge med en veksthastighet på 0,9 d⁻¹, og en EPA henholdsvis 9,9 % og 9,3 % av DW. De oppnår også 19,8 % (M122) og 19,7 % (M138) EPA av TFA (stasjonær fase). Dette er veldig interessante resultater, spesielt siden dette er en art som er veldig lite forsket på, og som nå kanskje kan komme til anvendelse som fôr til marine dyr. Selv om det er lurt å

forske mer på arter som allerede er gode kandidater kan det likevel lønne seg å se etter nye lovende kandidater, for plutselig dukker det opp nye lovende arter slik som *Entomoneis* sp.

Tabell 3: Oversikt over alle stammene dyrket ved 10°C og 15°C. Viser veksthastigheten, % EPA per DW og % EPA per TFA både i eksponentiell og stasjonær fase. Fet grønn skrift viser de parameterene som er høyere enn grenseverdien. Stammer merket med lyseblått er stammer som oppnår både høy veksthastighet, i tillegg til høyt innhold EPA per DW. B59 ved 15°C er merket med gult på grunn av høy % EPA per TFA.

Temp.	Stamme	Eksponentiell fase			Stasjonær fase	
		Veksthastighet	EPA Innhold		EPA Innhold	
			% av TFA	% av DW	% av TFA	% av DW
10	M24	0,3	19,6 ± 0,3	1,5 ± 0,1	8,8 ± 0,5	3,0 ± 0,4
10	M78	0,4	19,9 ± 0,7	3,1 ± 0,5	11,9 ± 1,1	4,8 ± 0,3
10	M88	0,3	16,2 ± 0,3	3,4 ± 0,1	11,0 ± 0,5	5,3 ± 0,2
10	M97	0,4	22,7 ± 0,8	2,2 ± 0,1	9,4 ± 0,3	4,1 ± 0,4
10	M107	0,3	20,9 ± 0,4	2,3 ± 0,1	10,7 ± 0,1	3,7 ± 0,2
10	M117	0,8	19,0 ± 0,2	4,5 ± 0,2	21,6 ± 0,1	6,7 ± 0,4
10	M122	0,9	18,7 ± 0,3	2,1 ± 0,1	19,8 ± 0,1	9,9 ± 0,6
10	M138	0,9	18,9 ± 0,2	2,5 ± 0,6	19,7 ± 0,2	9,3 ± 0,3
10	M139	0,7	15,3 ± 0,3	2,3 ± 0,1	25,3 ± 0,3	7,8 ± 0,2
10	<i>Isochrysis</i>	0,4	12,3 ± 0,2	2,7 ± 0,3	6,1 ± 0,0	3,8 ± 0,1
10	<i>Nannochloropsis</i>	0,5	7,9 ± 0,2	3,6 ± 0,1	10,1 ± 0,2	4,1 ± 0,2
10	<i>P.tricornutum</i>	0,5	18,3 ± 1,0	2,4 ± 0,1	5,6 ± 0,0	3,4 ± 0,2
10	B58	0,5	16,6 ± 0,1	2,0 ± 0,1	4,8 ± 0,0	2,6 ± 0,1
10	B59	-	20,4 ± 4,3	-	14,8 ± 0,7	-
10	<i>C.australis</i>	-	12,6 ± 2,4	-	11,5 ± 1,4	-
15	M24	Døde				
15	M78	-	10,1 ± 1,5	-	11,4 ± 0,7	-
15	M88	0,7	19,2 ± 0,3	6,7 ± 1,4	14,8 ± 0,8	5,0 ± 0,4
15	M97	0,4	19,8 ± 0,3	2,1 ± 0,1	11,7 ± 0,5	3,5 ± 0,1
15	M107	Døde				
15	M117	0,8	17,5 ± 0,2	2,4 ± 0,4	15,6 ± 0,2	5,9 ± 0,4
15	M122	0,7	20,3 ± 0,4	3,5 ± 0,3	14,8 ± 0,3	5,3 ± 0,2
15	M138	0,8	21,4 ± 0,6	3,5 ± 0,4	15,3 ± 0,2	6,6 ± 0,1
15	M139	0,8	18,0 ± 0,5	2,0 ± 0,3	15,1 ± 0,2	5,9 ± 0,5
15	<i>Isochrysis</i>	0,9	18,7 ± 0,3	3,0 ± 0,2	6,3 ± 0,4	3,7 ± 0,1
15	<i>Nannochloropsis</i>	0,3	10,0 ± 0,2	4,7 ± 0,2	3,8 ± 0,2	1,5 ± 0,2
15	<i>P.tricornutum</i>	0,9	18,6 ± 0,7	2,8 ± 0,2	6,0 ± 0,1	3,5 ± 0,1
15	B58	0,8	17,4 ± 0,3	3,4 ± 0,6	4,7 ± 0,0	3,0 ± 0,1
15	B59	-	30,2 ± 0,3	-	11,8 ± 2,3	-
15	<i>C.australis</i>	-	14,1 ± 1,6	-	11,9 ± 0,6	-

Videre arbeid:

Jeg skulle ønske jeg hadde hatt mer tid, for det er mange flere forhold jeg gjerne ville testet ut, men jeg må nok overlate til noen andre å forske videre på dette.

Jeg vil dermed anbefale å dyrke «vinner kandidatene» M122 og M138 (*Entomoneis* sp.) på nytt og gjennomføre et faktorforsøk. Da ville jeg prøvd å dyrke dem på enda flere forskjellige temperaturer, og gjerne noen på kaldere enn 10°C. I tillegg ville jeg justert lysstyrken og prøvd både med svakere og sterkere lys, samt døgnsykluser med 12 timer lys og 12 timer mørke. Det siste parametere jeg ville forandret på er næring, her hovedsakelig silikat, hvor jeg ville tilsatt forskjellig mengde for å finne ut om det er dette som begrenser veksten hos disse diatomeene, og for å se om det ellers har noen effekt på EPA innholdet. I tillegg må det gjennomføres grundigere artsbestemmelse på denne arten, siden 90 % likhet ikke er veldig sikkert.

Jeg vil også anbefale å dyrke B59 (*Craspedostauros britanicus*) på nytt ved 15°C, hvor prosenten av EPA per TFA var veldig høy. Man må da få målt tørrvekten nøyaktig selv om den vokser i form av aggregater. En måte å gjøre dette på er å ta mange (f.eks. 20) replikaer istedenfor bare 3, dette vil gi et mer presist resultat.

Referanser:

- Aarli, G. (2013). Klima i Spania. Store norske leksikon. Tilgjengelig ved:
http://snl.no/Klima_i_Spania [vist 28 April 2017]
- Aarnes, H. (2011). Fett (Lipider) - Institutt for biovitenskap. Tilgjengelig ved:
<http://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/plfys/biokjemi/fett.html#syntese> [vist 9 February 2016]
- Ahmed, F., Fanning, K., Netzel, M., Turner, W., Li, Y., & Schenk, P. M. (2014). Profiling of carotenoids and antioxidant capacity of microalgae from subtropical coastal and brackish waters. *Food Chemistry* 165, 300–306. doi:10.1016/j.foodchem.2014.05.107
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). The Lipid Bilayer. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26871/> [accessed 10 April 2017]
- Arrigo, K. R., Perovich, D. K., Pickart, R. S., Brown, Z. W., van Dijken, G. L., Lowry, K. E., Mills, M. M., Palmer, M. A., Balch, W. M., Bates, N. R., Benitez-Nelson, C. R., Brownlee, E., Frey, K. E., Laney, S. R., Mathis, J., Matsuoka, A., Greg Mitchell, B., Moore, G. W. K., Reynolds, R. A., Sosik, H. M., & Swift, J. H. (2014). Phytoplankton blooms beneath the sea ice in the Chukchi sea. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 105, 1–16. doi:10.1016/j.dsr2.2014.03.018
- Auran, T., Källqvist, T., Langstrand, H., Skulberg, O., & Sterten, H. (1999). Algekulturateknologi til bruk i fremstilling av fôrkomponenter. NIVA 4156-99. Tilgjengelig ved:
https://brage.bibsys.no/xmlui/bitstream/handle/11250/210670/4156_200dpi.pdf?sequence=2 [vist 18 May 2017]
- Bondioli, P., Della Bella, L., Rivolta, G., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Rodolfi, L., Casini, D., Prussi, M., Chiamonti, D., & Tredici, M. R. (2012). Oil production by the marine microalgae *Nannochloropsis* sp. F&M-M24 and *Tetraselmis suecica* F&M-M33. *Bioresource Technology* 114, 567–572. doi:10.1016/j.biortech.2012.02.123
- Bozeman Science (2012). 'r and K selection'. Available at:
<https://www.youtube.com/watch?v=Bu6ouKt9zhs> [accessed 3 May 2017]
- Brown, M. R., Dunstan, G. A., Norwood, S. J., & Miller, K. A. (1996). Effects of Harvest Stage and Light on the Biochemical Composition of the Diatom *Thalassiosira Pseudonana* 1. *Journal of Phycology* 32, 64–73. doi:10.1111/j.0022-3646.1996.00064.x
- Calviello, G., & Serini, S. (Eds.) (2010). 'Dietary Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Cancer'. (Springer Netherlands: Dordrecht.) Available at:
<http://link.springer.com/10.1007/978-90-481-3579-0> [accessed 9 February 2016]

- Chen, M., Tang, H., Ma, H., Holland, T. C., Ng, K. Y. S., & Salley, S. O. (2011). Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology* 102, 1649–1655. doi:10.1016/j.biortech.2010.09.062
- Cooper, G. M. (2000). 'The Cell' 2nd ed. (Sinauer Associates.)
- Dunstan, G. A., Volkman, J. K., Barrett, S. M., & Garland, C. D. (1993). Changes in the lipid composition and maximisation of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture. *Journal of Applied Phycology* 5, 71–83. doi:10.1007/BF02182424
- Edwards, M., Johns, D. G., Leterme, S. C., Svendsen, E., & Richardson, A. J. (2006). Regional climate change and harmful algal blooms in the northeast Atlantic. Available at: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=AV2012096604> [accessed 18 April 2017]
- Elvevoll, D. E. O., Eilertsen, H. C., & Andersen, J. H. (2014). Massedyrking av store arktiske mikroalger og CO₂ fangst - fra fossil til ferskvare. Tilgjengelig ved: [http://klimamarin.no/wp-content/uploads/2014/04/Klimamarin-2014-EO-Elvevoll-Mikroalger-CO₂-fangst.pdf](http://klimamarin.no/wp-content/uploads/2014/04/Klimamarin-2014-EO-Elvevoll-Mikroalger-CO2-fangst.pdf)
- Eriksen, S. A. (2012). Lipidklasser og fettsyresammensetning i omega-3 produkter. Universitetet i Tromsø. Tilgjengelig ved: <http://munin.uit.no/bitstream/handle/10037/4325/thesis.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- Erlandsen, M., Voje, M., & Stene, K. O. (2017). Tilførsel fra jordbruk. Miljøstatus.no. Tilgjengelig ved: <http://www.miljostatus.no/tema/hav-og-kyst/overgjodsling/tilforsel-fra-jordbruk/> [vist 25 May 2017]
- Fernández-Méndez, M., Wenzhöfer, F., Peeken, I., Sørensen, H. L., Glud, R. N., & Boetius, A. (2014). Composition, Buoyancy Regulation and Fate of Ice Algal Aggregates in the Central Arctic Ocean. *PLOS ONE* 9, e107452. doi:10.1371/journal.pone.0107452
- Fidalgo, J. P., Cid, A., Torres, E., Sukenik, A., & Herrero, C. (1998). Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. *Aquaculture* 166, 105–116. doi:10.1016/S0044-8486(98)00278-6
- Fossen, C. (2014). Marine fatty acids and cancer - LBK. Available at: <http://www.ntnu.edu/lbk/marine-fatty-acids-and-cancer> [accessed 9 February 2016]
- Fremming, E. (2014). Fettsyreprofiler hos diatomeer isolert fra norskekysten, med vekt på produksjon av langkjedede ω₃-fettsyrer. Universitetet i Bergen.
- Friocourt, Y. F., Skogen, M., Stolte, W., & Albretsen, J. (2012). Marine downscaling of a future climate scenario in the North Sea and possible effects on dinoflagellate harmful algal blooms. *Food Additives & Contaminants: Part A* 29, 1630–1646. doi:10.1080/19440049.2012.714079

- Frøyland, L., Bentsen, H., Graff, I. E., Myhrstad, M., Paulsen, J. E., Retterstøl, K., & Ulven, S. M. (2011). Evaluation of negative and positive health effects of n - 3 fatty acids as constituents of food supplements and fortified foods. Norwegian Scientific Committee for Food Safety (VKM) 2011 , ISBN: 978 - 82 - 8259 - 035 - 8.
- Glibert, P., Anderson, D., Gentien, P., Granéli, E., & Sellner, K. (2005). The Global, Complex Phenomena of Harmful Algal Blooms. *Oceanography* 18, 136–147. doi:10.5670/oceanog.2005.49
- Graham, L. E., Graham, J. M., & Wilcox, L. W. (2009). 'Algae' second edition.
- Graham, L. E., Graham, J. M., Wilcox, L. W., & Cook, M. E. (2016). 'Algae' Third Edition.
- Hallegraeff, G. M. (2010). Ocean Climate Change, Phytoplankton Community Responses, and Harmful Algal Blooms: A Formidable Predictive Challenge1. *Journal of Phycology* 46, 220–235. doi:10.1111/j.1529-8817.2010.00815.x
- Hanssen, T. (2009). Verdens kaldeste vann på Svalbard. adressa.no. Tilgjengelig ved: <http://www.adressa.no/vaeret/klima/article1280439.ece> [vist 27 April 2017]
- Haugan, I. (2013). En munnfull alger i stedet for en skje tran. Gemini.no. Tilgjengelig ved: <http://gemini.no/2013/06/en-munnfull-alger-i-stedet-for-en-skje-tran/> [vist 2 February 2016]
- Hedelin, M., Chang, E. T., Wiklund, F., Bellocco, R., Klint, Å., Adolfsson, J., Shahedi, K., Xu, J., Adami, H.-O., Grönberg, H., & Bälter, K. A. (2007). Association of frequent consumption of fatty fish with prostate cancer risk is modified by COX-2 polymorphism. *International Journal of Cancer* 120, 398–405. doi:10.1002/ijc.22319
- Hu, H., & Gao, K. (2006). Response of Growth and Fatty Acid Compositions of *Nannochloropsis* sp. to Environmental Factors Under Elevated CO₂ Concentration. *Biotechnology Letters* 28, 987–992. doi:10.1007/s10529-006-9026-6
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., & Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal* 54, 621–639. doi:10.1111/j.1365-3113X.2008.03492.x
- James, C. M., Al-Hinty, S., & Salman, A. E. (1989). Growth and ω₃ fatty acid and amino acid composition of microalgae under different temperature regimes. *Aquaculture* 77, 337–351. doi:10.1016/0044-8486(89)90218-4
- Jiang, H., & Gao, K. (2004). Effects of Lowering Temperature During Culture on the Production of Polyunsaturated Fatty Acids in the Marine Diatom *Phaeodactylum Tricornutum* (bacillariophyceae)1. *Journal of Phycology* 40, 651–654. doi:10.1111/j.1529-8817.2004.03112.x
- Johnson, E. J. (2002). The role of carotenoids in human health. *Nutrition in Clinical Care: An Official Publication of Tufts University* 5, 56–65.

- Klais, R., Tamminen, T., Kremp, A., Spilling, K., & Olli, K. (2011). Decadal-Scale Changes of Dinoflagellates and Diatoms in the Anomalous Baltic Sea Spring Bloom. *PLOS ONE* 6, e21567. doi:10.1371/journal.pone.0021567
- Klingenberg, O. (2012). Spektrofotometri. Tilgjengelig ved: <http://legeforeningen.no/PageFiles/107473/Klingenberg%20Spektrofotometri.pdf> [vist 8 February 2017]
- Lande, B. (2009). Fettsyrer. Store medisinske leksikon. Tilgjengelig ved: <http://sml.snl.no/fettsyrer> [vist 28 January 2016]
- Lee, K., Eisterhold, M. L., Rindi, F., Palanisami, S., & Nam, P. K. (2014). Isolation and screening of microalgae from natural habitats in the midwestern United States of America for biomass and biodiesel sources. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine* 5, 333. doi:10.4103/0976-9668.136178
- Lunn, J., & Theobald, H. E. (2006). The health effects of dietary unsaturated fatty acids. *Nutrition Bulletin* 31, 178–224. doi:10.1111/j.1467-3010.2006.00571.x
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2015). 'Brock biology of microorganisms' 14th ed., Global ed. (Pearson.)
- Maisch, B., & Oelze, R. (2007). 'Cardiovascular Benefits of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids'. (IOS Press: Amsterdam, NLD.) Available at: <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10167405> [accessed 3 February 2016]
- Maxwell, K., & Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51, 659–668. doi:10.1093/jexbot/51.345.659
- McGinnis, K. M., Dempster, T. A., & Sommerfeld, M. R. (1997). Characterization of the growth and lipid content of the diatom *Chaetoceros muelleri*. *Journal of Applied Phycology* 9, 19–24. doi:10.1023/A:1007972214462
- Medlin, L. K., & Cembella, A. D. (2013). Biodiversity of Harmful Marine Algae A2 - Levin, Simon A. In 'Encyclopedia of Biodiversity (Second Edition)'. pp. 470–484. (Academic Press: Waltham.) Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123847195004044> [accessed 4 May 2016]
- Meier, S., Mjøs, S. A., Joensen, H., & Grahl-Nielsen, O. (2006). Validation of a one-step extraction/methylation method for determination of fatty acids and cholesterol in marine tissues. *Journal of Chromatography. A* 1104, 291–298. doi:10.1016/j.chroma.2005.11.045
- Meteodb.com (2017). Cadiz — vær Mai, vanntemperatur. Tilgjengelig ved: <http://meteodb.com/no/spain/cadiz/may> [vist 28 April 2017]

- Nakrem, H. A., & Manum, S. B. (2009). Plantenes utviklingshistorie - Naturhistorisk museum. Tilgjengelig ved:
<https://www.nhm.uio.no/fakta/geologi/fossiler/faktablader/blad43.htm> [vist 8 April 2016]
- Naustvoll, L. J. (2014). Kiselalger - en nøkkelorganisme i marine økosystemer. Havforskningsrapporten. Tilgjengelig ved:
https://www.imr.no/filarkiv/2014/03/kiselalger_en_nokkelorganisme_i_marine_oko_systemer.pdf/nb-no [vist 19 May 2017]
- Olsvik, P. A., Lie, K. K., Goksøy, A., Midtun, T., Frantzen, S., & Maage, A. (2009). Are Atlantic Cod in Store Lungegårdsvann, a Seawater Recipient in Bergen, Affected by Environmental Contaminants? A qRT-PCR Survey. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 72, 140–154. doi:10.1080/15287390802538956
- Patil, V., Källqvist, T., Olsen, E., Vogt, G., & Gislerød, H. R. (2007). Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquaculture International* 15, 1–9. doi:10.1007/s10499-006-9060-3
- Raven, J. A., & Waite, A. M. (2004). The evolution of silicification in diatoms: inescapable sinking and sinking as escape? *New Phytologist* 162, 45–61. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01022.x
- Reitan, K. I., Rainuzzo, J. R., & Olsen, Y. (1994). Effect of Nutrient Limitation on Fatty Acid and Lipid Content of Marine Microalgae1. *Journal of Phycology* 30, 972–979. doi:10.1111/j.0022-3646.1994.00972.x
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., & Tredici, M. R. (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 102, 100–112. doi:10.1002/bit.22033
- Ruxton, C. H. S., Reed, S. C., Simpson, M. J. A., & Millington, K. J. (2004). The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *Journal of Human Nutrition and Dietetics: The Official Journal of the British Dietetic Association* 17, 449–459. doi:10.1111/j.1365-277X.2004.00552.x
- Sciotto, C., & Mjøs, S. A. (2012). Trans Isomers of EPA and DHA in Omega-3 Products on the European Market. *Lipids* 47, 659–667. doi:10.1007/s11745-012-3672-3
- Steinrücken, P. (2014). PhD Project description, Impact of environmental conditions on the fatty acid and carotenoid composition in Norwegian microalgae.
- Sukenik, A., Carmeli, Y., & Berner, T. (1989). Regulation of Fatty Acid Composition by Irradiance Level in the Eustigmatophyte *Nannochloropsis* Sp.1. *Journal of Phycology* 25, 686–692. doi:10.1111/j.0022-3646.1989.00686.x

- Sukenik, A., & Wahnou, R. (1991). Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. I. *Isochrysis galbana*. *Aquaculture* 97, 61–72. doi:10.1016/0044-8486(91)90279-G
- Sukenik, A., Zmora, O., & Carmeli, Y. (1993). Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. II. *Nannochloropsis* sp. *Aquaculture* 117, 313–326. doi:10.1016/0044-8486(93)90328-V
- Szalay, J. (2015). What Are Carotenoids? *Live Science*. Available at: <http://www.livescience.com/52487-carotenoids.html> [accessed 10 April 2017]
- Tebbani, S., Filali, R., & Lopes, F. (2014). 'FOCUS Series : CO2 Biofixation by Microalgae : Automation Process'. (Wiley: Somerset, NJ, USA.) Available at: <http://site.ebrary.com/lib/bergen/docDetail.action?docID=10892213>
- Thronsdén, J. (2015). alger. Store norske leksikon. Tilgjengelig ved: <http://snl.no/alger> [vist 8 February 2016]
- Van Wagenen, J., Miller, T. W., Hobbs, S., Hook, P., Crowe, B., & Huesemann, M. (2012). Effects of Light and Temperature on Fatty Acid Production in *Nannochloropsis Salina*. *Energies* 5, 731–740. doi:10.3390/en5030731
- Walne, P. R. (1970). Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria* and *Mytilus*.
- Wasta, Z., & Mjøs, S. A. (2013). A database of chromatographic properties and mass spectra of fatty acid methyl esters from omega-3 products. *Journal of Chromatography A* 1299, 94–102. doi:10.1016/j.chroma.2013.05.056
- Winther, J. G., Haug, T. E., & Nilsen, S. Ø. (2016). Svalbard. Norsk Polarinstitutt. Tilgjengelig ved: <http://www.npolar.no/no/arktis/svalbard/> [vist 18 May 2017]
- Zhu, C. J., & Lee, Y. K. (1997). 'Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*'.
- Zhu, C. J., Lee, Y. K., & Chao, T. M. (1997). Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1. *Journal of Applied Phycology* 9, 451–457. doi:10.1023/A:1007973319348

Appendiks 1:

Walne's medium:

Tabell A1: Oversikt over innholdet i Walne's mediumet, og en kort beskrivelse av hvordan de forskjellige stamløsningene lages.

<u>Walne's medium:</u>	
-	<u>Stamløsning A:</u>
○	12,5 g Na ₂ EDTA.2H ₂ O – Triplex
○	8,4 g H ₃ BO ₃
○	3,89 g NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O [4,4 g NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O]
○	0,09 g MnCl ₂ .4H ₂ O
○	0,54 g FeCl ₃ .6H ₂ O
○	25 g NaNO ₃
	▪ DH ₂ O up to 250 mL and autoclave
-	<u>Stamløsning B:</u>
○	1,05 g ZnCl ₂
○	1,00 g CoCl ₂ .6H ₂ O
○	0,45 g (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O
○	1,00 g CuSO ₄ .5H ₂ O
	▪ DH ₂ O up to 50 mL and acidify with a few drops of concentrated HCl to give a clear solution (before acidification the solution is very cloudy). Dilute 1:1000 (with DH ₂ O) to finish trace element stock solution and autoclave.

- <u>Silikat stamløsning:</u>
○ 2,99 g Na ₂ SiO ₃ ·5H ₂ O [4 g Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O]
▪ DH ₂ O up to 100 mL and autoclave
- <u>Vitamin stamløsning:</u>
○ 100 mg B ₁ – thiamine HCl
○ 5 mg B ₁₂ – cyanocobolamin
○ 5 mg Vitamin H – Biotin
▪ DH ₂ O up to 100 mL. NB! Must be filter sterilized -> Aliquotes in freezer (e.g. 10 mL)

Tørrvekt data:

Tabell A2: Oversikt over filtervekten (mg) før og etter filtrering av biomasse. Tabellen viser 3 parallelle filtreringer per dyrkingsrør, og 2 parallelle dyrkingsrør per stammene (til sammen 6 parallelle per stamme) dyrket ved 10°C. Dette er resultatene som ble brukt til å regne ut gjennomsnittlig tørrvekt per stamme.

Start				EXP				STAT						
ID	t	Nr.	blank (mg)	BM (mg)	ID	t	Nr.	blank (mg)	BM (mg)	ID	t	Nr.	blank (mg)	BM (mg)
M24	1	a	135,403	136,774	M24	1	a	132,379	133,127	M24	1	a	132,784	134,386
		b	134,055	134,157			b	134,516	135,26			b	133,787	134,299
		c	134,368	134,352			c	134,157	134,844			c	135,04	135,543
M78	3	a	134,866	134,797	M24	2	a	134,151	135,215	M24	2	a	134,933	135,607
		b	134,319	134,319			b	134,535	135,614			b	132,75	133,389
		c	133,695	133,609			c	134,679	135,764			c	132,714	133,308
M88	5	a	135,382	135,341	M78	3	a			M78	3	a	132,609	134,105
		b	132,901	132,861			b	133,325	133,723			b	133,77	134,406
		c	134,754	134,679			c	134,521	134,828			c	133,386	133,955
M97	7	a	134,024	133,898	M78	4	a	133,924	134,966	M78	4	a	133,013	133,711
		b	133,561	133,482			b	134,54	135,523			b	134,104	134,791
		c	134,286	134,228			c	134,825	135,883			c	134,786	135,389
M107	9	a	133,439	133,344	M88	5	a	133,121	133,797	M88	5	a	133,585	134,129
		b	134,143	134,073			b	134,397	134,995			b	134,772	135,312
		c	134,571	134,491			c	132,703	133,26			c	133,589	134,093
M117	11	a	94,534	95,293	M88	6	a	134,811	135,54	M88	6	a	134,241	134,755
		b	92,55	92,722			b	134,864	135,566			b	132,696	133,203
		c	93,496	93,62			c	133,541	134,201			c	133,49	134,018
M122	15	a	134,426	134,412	M97	7	a	133,724	134,382	M97	7	a		
		b	133,937	133,76			b	133,843	134,62			b	132,077	132,677
		c	134,545	134,445			c	133,041	133,763			c	134,916	135,44
M138	17	a	134,961	134,892	M97	8	a	133,879	134,812	M97	8	a	133,237	134,405
		b	133,906	133,818			b	135,204	136,132			b	134,172	134,81
		c	135,966	136,002			c	132,468	133,367			c	134,223	134,791
M139	19	a	135,146	135,616	M107	9	a	135,006	135,959	M107	9	a	133,298	133,803
		b	133,948	133,951			b	134,439	135,269			b	133,656	134,13
		c	133,462	133,508			c	135,225	136,063			c	133,877	134,381
Isochrysis	21	a	128,773	128,882	M107	10	a	135,585	136,455	M107	10	a	134,174	134,672
		b	129,242	129,286			b	135,298	136,092			b	133,371	133,992
		c	127,016	127,135			c	132,636	133,464			c	134,209	134,794
Nannochlor	23	a	129,495	129,498	M117	11	a	134,152	134,303	M117	11	a	133,941	134,939
		b	127,069	127,078			b	133,299	133,497			b	133,387	134,398
		c	126,309	126,401			c	133,645	133,95			c	134,018	135,086
P.tricornutu	25	a	126,366	126,47	M117	12	a	131,686	131,887	M117	12	a	134,763	135,978
		b	129,197	129,366			b	132,974	133,143			b	131,896	133,022
		c	129,798	129,957			c	132,218	132,479			c	132,584	133,699
B58	27	a	129,056	129,193	M117	13	a	134,212	134,488	M117	13	a	134,542	135,707
		b	128,939	129,146			b	132,822	133,01			b	134,504	135,572
		c	130,21	130,438			c	134,605	134,851			c	133,133	134,145
					M122	14	a			M122	14	a	134,427	135,4
							b	135,043	135,482			b	132,561	133,494
							c	134,163	134,55			c	133,942	134,857
					M122	15	a	132,99	133,388	M122	15	a	134,135	135,15
							b	133,334	133,58			b	133,254	134,218
							c	135,036	135,358			c	132,76	133,677
					M138	16	a	134,569	134,919	M138	16	a	134,47	135,48
							b	133,301	133,582			b	134,438	135,395
							c	134,142	134,426			c	133,045	134,015
					M138	17	a	134,027	134,681	M138	17	a	133,519	134,545
							b	132,857	133,387			b	133,828	134,889
							c	132,888	133,47			c	133,123	134,11
					M139	18	a	135,048	135,311	M139	18	a	133,184	133,842
							b	135,126	135,367			b	135,094	135,81
							c	134,23	134,449			c	134,736	135,418
					M139	19	a	133,182	133,443	M139	19	a	133,303	133,983
							b	134,278	134,605			b	133,664	134,364
							c	134,206	134,442			c	133,155	133,833
					Isochrysis	20	a	129,117	129,498	Isochrysis	20	a	139,551	144,811
							b	129,388	129,794			b	140,452	145,615
							c	126,759	127,204			c	138,796	143,944
					Isochrysis	21	a	128,247	128,647	Isochrysis	21	a	140,128	145,371
							b	129,012	129,437			b	139,045	144,258
							c	128,451	129,089			c	138,906	144,065
					Nannochlor	22	a	127,1	127,474	Nannochlor	22	a	139,743	140,557
							b	128,623	128,998			b	140,214	140,967
							c	128,428	128,755			c	139,667	140,45
					Nannochlor	23	a	128,439	128,76	Nannochlor	23	a	139,772	140,431
							b	126,867	127,221			b	131,61	132,408
							c	128,208	128,581			c	138,622	139,352
					P.tricornutu	24	a	129,586	130,236	P.tricornutu	24	a	130,192	136,237
							b	127,463	128,146			b	139,693	145,567
							c	127,441	128,166			c	138,705	144,508
					P.tricornutu	25	a	131,148	131,837	P.tricornutu	25	a	138,183	144,368
							b	127,864	128,581			b	137,506	143,698
							c	129,758	130,624			c	137,204	143,316
					B58	26	a	125,354	126,102	B58	26	a	138,884	145,228
							b	129,169	129,873			b	139,209	145,554
							c	127,017	127,883			c	139,101	145,297
					B58	27	a	128,336	129,085	B58	27	a	139,192	145,371
							b	126,909	127,65			b	139,818	145,995
							c	126,258	127,046			c	140,4	146,538

Tabell A3: Oversikt over filtervekten (mg) før og etter filtrering av biomasse. Tabellen viser 3 parallelle filtreringer per dyrkingsrør, og 2 parallelle dyrkingsrør per stammene (til sammen 6 parallelle per stamme) dyrket ved 15°C. Dette er resultatene som ble brukt til å regne ut gjennomsnittlig tørrvekt per stamme.

Start				EXP				STAT						
ID	t	Nr.	blank (mg)	BM (mg)	ID	t	Nr.	blank (mg)	BM (mg)	Culture No	t	Nr.	blank (mg)	BM (mg)
M88	5	a	127,819	127,994	M88	5	a	126,888	127,061	M88	5	a	125,705	127,452
		b	127,53	127,808			b	127,371	127,457			b	125,895	127,791
		c	126,144	126,314			c	126,115	126,216			c	124,901	126,762
M97	7	a	128,312	128,533	M88	6	a	127,608	127,742	M88	6	a	125,61	128,814
		b	126,714	126,949			b	126,952	127,08			b	126,799	128,976
		c	127,897	128,194			c	126,924	127,119			c	127,536	129,659
M117	11	a	127,603	127,765	M97	7	a	127,524	128,3	M97	7	a	128,038	128,938
		b	126,05	126,243			b	128,476	129,243			b	127,405	128,242
		c	127,048	127,247			c	128,341	129,066			c	130,147	130,929
M122	15	a	126,927	127,123	M97	8	a	126,953	127,669	M97	8	a	124,824	125,714
		b	125,727	126,006			b	129,188	129,949			b	129,441	130,262
		c	126,43	126,703			c	129,005	129,673			c	127,79	128,613
M138	17	a	126,341	126,51	M117	11	a	128,309	129,201	M117	11	a	126,916	128,737
		b	127,675	127,975			b	127,153	128,125			b	127,763	129,567
		c	125,1	125,52			c	126,228	127,132			c	136,271	138,006
M139	19	a	124,587	124,763	M117	12	a	129,095	130,107	M117	12	a	139,71	141,625
		b	126,689	127,349			b	127,718	128,827			b	141,387	143,264
		c	126,38	126,752			c	128,475	129,738			c	138,554	140,433
Isochrysis	21	a	126,944	127,062	M122	14	a	127,891	128,297	M122	14	a	125,276	127,347
		b	125,318	125,471			b	126,679	127,126			b	126,082	128,328
		c	126,257	126,426			c	127	127,442			c	124,76	127,037
Nannochlo	23	a	124,866	124,938	M122	15	a	128,292	128,587	M122	15	a	125,243	127,439
		b	128,067	128,085			b	126,802	127,335			b	128,551	130,741
		c	127,65	127,815			c	125,594	126,085			c	127,824	130,046
P.tricornut	25	a	128,846	129,148	M138	16	a	124,825	125,315	M138	16	a	129,757	131,709
		b	128,396	128,7			b	126,066	126,703			b	129,481	131,404
		c	125,597	125,868			c	125,903	126,436			c	127,179	129,202
B58	26	a	126,342	126,487	M138	17	a	126,582	127,06	M138	17	a	127,91	130,318
		a	127,142	127,455			b	124,527	125,144			b	126,713	129,096
		b	125,998	126,385			c	125,409	125,979			c	126,944	129,363
					M139	18	a	134,497	135,005	M139	18	a	128,421	130,383
							b	133,282	134,011			b	125,918	127,803
							c	133,275	133,879			c	128,014	129,894
					M139	19	a	134,047	134,61	M139	19	a	127,651	129,675
							b	126,846	127,627			b	127,738	129,562
							c	127,578	128,29			c	127,215	129,028
					Isochrysis	20	a	126,645	127,137	Isochrysis	20	a	128,459	134,439
							b	126,138	126,777			b	129,943	135,824
							c	126,283	126,945			c	126,965	132,865
					Isochrysis	21	a	125,36	125,821	Isochrysis	21	a	128,379	133,864
							b	125,582	126,224			b	128,739	134,21
							c	126,966	127,538			c	129,649	135,124
					Nannochloro	22	a	126,492	126,674	Nannochlo	22	a	125,812	129,176
							b	124,553	124,759			b	129,284	132,58
							c	127,454	127,68			c	127,675	131,015
					Nannochloro	23	a	125,809	126,123	Nannochlo	23	a	129,496	133,11
							b	127,738	128,106			b	128,69	132,243
							c	126,769	127,1			c	129,888	133,439
					P.tricornutur	24	a	126,027	126,601	P.tricornut	24	a	127,802	134,065
							a	126,968	127,687			a	128,751	134,99
							b	126,622	127,297			b	126,749	132,989
					P.tricornutur	25	c	127,09	127,669	P.tricornut	25	c	128,202	134,358
							a	123,213	123,93			a	126,478	132,742
							b	127,849	128,534			b	129,463	135,603
					B58	26	c	126,159	126,489	B58	26	c	127,567	131,594
							a	125,038	125,392			a	128,146	132,127
							b	124,542	124,892			b	131,694	135,76
					B58	27	c	126,371	126,685	B58	27	c	130,425	134,401
							a	124,306	124,85			a	130,174	134,045
							b	125,171	125,56			b	128,5	132,389

OD750 data:

Tabell A4: Oversikt over OD750 målt ved spektrofotometer hver dag. To parallelle rør per stamme. Lysegrønn farge viser når de forskjellige stammene ble høstet i eksponentiell fase, mens mørkegrønn viser høsting i stasjonær fase. Stamme ID med blå farge illustrerer OD når stammene var dyrket ved 10°C, mens rød farge er dyrking ved 15°C.

	M24 10°C		M78 10°C		M88 10°C		M97 10°C		M107 10°C	
Dag	OD750 (1)	OD750 (2)	OD750 (1)	OD750 (2)	OD750 (1)	OD750 (2)	OD750 (1)	OD750 (2)	OD750 (1)	OD750 (2)
0	0,02	0,02	0,01	0,01	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
1	0,02	0,02	0,02	0,01	0,03	0,03	0,03	0,04	0,03	0,03
2	0,02	0,03	0,05	0,03	0,06	0,06	0,05	0,05	0,06	0,06
3	0,04	0,04	0,04	0,06	0,09	0,09	0,05	0,06	0,07	0,09
4	0,04	0,04	0,05	0,08	0,11	0,12	0,07	0,08	0,09	0,08
5	0,04	0,04	0,06	0,10	0,12	0,13	0,09	0,10	0,11	0,10
6	0,06	0,06	0,09	0,14	0,13	0,16	0,13	0,14	0,18	0,14
7	0,09	0,09	0,11	0,23	0,16	0,17	0,20	0,25	0,28	0,26
8	0,12	0,13	0,14	0,27	0,18	0,19	0,31	0,40	0,37	0,36
9	0,17	0,23	0,22	0,31	0,24	0,25	0,47	0,50	0,45	0,44
10	0,19	0,32	0,28	0,30	0,30	0,30	0,50	0,52	0,45	0,46
11	0,25	0,34	0,30	0,31	0,35	0,32	0,52	0,54	0,47	0,48
12	0,25	0,33	0,30	0,31	0,35	0,34	0,52	0,54	0,47	0,48
13	0,27	0,31	0,30	0,32	0,37	0,35	0,53	0,55	0,48	0,49
14	0,27	0,32	0,30	0,32	0,37	0,36				
15	0,26	0,31			0,38	0,37				

	M117 10°C		M122 10°C		M138 10°C		M139 10°C		Isochrysis 10°C	
Dag	OD750 (1)	OD750 (2)	OD750 (1)	OD750 (2)	OD750 (1)	OD750 (2)	OD750 (1)	OD750 (2)	OD750 (1)	OD750 (2)
0	0,05	0,04	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,06	0,06
1	0,06	0,05	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02	0,07	0,07
2	0,19	0,18	0,04	0,04	0,04	0,04	0,02	0,05	0,09	0,08
3	0,26	0,24	0,09	0,09	0,09	0,11	0,05	0,11	0,13	0,13
4	0,64	0,57	0,19	0,17	0,21	0,25	0,10	0,11	0,20	0,21
5	0,70	0,67	0,45	0,37	0,44	0,48	0,23	0,27	0,36	0,37
6	-	-	0,49	0,48	0,51	0,50	0,44	0,44	0,54	0,58
7	0,80	0,71	0,50	0,50	0,51	0,52	0,46	0,46	0,88	1,00
8	0,76	0,77	0,50	0,50	0,52	0,53	0,48	0,45	1,33	1,37
9	0,98	0,84	0,69	0,63	0,60	0,64	0,57	0,56	1,56	1,59
10			0,88	0,80	0,63	0,80	0,57	0,54	1,85	1,85
11			1,08	1,04	0,94	0,99	0,62	0,59	2,26	2,19
12			1,15	1,12	1,04	1,04			2,59	2,67
13			1,20	1,17	1,11	1,10			2,76	2,85
14			1,18	1,21	1,11	1,15			3,05	3,05

15	1,34	1,29	1,16	1,28	3,42	3,43
16					3,42	3,34
17					3,57	3,61
18					3,54	3,41
19					3,98	3,92
20					3,79	3,81
21					-	-
22					4,23	4,16
23					4,33	4,27

	<i>Nannochloropsis</i> 10°C		<i>P.tricornutum</i> 10°C		B58 10°C		M88 15°C		M97 15°C	
Dag	OD750 (1)	OD750 (2)	OD750 (1)	OD750 (2)	OD750 (1)	OD750 (2)	OD750 (1)	OD750 (2)	OD750 (1)	OD750 (2)
0	0,03	0,03	0,04	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
1	0,09	0,07	0,06	0,06	0,05	0,04	0,05	0,05	0,04	0,04
2	0,10	0,10	0,11	0,11	0,09	0,08	0,10	0,10	0,07	0,06
3	0,12	0,12	0,19	0,19	0,14	0,13	0,23	0,26	0,10	0,10
4	0,12	0,12	0,21	0,21	0,21	0,19	0,51	0,69	0,13	0,13
5	0,13	0,13	0,19	0,22	0,19	0,19	0,83	1,06	0,14	0,14
6	0,14	0,14	0,21	0,23	0,19	0,19	1,12	1,36	0,15	0,14
7	0,16	0,16	0,23	0,25	0,19	0,19	1,20	1,33	0,14	0,14
8	0,19	0,19	0,28	0,28	0,17	0,15	1,28	1,55	0,14	0,15
9	0,23	0,23	0,48	0,52	0,25	0,24	1,37	1,54	0,22	0,21
10	0,27	0,27	0,95	1,07	0,41	0,39	1,32	1,40	0,33	0,30
11	0,30	0,30	1,53	1,56	0,66	0,65	1,33	1,57	0,40	0,37
12	0,35	0,34	2,03	2,07	1,00	1,00	1,39	1,57	0,41	0,40
13	0,40	0,38	2,46	2,44	1,29	1,28			0,42	0,42
14	0,44	0,42	2,59	2,70	1,53	1,55			0,43	0,43
15	0,48	0,47	3,06	3,01	1,90	1,89			0,44	0,44
16	0,52	0,51	3,15	3,13	2,44	2,32				
17	0,56	0,55	3,36	3,47	2,61	2,64				
18	0,60	0,59	3,47	3,63	3,07	2,96				
19	0,63	0,61	3,63	3,75	3,02	3,03				
20	0,71	0,72	3,90	3,94	3,23	3,16				
21	0,77	0,78	4,45	4,53	3,66	3,70				
22	0,77	0,76	4,26	4,33	3,62	3,45				
23	0,82	0,77	4,54	4,44	3,94	3,89				
24	0,78	0,78	4,39	4,68	3,94	4,09				
25	0,80	0,82	4,81	5,04	4,27	4,41				
26			4,60	4,79	4,31	4,35				
27			-	-	-	-				
28			4,83	4,98	4,67	4,54				
29					4,83	4,82				

	M117 15°C		M122 15°C		M138 15°C		M139 15°C		<i>Isochrysis</i> 15°C	
Dag	OD750 (1)	OD750 (2)	OD750 (1)	OD750 (2)	OD750 (1)	OD750 (2)	OD750 (1)	OD750 (2)	OD750 (1)	OD750 (2)
0	0,03	0,03	0,04	0,04	0,04	0,04	0,05	0,05	0,04	0,04
1	0,04	0,02	0,07	0,05	0,07	0,06	0,08	0,08	0,08	0,07
2	0,08	0,06	0,16	0,14	0,12	0,16	0,19	0,19	0,22	0,21
3	0,15	0,14	0,41	0,35	0,45	0,41	0,54	0,54	0,75	0,73
4	0,11	0,15	0,71	0,79	0,61	0,84	0,69	0,60	1,40	1,17
5	0,25	0,18	1,02	1,21	0,82	1,05	1,00	0,95	2,12	1,77
6	0,20	0,17	1,18	1,29	1,06	1,31	1,14	1,06	2,47	1,79
7	0,21	0,19	1,35	1,57	1,17	1,34	1,30	1,16	2,88	2,29
8	0,20	0,18	1,51	1,63	1,30	1,63	1,35	1,34	3,12	2,52
9	0,29	0,27	1,56	1,59	1,40	1,63	1,38	1,40	3,47	2,86
10	0,39	0,40	1,46	1,63	1,45	1,73	1,40	1,37	3,57	3,04
11	0,55	0,51	1,56	1,80	1,52	1,72	1,41	1,45	3,76	3,30
12	0,65	0,64	1,64	1,77	1,57	1,71	1,44	1,42	3,86	3,34
13	0,96	0,91			1,49	1,62			4,02	3,53
14	1,10	1,04			1,62	1,90			4,29	3,71
15	1,15	1,11			1,54	1,90			4,45	3,69
16	1,22	1,19			1,62	1,95			4,45	3,90
17	1,31	1,30			1,46	1,91			4,31	3,77
18	1,34	1,35							-	-
19	1,36	1,37							4,64	4,02
20	1,39	1,37								
21	1,48	1,49								
22	1,42	1,42								

	<i>Nannochloropsis</i> 15°C		<i>P.tricornutum</i> 15°C		B58 15°C	
Dag	OD750 (1)	OD750 (2)	OD750 (1)	OD750 (2)	OD750 (1)	OD750 (2)
0	0,02	0,02	0,04	0,04	0,03	0,03
1	0,04	0,04	0,09	0,08	0,07	0,07
2	0,07	0,06	0,25	0,26	0,15	0,16
3	0,07	0,06	0,83	0,87	0,37	0,37
4	0,07	0,07	1,54	1,38	0,84	0,81
5	0,08	0,09	2,25	1,95	1,29	1,24
6	0,10	0,11	2,63	2,33	1,59	1,58
7	0,12	0,14	2,96	2,59	1,97	1,89
8	0,14	0,18	3,38	3,04	2,19	2,13
9	0,16	0,22	3,59	3,20	2,40	2,55
10	0,18	0,32	3,85	3,49	2,70	2,65

11	0,20	0,35	4,15	3,67	2,96	2,95
12	0,23	0,58	4,00	3,81	3,19	3,25
13	0,24	0,91	4,28	4,01	3,28	3,28
14	0,26	1,34	4,47	4,36	3,70	3,66
15	0,28	1,50	4,52	4,15	3,71	3,70
16	0,30	2,55	4,84	4,33	4,23	4,09
17	0,35	3,45	4,63	4,41	4,09	3,97
18	-	-	-	-	-	-
19	0,51	4,17	4,74	4,58	4,38	4,28
20	0,68	4,33			4,45	4,55
21	0,86	4,55			4,83	4,41
22	1,03	4,72			4,87	4,62
23	1,40	5,04			4,92	4,86
24	-	-			-	-
25	2,56	5,46			5,25	5,00
26	3,01	5,61			5,33	4,94
27	3,51	6,10			5,35	5,08
28	4,15	6,19			5,50	5,41
29	4,51	6,22			5,61	5,53
30	4,88	6,44				
31	-	-				
32	-	-				
33	5,77	6,69				
34	5,95	6,68				
35	6,25	6,81				

Fettsyrer data:

Tabell A5: Fettsyre Informasjon, oversikt over hvilken konsentrasjon av indre standard som er brukt, hvor mye IS (Vol) som er brukt i hver prøve og hvordan den er blitt fortynnet. I tillegg er det en oversikt over fettsyre ID, og hvilken stamme og fase dette tilsvarer. Resultatene man fikk ut fra fettsyreprøvene er også ført inn i skjemaet som EPA, DHA og SUM FA (TFA), fettsyrene er oppgitt som mg per 10 mL prøve.

ID	Cultur	nr	Fase	EPA 20:5 n-3	DHA 22:6 n-3	SUM FA	Temp.	Vol (µL)	Kons.	IS amnt.	Dill.
Hk-001	M24	1a	eksp	10,70	2,60	55,68	10° C	100	0,19	19,41	0
HK-002	M24	1a	stasj.	29,25	5,35	314,02	10° C	300	0,19	58,23	500µL + 1 mL Iso
HK-031	M24	1b	eksp	11,15	2,75	55,78	10° C	50	0,19	9,71	0
HK-032	M24	1b	stasj.	27,09	4,62	299,81	10° C	300	0,19	58,23	500µL + 1 mL Iso
HK-061	M24	2a	eksp	14,75	3,09	75,28	10° C	50	0,19	9,71	0
HK-062	M24	2a	stasj.	44,80	7,19	510,21	10° C	15	4,03	60,48	500µL + 1 mL Iso
HK-091	M24	2b	eksp	15,69	3,27	80,68	10° C	50	0,19	9,31	0
HK-092	M24	2b	stasj.	36,15	5,75	442,16	10° C	15	4,03	60,48	500µL + 1 mL Iso
Hk-003	M78	3a	eksp	12,97	2,31	65,99	10° C	100	0,19	19,41	0
HK-004	M78	3a	stasj.	55,94	7,98	438,20	10° C	300	0,19	58,23	500µL + 1 mL Iso
HK-033	M78	3b	eksp	11,74	2,06	61,54	10° C	100	0,19	19,41	0
HK-034	M78	3b	stasj.	55,14	7,93	426,60	10° C	300	0,19	58,23	500µL + 1 mL Iso
HK-063	M78	4a	eksp	26,64	5,17	130,22	10° C	100	0,19	19,41	0
HK-064	M78	4a	stasj.	68,99	7,29	614,61	10° C	15	4,03	60,48	500µL + 1 mL Iso
HK-093	M78	4b	eksp	27,12	5,19	132,46	10° C	100	0,19	18,61	0
HK-094	M78	4b	stasj.	64,55	6,60	597,80	10° C	15	4,03	60,48	500µL + 1 mL Iso
HK-005	M88	5a	eksp	21,47	3,63	131,51	10° C	100	0,19	19,41	0
HK-006	M88	5a	stasj.	57,09	7,95	536,71	10° C	300	0,19	58,23	500µL + 1 mL Iso
HK-035	M88	5b	eksp	21,30	3,66	128,87	10° C	100	0,19	19,41	0
HK-036	M88	5b	stasj.	54,67	7,59	514,52	10° C	300	0,19	58,23	500µL + 1 mL Iso
HK-065	M88	6a	eksp	24,00	4,00	150,57	10° C	100	0,19	19,41	0
HK-066	M88	6a	stasj.	54,08	7,69	479,46	10° C	15	4,03	60,48	500µL + 1 mL Iso
HK-095	M88	6b	eksp	23,10	3,94	143,19	10° C	100	0,19	18,61	0
HK-096	M88	6b	stasj.	57,11	8,12	493,77	10° C	15	4,03	60,48	500µL + 1 mL Iso
HK-007	M97	7a	eksp	17,09	2,89	77,62	10° C	100	0,19	19,41	0
HK-008	M97	7a	stasj.	53,32	6,49	548,81	10° C	300	0,19	58,23	500µL + 1 mL Iso

HK-037	M97	7b	eksp	16,26	2,77	73,94	10 ° C	100	0,19	19,41	0
HK-038	M97	7b	stasj.	46,62	5,56	496,25	10 ° C	300	0,19	58,23	500µL + 1 mL Iso
HK-067	M97	8a	eksp	20,64	3,45	88,84	10 ° C	100	0,19	19,41	0
HK-068	M97	8a	stasj.	53,54	6,35	592,57	10 ° C	15	4,03	60,48	500µL + 1 mL Iso
HK-097	M97	8b	eksp	19,25	3,25	81,72	10 ° C	100	0,19	18,61	0
HK-098	M97	8b	stasj.	49,68	5,96	533,13	10 ° C	15	4,03	60,48	500µL + 1 mL Iso

HK-009	M107	9a	eksp	19,13	3,38	93,71	10 ° C	100	0,19	19,41	0
HK-010	M107	9a	stasj.	38,19	4,72	360,13	10 ° C	300	0,19	58,23	500µL + 1 mL Iso
HK-039	M107	9b	eksp	20,08	3,59	94,67	10 ° C	100	0,19	19,41	0
HK-040	M107	9b	stasj.	38,00	4,83	357,94	10 ° C	300	0,19	58,23	500µL + 1 mL Iso
HK-069	M107	10a	eksp	18,89	3,37	90,71	10 ° C	100	0,19	18,61	0
HK-070	M107	10a	stasj.	42,14	5,35	390,92	10 ° C	15	4,03	60,48	500µL + 1 mL Iso
HK-099	M107	10b	eksp	19,54	3,49	91,62	10 ° C	100	0,19	18,61	0
HK-100	M107	10b	stasj.	39,25	4,99	359,45	10 ° C	15	4,03	60,48	500µL + 1 mL Iso

HK-011	M117	1a	eksp	19,17	2,97	102,16	10 ° C	50	0,19	9,71	0
HK-012	M117	1a	stasj.	146,55	17,52	673,62	10 ° C	450	0,19	87,35	250µL + 1mL
HK-041	M117	1b	eksp	18,22	2,84	95,24	10 ° C	50	0,19	9,71	0
HK-042	M117	1b	stasj.	141,81	16,86	654,98	10 ° C	450	0,19	87,35	250µL + 1mL
HK-071	M117	2a	eksp	20,04	3,09	104,94	10 ° C	50	0,19	9,71	0
HK-072	M117	2a	stasj.	144,40	16,93	672,10	10 ° C	22	4,03	88,7	250µL + 1mL
HK-101	M117	2b	eksp	18,83	2,95	98,83	10 ° C	50	0,19	9,31	0
HK-102	M117	2b	stasj.	151,87	18,02	701,19	10 ° C	22	4,03	88,7	250µL + 1mL

HK-013	M122	11a	eksp	8,64	1,16	45,86	10 ° C	50	0,19	9,71	0
HK-014	M122	11a	stasj.	198,35	20,00	1005,78	10 ° C	300	0,19	58,23	500µL + 1 mL Iso
HK-043	M122	11b	eksp	8,73	1,17	46,04	10 ° C	50	0,19	9,71	0
HK-044	M122	11b	stasj.	190,49	18,92	968,30	10 ° C	25	4,03	100,8	250µL + 1 mL Iso
HK-073	M122	12a	eksp	7,12	0,94	38,44	10 ° C	50	0,19	9,31	0
HK-074	M122	12a	stasj.	188,32	18,55	944,83	10 ° C	25	4,03	100,8	250µL + 1 mL Iso
HK-103	M122	12b	eksp	6,96	0,93	37,92	10 ° C	50	0,19	9,31	0
HK-104	M122	12b	stasj.	174,51	17,07	885,35	10 ° C	25	4,03	100,8	250µL + 1 mL Iso

HK-015	M138	13a	eksp	9,54	1,28	49,86	10 ° C	50	0,19	9,71	0
HK-016	M138	13a	stasj.	182,60	18,84	915,14	10 ° C	300	0,19	58,23	500µL + 1 mL Iso

HK-045	M138	13b eksp	9,11	1,22	48,29	10° C	50	0,19	9,71	0
HK-046	M138	13b stasj.	179,63	17,89	909,52	10° C	25	4,03	100,8	250µL + 1 mL Iso
HK-075	M138	14a eksp	11,82	1,63	63,29	10° C	50	0,19	9,31	0
HK-076	M138	14a stasj.	198,64	19,54	1018,11	10° C	25	4,03	100,8	250µL + 1 mL Iso
HK-105	M138	14b eksp	11,37	1,61	60,54	10° C	50	0,19	9,31	0
HK-106	M138	14b stasj.	183,71	18,38	946,15	10° C	25	4,03	100,8	250µL + 1 mL Iso

HK-017	M139	15a eksp	5,83	0,82	30,63	10° C	50	0,19	9,71	0
HK-018	M139	15a stasj.	110,27	13,41	430,63	10° C	300	0,19	58,23	500µL + 1 mL Iso
HK-047	M139	15b eksp	5,58	0,78	29,88	10° C	50	0,19	9,71	0
HK-048	M139	15b stasj.	105,52	12,88	414,44	10° C	300	0,19	58,23	500µL + 1 mL Iso
HK-077	M139	16a eksp	5,98	0,81	32,84	10° C	50	0,19	9,31	0
HK-078	M139	16a stasj.	109,73	13,54	436,14	10° C	15	4,03	60,48	500µL + 1 mL Iso
HK-107	M139	16b eksp	6,03	0,85	31,79	10° C	50	0,19	9,31	0
HK-108	M139	16b stasj.	103,41	12,53	415,87	10° C	15	4,03	60,48	500µL + 1 mL Iso

HK-019	Isochrysis	21a eksp	12,34	1,34	98,73	10° C	50	0,19	9,71	0
HK-020	Isochrysis	21a stasj.	394,38	19,13	6488,59	10° C	250	0,19	48,53	500µL + 500µL Iso
HK-049	Isochrysis	21b eksp	11,80	1,27	96,22	10° C	50	0,19	9,71	0
HK-050	Isochrysis	21b stasj.	417,95	19,60	6970,93	10° C	60	4,03	241,92	100µL + 1mL ISO
HK-079	Isochrysis	22a eksp	12,83	1,36	103,74	10° C	50	0,19	9,31	0
HK-080	Isochrysis	22a stasj.	403,03	18,25	6605,10	10° C	60	4,03	241,92	100µL + 1mL ISO
HK-109	Isochrysis	22b eksp	11,42	1,23	95,52	10° C	50	0,19	9,31	0
HK-110	Isochrysis	22b stasj.	398,91	18,42	6562,01	10° C	60	4,03	241,92	100µL + 1mL ISO
HK-225	Isochrysis	21c stasj.	390,24	18,52	6431,06	10° C	60	4,03	241,92	100µL + 1mL ISO
HK-226	Isochrysis	21d stasj.	385,71	17,71	6437,95	10° C	120	4,03	483,84	50 µL + 1mL ISO

HK-021	Nannoch.	23a eksp	12,99	0,00	160,81	10° C	150	0,19	29,12	750µL + 250µL ISO
HK-022	Nannoch.	23a stasj.	63,72	0,00	641,42	10° C	450	0,19	87,35	250µL + 1mL ISO
HK-051	Nannoch.	23b eksp	12,61	0,00	156,38	10° C	150	0,19	29,12	750µL + 250µL ISO
HK-052	Nannoch.	23b stasj.	59,93	0,00	599,05	10° C	450	0,19	87,35	250µL + 1mL ISO
HK-081	Nannoch.	24a eksp	12,86	0,00	164,25	10° C	150	0,19	27,92	750µL + 250µL ISO
HK-082	Nannoch.	24a stasj.	60,77	0,00	589,69	10° C	450	0,19	83,75	250µL + 1mL ISO

HK-111	Nannoch.	24b eksp	12,60	0,00	162,21	10° C	150	0,19	27,92	750µL + 250µL ISO
HK-112	Nannoch.	24b stasj.	62,04	0,00	619,70	10° C	22	4,03	88,7	250µL + 1mL ISO

HK-023	P.tricornutum	25a eksp	16,95	2,17	96,90	10° C	150	0,19	29,12	750µL + 250µL ISO
HK-024	P.tricornutum	25a stasj.	420,86	25,42	7465,73	10° C	100	4,03	403	50µL + 1mL ISO
HK-053	P.tricornutum	25b eksp	15,75	2,07	90,24	10° C	150	0,19	29,12	750µL + 250µL ISO
HK-054	P.tricornutum	25b stasj.	397,69	23,92	7140,39	10° C	200	4,03	806,4	25µL + 1mL ISO
HK-083	P.tricornutum	26a eksp	18,34	2,20	95,35	10° C	150	0,19	27,92	750µL + 250µL ISO
HK-084	P.tricornutum	26a stasj.	415,11	23,18	7426,44	10° C	200	4,03	806,4	25µL + 1mL ISO
HK-113	P.tricornutum	26b eksp	17,02	2,10	88,74	10° C	150	0,19	27,92	750µL + 250µL ISO
HK-114	P.tricornutum	26b stasj.	387,36	22,04	6825,16	10° C	200	4,03	806,4	25µL + 1mL ISO

HK-025	B58	27a eksp	16,01	2,53	96,58	10° C	150	0,19	29,12	750µL + 250µL ISO
HK-026	B58	27a stasj.	342,18	30,63	7031,47	10° C	100	4,03	403	50µL + 1mL ISO
HK-055	B58	27b eksp	15,74	2,48	94,24	10° C	150	0,19	29,12	750µL + 250µL ISO
HK-056	B58	27b stasj.	324,01	28,51	6678,98	10° C	200	4,03	806,4	25µL + 1mL ISO
HK-085	B58	28a eksp	15,13	2,38	90,63	10° C	150	0,19	27,92	750µL + 250µL ISO
HK-086	B58	28a stasj.	325,41	28,93	6774,70	10° C	200	4,03	806,4	25µL + 1mL ISO
HK-115	B58	28b eksp	14,23	2,25	86,50	10° C	150	0,19	27,92	750µL + 250µL ISO
HK-116	B58	28b stasj.	298,28	26,17	6174,61	10° C	200	4,03	806,4	25µL + 1mL ISO

HK-027	B59	17a eksp	20,46	2,36	118,71	10° C	100	0,19	19,41	0
HK-028	B59	17a stasj.	127,46	13,47	830,79	10° C	300	0,19	58,23	500µL + 1 mL Iso
HK-057	B59	17b eksp	18,58	2,23	96,86	10° C	100	0,19	19,41	0
HK-058	B59	17b stasj.	98,34	10,25	639,96	10° C	25	4,03	100,8	250µL + 1 mL Iso
HK-087	B59	18a eksp	56,41	6,63	299,31	10° C	100	0,19	18,61	0
HK-088	B59	18a stasj.	129,33	13,08	888,44	10° C	25	4,03	100,8	250µL + 1 mL Iso
HK-117	B59	18b eksp	42,78	5,05	229,48	10° C	100	0,19	18,61	0
HK-118	B59	18b stasj.	99,43	9,82	717,81	10° C	25	4,03	100,8	250µL + 1 mL Iso
HK-227	B59	17b eksp	2,86	0,49	10,24	10° C	100	0,19	18,61	0

HK-029	C.australis	19a eksp	10,88	0,00	99,55	10 ° C	100	0,19	19,41	0
HK-030	C.australis	19a stasj.	35,08	0,00	287,20	10 ° C	300	0,19	58,23	500µL + 1 mL Iso
HK-059	C.australis	19b eksp	0,76	0,00	8,05	10 ° C	100	0,19	19,41	0
HK-060	C.australis	19b stasj.	32,31	0,00	278,57	10 ° C	300	0,19	58,23	500µL + 1 mL Iso
HK-089	C.australis	20a eksp	13,21	0,00	90,47	10 ° C	100	0,19	18,61	0
HK-090	C.australis	20a stasj.	16,02	0,00	169,81	10 ° C	15	4,03	60,48	500µL + 1 mL Iso
HK-119	C.australis	20b eksp	13,79	0,00	92,69	10 ° C	100	0,19	18,61	0
HK-120	C.australis	20b stasj.	27,37	0,00	218,06	10 ° C	15	4,03	60,48	500µL + 1 mL Iso
HK-228	C.australis	19b eksp	15,35	0,00	115,35	10 ° C	50	0,19	9,31	0

HK-121	M78	31a eksp	20,33	0,00	189,38	15 ° C	200	0,19	37,22	500µL + 500 Iso
HK-122	M78	31a stasj.	62,67	0,00	575,51	15 ° C	25	4,03	100,8	250µL + 1mL Iso
HK-147	M78	31b eksp	9,12	0,00	114,35	15 ° C	200	0,19	37,22	500µL + 500 Iso
HK-148	M78	31b stasj.	49,18	0,00	460,45	15 ° C	25	4,03	100,8	250µL + 1mL Iso
HK-173	M78	32a eksp	15,88	0,00	145,53	15 ° C	200	0,19	37,22	500µL + 500µL Iso
HK-174	M78	32a stasj.	85,51	0,00	696,24	15 ° C	25	4,03	100,8	250µL + 1mL Iso
HK-199	M78	32b eksp	16,10	0,00	146,64	15 ° C	200	0,19	37,22	500µL + 500µL Iso
HK-200	M78	32b stasj.	59,50	0,00	513,26	15 ° C	25	4,03	100,8	250µL + 1mL Iso

HK-123	M88	13a eksp	15,98	2,39	84,37	15 ° C	50	0,19	9,31	0
HK-124	M88	13a stasj.	198,03	23,11	1287,20	15 ° C	55	4,03	221,76	100µL + 1mL Iso
HK-149	M88	13b eksp	15,51	2,24	80,86	15 ° C	50	0,19	9,31	0
HK-150	M88	13b stasj.	198,74	23,01	1279,54	15 ° C	55	4,03	221,76	100µL + 1mL Iso
HK-175	M88	14a eksp	16,15	2,35	85,09	15 ° C	50	0,19	9,31	0
HK-176	M88	14a stasj.	203,00	22,99	1446,61	15 ° C	55	4,03	221,76	100µL + 1mL Iso
HK-201	M88	14b eksp	17,15	2,45	87,25	15 ° C	50	0,19	9,31	0
HK-202	M88	14b stasj.	199,42	22,91	1401,96	15 ° C	55	4,03	221,76	100µL + 1mL Iso

HK-125	M97	33a eksp	16,41	3,51	83,49	15 ° C	100	0,19	18,61	0
HK-126	M97	33a stasj.	60,56	9,88	538,70	15 ° C	300	0,19	55,83	500µL + 1mL Iso
HK-151	M97	33b eksp	15,98	3,33	81,12	15 ° C	100	0,19	18,61	0
HK-152	M97	33b stasj.	60,14	9,64	534,12	15 ° C	300	0,19	55,83	500µL + 1mL Iso
HK-177	M97	34a eksp	14,58	3,32	73,97	15 ° C	100	0,19	18,61	0
HK-178	M97	34a stasj.	57,21	9,46	471,58	15 ° C	300	0,19	55,83	500µL + 1mL Iso

HK-203	M97	34b eksp	15,38	3,54	76,15	15 ° C	100	0,19	18,61	0
HK-204	M97	34b stasj.	58,82	9,67	490,14	15 ° C	300	0,19	55,83	500µL + 1mL Iso

HK-127	M117	37a eksp	22,12	3,27	127,97	15 ° C	100	0,19	18,61	0
HK-128	M117	37a stasj.	217,42	21,25	1387,30	15 ° C	30	4,03	120,96	250µL + 1mL
HK-153	M117	37b eksp	25,65	3,72	144,79	15 ° C	100	0,19	18,61	0
HK-154	M117	37b stasj.	222,94	21,42	1410,46	15 ° C	30	4,03	120,96	250µL + 1mL
HK-179	M117	38a eksp	22,16	3,35	126,32	15 ° C	100	0,19	18,61	0
HK-180	M117	38a stasj.	205,91	19,81	1340,52	15 ° C	30	4,03	120,96	250µL + 1mL
HK-205	M117	38b eksp	23,91	3,63	136,52	15 ° C	100	0,19	18,61	0
HK-206	M117	38b stasj.	217,42	21,14	1407,99	15 ° C	30	4,03	120,96	250µL + 1mL

HK-129	M122	15a eksp	31,64	4,76	158,52	15 ° C	100	0,19	18,61	0
HK-130	M122	15a stasj.	240,54	25,08	1604,60	15 ° C	60	4,03	241,92	100µL + 1mL Iso
HK-155	M122	15b eksp	35,45	5,08	175,75	15 ° C	100	0,19	18,61	0
HK-156	M122	15b stasj.	234,22	23,59	1551,30	15 ° C	60	4,03	241,92	100µL + 1mL Iso
HK-181	M122	16a eksp	29,72	4,39	145,18	15 ° C	100	0,19	18,61	0
HK-182	M122	16a stasj.	243,72	26,14	1674,12	15 ° C	60	4,03	241,92	100µL + 1mL Iso
HK-207	M122	16b eksp	29,66	4,37	142,69	15 ° C	100	0,19	18,61	0
HK-208	M122	16b stasj.	221,77	23,77	1523,37	15 ° C	60	4,03	241,92	100µL + 1mL Iso

HK-131	M138	17a eksp	36,74	5,16	175,64	15 ° C	100	0,19	18,61	0
HK-132	M138	17a stasj.	264,26	24,76	1723,99	15 ° C	65	4,03	262,08	100µL + 1mL Iso
HK-157	M138	17b eksp	32,36	4,58	154,94	15 ° C	100	0,19	18,61	0
HK-158	M138	17b stasj.	255,78	23,84	1643,77	15 ° C	65	4,03	262,08	100µL + 1mL Iso
HK-183	M138	18a eksp	41,45	6,02	191,42	15 ° C	100	0,19	18,61	0
HK-184	M138	18a stasj.	319,23	30,19	2091,31	15 ° C	65	4,03	262,08	100µL + 1mL Iso
HK-209	M138	18b eksp	41,39	6,04	187,84	15 ° C	100	0,19	18,61	0
HK-210	M138	18b stasj.	317,98	29,59	2125,55	15 ° C	65	4,03	262,08	100µL + 1mL Iso

HK-133	M139	19a eksp	14,61	2,08	80,18	15 ° C	150	0,19	27,92	750µL + 250µL Iso
HK-134	M139	19a stasj.	232,85	24,78	1571,25	15 ° C	35	4,03	141,12	150µL + 1mL Iso
HK-159	M139	19b eksp	10,47	1,41	60,50	15 ° C	150	0,19	27,92	750µL + 250µL Iso
HK-160	M139	19b stasj.	196,41	20,44	1314,84	15 ° C	35	4,03	141,12	150µL + 1mL Iso

HK-185	M139	20a	eksp	14,33	2,05	79,00	15 ° C	150	0,19	27,92	750µL + 250µL Iso
HK-186	M139	20a	stasj.	238,91	24,09	1572,16	15 ° C	35	4,03	141,12	150µL + 1mL Iso
HK-211	M139	20b	eksp	12,96	1,90	70,35	15 ° C	75	0,19	13,96	750µL + 250µL Iso
HK-212	M139	20b	stasj.	227,99	23,75	1494,14	15 ° C	35	4,03	141,12	150µL + 1mL Iso

HK-135	Isochrysis	1a	eksp	18,86	2,49	100,75	15 ° C	50	0,19	9,31	0
HK-136	Isochrysis	1a	stasj.	420,31	24,02	7138,40	15 ° C	65	4,03	262,08	100µL + 1mL Iso
HK-161	Isochrysis	1b	eksp	17,40	2,32	90,93	15 ° C	50	0,19	9,31	0
HK-162	Isochrysis	1b	stasj.	452,61	25,45	7454,20	15 ° C	65	4,03	262,08	100µL + 1mL Iso
HK-187	Isochrysis	2a	eksp	18,50	2,37	100,96	15 ° C	50	0,19	9,31	0
HK-188	Isochrysis	2a	stasj.	419,46	24,43	6340,78	15 ° C	65	4,03	262,08	100µL + 1mL Iso
HK-213	Isochrysis	2b	eksp	16,86	2,22	90,33	15 ° C	50	0,19	9,31	0
HK-214	Isochrysis	2b	stasj.	396,71	23,27	5989,30	15 ° C	130	4,03	524,16	50 µL + 1mL Iso

HK-137	Nannoch.	3a	eksp	9,46	0,00	96,34	15 ° C	150	0,19	27,92	750µL + 250 µL Iso
HK-138	Nannoch.	3a	stasj.	188,38	0,00	4741,01	15 ° C	140	4,03	564,48	40µL + 1mL Iso
HK-163	Nannoch.	3b	eksp	9,83	0,00	96,98	15 ° C	150	0,19	27,92	750µL + 250 µL Iso
HK-164	Nannoch.	3b	stasj.	179,84	0,00	4385,40	15 ° C	140	4,03	564,48	40µL + 1mL Iso
HK-189	Nannoch.	4a	eksp	14,28	0,00	140,10	15 ° C	150	0,19	27,92	750µL + 250 µL Iso
HK-190	Nannoch.	4a	stasj.	165,36	0,00	4526,84	15 ° C	140	4,03	564,48	40µL + 1mL Iso
HK-215	Nannoch.	4b	eksp	13,03	0,00	130,46	15 ° C	150	0,19	27,92	750µL + 250 µL Iso
HK-216	Nannoch.	4b	stasj.	154,12	0,00	4283,09	15 ° C	140	4,03	564,48	40µL + 1mL Iso

HK-139	P.tricornutum	5a	eksp	19,83	2,51	110,09	15 ° C	150	0,19	27,92	750µL + 250µL Iso
HK-140	P.tricornutum	5a	stasj.	452,01	26,03	7580,80	15 ° C	200	4,03	806,4	25µL + 1mL Iso
HK-165	P.tricornutum	5b	eksp	18,34	2,38	102,08	15 ° C	150	0,19	27,92	750µL + 250µL Iso
HK-166	P.tricornutum	5b	stasj.	433,58	25,07	7316,76	15 ° C	200	4,03	806,4	25µL + 1mL Iso
HK-191	P.tricornutum	6a	eksp	20,90	2,71	107,71	15 ° C	150	0,19	27,92	750µL + 250µL Iso
HK-192	P.tricornutum	6a	stasj.	422,14	24,92	6872,95	15 ° C	200	4,03	806,4	25µL + 1mL Iso
HK-217	P.tricornutum	6b	eksp	20,02	2,62	104,65	15 ° C	150	0,19	27,92	750µL + 250µL Iso

HK-218	P.tricornutum	6b	stasj.	410,81	24,22	6686,49	15 ° C	200	4,03	806,4	25µL + 1mL Iso
HK-141	B58	7a	eksp	12,23	1,84	69,79	15 ° C	75	0,19	13,96	0
HK-142	B58	7a	stasj.	407,92	31,51	8660,75	15 ° C	200	4,03	806,4	25µL + 1mL Iso
HK-167	B58	7b	eksp	10,83	1,66	60,99	15 ° C	75	0,19	13,96	0
HK-168	B58	7b	stasj.	394,56	30,54	8297,42	15 ° C	200	4,03	806,4	25µL + 1mL Iso
HK-193	B58	8a	eksp	11,34	1,76	65,45	15 ° C	75	0,19	13,96	0
HK-194	B58	8a	stasj.	375,45	29,19	7810,71	15 ° C	200	4,03	806,4	25µL + 1mL Iso
HK-219	B58	8b	eksp	12,04	1,86	70,26	15 ° C	75	0,19	13,96	0
HK-220	B58	8b	stasj.	391,16	29,93	8290,12	15 ° C	200	4,03	806,4	25µL + 1mL Iso
HK-143	B59	9a	eksp	6,37	0,74	20,92	15 ° C	100	0,19	18,61	0
HK-144	B59	9a	stasj.	186,47	16,12	1745,35	15 ° C	25	4,03	100,8	250µL + 1mL Iso
HK-169	B59	9b	eksp	3,73	0,42	12,36	15 ° C	100	0,19	18,61	0
HK-170	B59	9b	stasj.	197,71	16,94	1880,86	15 ° C	25	4,03	100,8	250µL + 1mL Iso
HK-195	B59	10a	eksp	5,00	0,56	16,76	15 ° C	100	0,19	18,61	0
HK-196	B59	10a	stasj.	225,28	22,84	1483,95	15 ° C	25	4,03	100,8	250µL + 1mL Iso
HK-221	B59	10b	eksp	9,49	1,10	31,39	15 ° C	50	0,19	9,31	0
HK-222	B59	10b	stasj.	153,53	12,59	1439,6	15 ° C	50	4,03	201,6	125 µL + 1mL Iso
HK-145	C.austalis	11a	eksp	5,46	0,00	35,34	15 ° C	100	0,19	18,61	0
HK-146	C.austalis	11a	stasj.	74,23	0,00	657,44	15 ° C	15	4,03	60,48	500µL + 1mL Iso
HK-171	C.australis	11b	eksp	4,12	0,00	29,49	15 ° C	100	0,19	18,61	0
HK-172	C.australis	11b	stasj.	62,23	0,00	547,57	15 ° C	15	4,03	60,48	500µL + 1mL Iso
HK-197	C.austalis	12a	eksp	1,98	0,00	16,73	15 ° C	100	0,19	18,61	0
HK-198	C.austalis	12a	stasj.	136,93	0,00	1105,3	15 ° C	15	4,03	60,48	500µL + 1mL Iso
HK-223	C.australis	12b	eksp	3,45	0,00	22,97	15 ° C	50	0,19	9,31	0
HK-224	C.australis	12b	stasj.	75,44	0,00	610,49	15 ° C	15	4,03	60,48	500µL + 1mL Iso

Pigment data:

Tabell A6: Tabellen under viser abs. ved bølgelengde 470 og 666 for hver av stammene ved 10 og 15 °C, både i eksponentiell fase og stasjonær fase. Det er 2 paralleller per dyrkingsrør og 2 dyrkingsrør per stamme (til sammen 4 parallele prøver per stamme). (blått viser 10°C, rødt viser 15°C).

eksponentiell	10 °C							
	M24 1a	M24 1b	M24 2a	M24 2b	M78 3a	M78 3b	M78 4a	M78 4b
sample Vol (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5
extraction Vol (mL)	3	3	3	3	3	3	3	3
470	0,0969	0,092	0,1528	0,1621	0,0675	0,0669	0,2128	0,2161
666	0,0575	0,0552	0,09	0,0968	0,0413	0,0391	0,1238	0,1257

eksponentiell	10 °C							
	M88 5a	M88 5b	M88 6a	M88 6b	M97 7a	M97 7b	M97 8a	M97 8b
sample Vol (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5
extraction Vol (mL)	3	3	3	3	3	3	3	3
470	0,067	0,0606	0,0694	0,0703	0,1265	0,1086	0,1718	0,1645
666	0,0466	0,0415	0,0479	0,0491	0,0841	0,0747	0,116	0,1137

Eksponentiell	10 °C							
	M107 9a	M107 9b	M107 10a	M107 10 b	M117 1a	M117 1b	M117 2a	M117 2b
sample Vol (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5
extraction Vol (mL)	3	5	5	3	3	5	3	3
470	0,1349	0,0768	0,0738	0,1585	0,1848	0,1112	0,1982	0,1813
666	0,0958	0,0567	0,0513	0,1326	0,1452	0,088	0,1516	0,1404

Eksponentiell	10 °C							
	M122 11a	M122 11b	M122 12a	M122 12 b	M138 13a	M138 13b	M138 14a	M138 14b
sample Vol (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5
extraction Vol (mL)	3	3	3	3	3	3	3	3
470	0,0378	0,0699	0,0575	0,0508	0,0578	0,0646	0,0857	0,0909
666	0,0438	0,0573	0,0473	0,0475	0,0535	0,0582	0,0743	0,0744

Eksponentiell	10 °C							
	M139 15a	M139 15b	M139 16a	M139 16b	Iso 21a	Iso 21b	Iso 22a	Iso 22b
sample Vol (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5
extraction Vol (mL)	3	3	3	3	3	3	3	3
470	0,0301	0,0288	0,0422	0,0371	0,0526	0,0798	0,0601	0,0553
666	0,0308	0,0316	0,0366	0,0367	0,0371	0,0564	0,042	0,041

Eksponentiell	10 °C							
	Nanno 23a	Nanno 23b	Nanno 24a	Nanno 24b	P.tr 25a	P.tr 25b	P.tr 26a	P.tr 26b
sample Vol (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5
extraction Vol (mL)	3	3	3	3	3	3	3	3
470	0,0428	0,044	0,0249	0,0295	0,132	0,1339	0,1567	0,157
666	0,0432	0,0347	0,0188	0,023	0,0775	0,0829	0,0937	0,0934

Eksponentiell	10 °C				10 °C			
	B58 27a	B58 27b	B58 28a	B58 28b	B59 17a	B59 17b	B59 18a	B59 18b
sample Vol (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5
extraction Vol (mL)	5	3	3	3	3	3	3	3
470	0,0663	0,1215	0,1168	0,1172	0,0155	0,0222	0,0155	0,0088
666	0,0384	0,0707	0,0677	0,0694	0,0025	0,0345	0,0235	0,0086

Eksponentiell				
	C.au 19a	C.au 19b	C.au 20a	C.au 20b
sample Vol (mL)	5	5	5	5
extraction Vol (mL)	3	3	3	3
470	0,0066	0,0108	0,0089	0,0104
666	0,0067	0,0094	0,0091	0,0111

Stasjonær	10 °C							
	M24 1a	M24 1b	M24 2a	M24 2b	M78 3a	M78 3b	M78 4a	M78 4b
sample Vol (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5
extraction Vol (mL)	5	5	3	3	5	5	5	3
470	0,0944	0,0882	0,2142	0,2051	0,0953	0,084	0,1267	0,2174
666	0,0595	0,0555	0,1328	0,1306	0,0686	0,0632	0,0855	0,1549

Stasjonær	10 °C							
	M88 5a	M88 5b	M88 6a	M88 6b	M97 7a	M97 7b	M97 8a	M97 8b
sample Vol (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5
extraction Vol (mL)	5	5	5	3	3	3	3	3
470	0,0729	0,0662	0,0615	0,1141	0,2413	0,2366	0,2984	0,2727
666	0,0605	0,0571	0,0438	0,096	0,1478	0,1457	0,1891	0,1838

Stasjonær	10 °C							
	M107 9a	M107 9b	M107 10a	M107 10b	M117 1a	M117 1b	M117 2a	M117 2b
sample Vol (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5
extraction Vol (mL)	3	5	3	3	3	5	5	4
470	0,154	0,0836	0,1621	0,1643	0,7997	0,4545	0,4496	0,5633
666	0,1115	0,0625	0,1178	0,1212	0,3242	0,1899	0,1808	0,2299

Stasjonær	10 °C							
	M122 11a	M122 11b	M122 12a	M122 12b	M138 13 a	M138 13b	M138 14a	M138 14b
sample Vol (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5
extraction Vol (mL)	5	5	3	3	5	5	3	4
470	0,1653	0,2266	0,354	0,3656	0,1721	0,2194	0,338	0,2756
666	0,1314	0,1358	0,2302	0,2273	0,1296	0,1327	0,2295	0,1752

Stasjonær	10 °C							
	M139 15a	M139 15b	M139 16a	M139 16b	Iso 21a	Iso 21b	Iso 22a	Iso 22b
sample Vol (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5
extraction Vol (mL)	3	3	3	3	5	5	4	4
470	0,6047	0,5726	0,6251	0,6491	0,2908	0,2927	0,2816	0,3562
666	0,3154	0,3142	0,2924	0,3216	0,135	0,1338	0,1263	0,1671

Stasjonær	10 °C							
	Nanno 23a	Nanno 23b	Nanno 24a	Nanno 24b	P.tr 25a	P.tr 25b	P.tr 26a	P.tr 26b
sample Vol (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5
extraction Vol (mL)	5	3	3	3	5	5	5	4
470	0,0619	0,1173	0,116	0,108	0,2919	0,3052	0,2988	0,3919
666	0,0263	0,0516	0,0513	0,0497	0,1149	0,1232	0,1111	0,1568

Stasjonær	10 °C				10 °C			
		B58 27a	B58 27b	B58 28a	B58 28b	B59 17a	B59 17b	B59 18a
sample Vol (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5
extraction Vol (mL)	5	5	5	4	5	5	5	4
470	0,3153	0,3198	0,299	0,3897	0,1999	0,0776	0,2059	0,1727
666	0,1569	0,1557	0,1442	0,2065	0,3155	0,1283	0,3191	0,2531

Stasjonær				
		C.au 19a	C.au 19b	C.au 20a
sample Vol (mL)	5	5	5	5
extraction Vol (mL)	3	3	3	3
470	0,1788	0,1878	0,0884	0,1027
666	0,1698	0,1733	0,0855	0,0994

Eksponentiell	15 °C							
		M78 31a	M78 31b	M78 32a	M78 32b	M88 13a	M88 13b	M88 14a
sample Vol (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5
extraction Vol (mL)	3	3	3	3	3	3	3	3
470	0,1018	0,0995	0,0942	0,0885	0,1015	0,1068	0,1178	0,1322
666	0,0908	0,0886	0,0863	0,0814	0,0978	0,1005	0,1126	0,1298

Eksponentiell	15 °C							
		M97 33a	M97 33b	M97 34a	M97 24b	M117 37a	M117 37b	M117 38a
sample Vol (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5
extraction Vol (mL)	3	3	3	3	3	3	3	3
470	0,1385	0,1425	0,1215	0,1311	0,2188	0,2283	0,222	0,2388
666	0,0836	0,0865	0,073	0,0796	0,1214	0,1289	0,1301	0,1464

Eksponentiell	15 °C				15 °C			
		M122 15a	M122 15b	M122 16a	M122 16b	M138 17a	M138 17b	M138 18a
sample Vol (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5
extraction Vol (mL)	3	3	3	3	3	3	3	3
470	0,2471	0,2716	0,1933	0,2223	0,2184	0,2046	0,258	0,2533
666	0,2298	0,2331	0,1805	0,2012	0,2337	0,2214	0,2583	0,2549

Eksponentiell					15 °C			
	M139 19a	M139 19b	M139 20a	M139 20b	Iso 1a	Iso 1b	Iso 2a	Iso 2b
sample Vol (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5
extraction Vol (mL)	3	3	3	3	3	3	3	3
470	0,0838	0,0814	0,0766	0,08	0,1266	0,1263	0,1173	0,1259
666	0,0903	0,0892	0,0851	0,0893	0,0891	0,0875	0,0828	0,0899

Eksponentiell					15 °C			
	Nanno 3a	Nanno 3b	Nanno 4a	Nanno 4b	P.tr 5a	P.tr 5b	P.tr 6a	P.tr 6b
sample Vol (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5
extraction Vol (mL)	3	3	3	3	3	3	3	3
470	0,0225	0,0224	0,0406	0,0453	0,1325	0,1452	0,1481	0,1502
666	0,0171	0,0187	0,0321	0,0362	0,0913	0,0969	0,1037	0,1037

Eksponentiell					15 °C			
	B58 7a	B58 7b	B58 8a	B58 8b	B59 9a	B59 9b	B59 10a	B59 10b
sample Vol (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5
extraction Vol (mL)	3	3	3	3	3	3	3	3
470	0,0479	0,047	0,0648	0,0627	0,0124	0,0477	0,0137	0,026
666	0,037	0,0348	0,0454	0,0457	0,018	0,0712	0,0149	0,0336

Eksponentiell	15 °C			
	C.au 11a	C.au 11b	C.au 12a	C.au 12b
sample Vol (mL)	5	5	5	5
extraction Vol (mL)	3	3	3	3
470	0,0777	0,0577	0,0435	0,0346
666	0,0465	0,0523	0,0382	0,0309

Stasjonær	15 °C							
	M78 31a	M78 31b	M78 32a	M78 32b	M88 13a	M88 13b	M88 14a	M88 14b
sample Vol (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5
extraction Vol (mL)	3	3	3	3	4	4	4	4
470	0,6546	0,6342	1,1332	0,6418	0,5923	0,6007	0,6318	0,5729
666	0,3903	0,3722	0,5937	0,3928	0,2258	0,2242	0,2574	0,2562

Stasjonær	15 °C							
	M97 33a	M97 33b	M97 34a	M97 34b	M117 37a	M117 37b	M117 38a	M117 38b
sample Vo (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5
extraction Vol (mL)	4	3	3	4	3	3	3	3
470	0,2191	0,3122	0,2962	0,2268	0,5956	0,5975	0,5929	0,613
666	0,1132	0,1684	0,1546	0,1188	0,2013	0,2025	0,2032	0,214

Stasjonær	15 °C				15 °C			
	M122 15a	M122 15b	M122 16a	M122 16b	M138 17a	M138 17b	M138 18 a	M138 18b
sample Vol (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5
extraction Vol (mL)	4	4	4	4	4	3	4	5
470	0,576	0,5855	0,611	0,6065	0,4338	0,5637	0,5582	0,5048
666	0,2159	0,2074	0,2379	0,2391	0,1716	0,2206	0,2347	0,1937

Stasjonær					15 °C			
	M139 19a	M139 19b	M139 20a	M139 20b	Iso 1a	Iso 1b	Iso 2a	Iso 2b
sample Vol (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5
extraction Vol (mL)	4	3	4	4	4	4	4	4
470	0,3775	0,5021	0,3562	0,399	0,2257	0,2171	0,2529	0,2435
666	0,1927	0,2486	0,1953	0,2016	0,0877	0,0829	0,0966	0,0981

Stasjonær					15 °C			
	Nanno 3a	Nanno 3b	Nanno 4a	Nanno 4b	P.tr 5a	P.tr 5b	P.tr 6a	P.tr 6b
sample Vol (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5
extraction Vol (mL)	4	4	4	4	4	4	4	4
470	0,2177	0,2184	0,1616	0,1555	0,2315	0,2386	0,2289	0,2378
666	0,0537	0,0553	0,0288	0,0281	0,0856	0,0902	0,0886	0,0902

Stasjonær					15 °C				
	B58 7a	B58 7b	B58 8a	B58 8 b	B59 9a	B59 9b	B59 10a	B59 10b	B59 10b Dill
sample Vol (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
extraction Vol (mL)	4	4	4	4	4	4	4	5	15
470	0,2289	0,2345	0,2357	0,2305	0,6906	0,3973	0,3355	1,2561	0,4365
666	0,1208	0,1223	0,1227	0,1221	0,7246	0,4143	0,3711	1,3693	0,4598

Stasjonær	15 °C				
	C.au	C.au	C.au	C.au	C.au

	11a	11b	12a	12a Dill	12b
sample Vol (mL)	5	5	5	5	5
extraction Vol (mL)	3	3	5	15	5
470	0,7104	1,1351	2,2931	0,798	1,0495
666	0,4392	0,67	1,3218	0,4609	0,6037

Appendiks 2:

Statistikk:

Et eksempel på de forskjellige statistiske metodene jeg brukte, sjekking av alle stammene ble gjort på sammen måte som illustrert under.

#FETTSYRER

Tabell A7: Oversikt over EPA innholdet i mg/g DW for stammen M88 ved de to forskjellige temperaturene (eksponentiell fase til venstre, stasjonær fase til høyre)

mg/g DW						
Eksp	M88			M88		
Temp	EPA			Temp	EPA	
10	35,17566359			10	53,92850411	
10	34,90286214			10	51,63772599	
10	34,42883813			10	52,37255707	
10	33,13518086			10	55,30258623	
15	79,91585176			15	53,96766648	
15	77,56698887			15	54,16266857	
15	53,82847916			15	46,81626741	
15	57,15812114			15	45,99070127	

- Sjekker om EPA innholdet er signifikant forskjellig ved de to temperaturene

Eksponentiell fase:

R-Syntax:

```
M88e.df <- read.table('clipboard', header=T, dec=",")
```

```
attach(M88e.df)
```

```
t.test(EPA~Temp)
```

Resultatet sier: t = -4.8257, df = 3.0268, p-value = 0.01662

Stasjonær fase:

R-Syntax

```
M88s.df <- read.table('clipboard', header=T, dec=",")
```

```
attach(M88s.df)
```


t.test(EPA~Temp)

Resultatet sier: $t = 1.3009$, $df = 3.8008$, $p\text{-value} = 0.2665$

TFA:

Tabell A8: *Oversikt over det totale fettsyreinholdet i M78 i eksponentiell fase og stasjonær fase.*

Fase.M78	TFA.M78
Eksp	187,1973771
Eksp	174,585914
Eksp	126,7169315
Eksp	128,8935744
Stasj	363,6489044
Stasj	354,0287665
Stasj	463,7405585
Stasj	451,0595082

- Sjekker om total mengde fettsyrer per DW varierer mellom eksponentiell og stasjonær fase:

R-Syntax:

```
tfaM78.df <- read.table('clipboard', header=T, dec=",")
```

```
attach(tfaM78.df)
```

```
t.test(TFA.M78~Fase.M78)
```

Resultatet sier: $t = -7.7881$, $df = 4.6269$, $p\text{-value} = 0.0007903$