

Avfallsvann som et alternativt dyrkingsmedium for mikroalger med et høyt innhold av EPA og DHA



Sara Carolin Rundqvist

Masteroppgave i Biologi – Mikrobiologi



Institutt for Biologi

Universitetet i Bergen

Takk!

Tusen takk til alle som har hjulpet og støttet meg gjennom denne krevende prosessen.

Jeg vil ført og fremst takke mine veiledere Svein Rune Erga, for god hjelp, tålmodighet og lærerike samtaler, og Jeroen Hendrik de Vree for all inspirasjon og hjelp med den tekniske delen av eksperimentet. Jeg vil også takke Pia Steinrücken som hadde mulighet til å steppe inn som ekstra veileder. Takk for konstruktive og gode tilbakemeldinger, og all den gode hjelpen som måtte til for å få denne oppgaven i mål. Jeg vil også takke Svein Are Mjøs for hjelp med analyse av fettsyredata.

Til slutt vil jeg gjerne takke min familie, og da spesielt min samboer Kristian som har støttet meg gjennom denne travle og krevende prosessen med både sykdom, barn og et krevende masterprosjekt. Jeg kunne ikke klart det uten deg.

Takk for at jeg fikk muligheten til å jobbe med dette spennende prosjektet, det har vært en lærerik prosess.

Sara Carolin Rundqvist

Bergen 16.Juni 2020

Sammendrag

Mikroalger har mulighet til å danne flere ulike komponenter av kommersiell verdi. Av spesielt stor interesse er deres innhold av de flerumettede fettsyrene eikosapentaensyre (EPA) og dokosaheksaensyre (DHA). Disse fettsyrene utvinnes i dag først og fremst fra villfisk, som på grunn av økt etterspørsel er sterkt truet av overfiske. Storskalaproduksjon av mikroalger for å utvinne disse fettsyrene er imidlertid svært kostnadskrevende, og kan foreløpig ikke konkurrere med fiskeolje fra villfisk. Å bruke næringsrikt avfallsvann fra blant annet næringsmiddelindustri som vekstmedium for mikroalger har vist seg å kunne senke produksjonskostnadene med så mye som 10-30%. Avfallsvann kan dermed bli en viktig faktor for å gjøre storskalaproduksjon av mikroalger mere kostnadseffektivt, og dermed bidra til en mere holdbar og miljøvennlig produksjon av disse fettsyrene.

Hovedmålet med denne oppgaven er å undersøke om ulike avfallskilder fra næringsmiddelbedrifter (i Bergensområdet) kan erstatte det store nitrogen- og fosforbehovet som kreves ved storskalaproduksjon av mikroalger. Undersøkelsen rettet seg inn mot mikroalger som har vist seg å kunne ha et høyt innhold av de verdifulle fettsyrene EPA og DHA, og som er tolerante for variasjoner i salinitet og temperatur. For undersøkelsen ble syv avfallskilder valgt ut: mask og avfallsvann fra bryggerivirksomhet, avfallsvann fra meieri, ekskret og skall fra larveproduksjon (bløme), fiskeslam og fiskeblod fra fiskeforedlingsvirksomheter og kloakk fra BiR. Disse avfallskildene ble testet mot de tre mikroalgartene *Microchloropsis gaditana* (Prasinophyceae), *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) og *Tetraselmis Suecica* (Eustigmatophyceae). Forsøket var inndelt i en innledende- og en hovedscreening, og ble gjennomført i batch kulturer. I innledende screening ble hver avfallskilde testet ut ved fire ulike konsentrasjoner mot hver algart. Hvor godt algene vokste på de ulike avfallskildene ble bedømt ut ifra en subjektiv vurdering av fargeutvikling på kulturene. De fem mest lovende avfallskildene fiskeslam, fiskeblod, kloakk, bløme og mask, sammen med de to mest lovende algene, *P. tricornutum* og *T. suecica*, ble testet videre i hovedscreeningen. Her ble algene kultivert i 300 mL dyrkningsrør, og med konstant temperatur og lysintensitet på henholdsvis 16°C og 300 $\mu\text{mol fotoner m}^{-2}\text{s}^{-1}$. De to artene ble kultivert med to ulike avfallskonsentrasjoner, en lav og en høy konsentrasjon og med to paralleller. Det ble daglig målt optisk tetthet ved 750 nm (OD 750), og pH annenhver dag i de ulike kulturene. Prøver for bestemmelse av tørrvekt og fettsyreinhold ble tatt både i eksponentiell og stasjonær vekstfase. Resultatene viste vekst hos både *P. tricornutum* og *T. suecica* på alle testede avfallskilder og konsentrasjoner. For begge algene var det en markant bedre vekst med bløme sammenlignet med de andre avfallskildene. *P. tricornutum* oppnådde også vekstratekriteriet på $\geq 0.7 \text{ d}^{-1}$ med denne avfallskilde ($0.7 \pm 0.0 \text{ d}^{-1}$). *T. suecica* oppnådde bare en vekstrate på $0.5 \pm 0.0 \text{ d}^{-1}$, men hadde likevel en svært høy celletetthet i slutten av

eksperimentet med dette vekstmediet. Minimumskriteriet for relativ mengde EPA av totale fettsyrer (TFA) for *P. tricornutum* og *T. suecica* på henholdsvis 13% og 5% ble bare oppnådd med bløme som vekstmedium. *P. tricornutum* og *T. suecica* oppnådde et relativt EPA-innhold på henholdsvis $24. \pm 0.1\%$ og $5.6 \pm 0.2\%$ i stasjonær fase med dette vekstmediet. DHA ble bare dannet i mindre mengder, og bare av *P. tricornutum*. Størst relativt innhold av DHA var på bløme med $3.9 \pm 0.5\%$. De lovende resultatene med bløme som vekstmedium er med stor sannsynlighet knyttet til dets høye innhold av nitrogen og fosfor. De øvrige avfallskildene hadde et generelt lavt innhold av disse næringsstoffene og man oppnådde også generelt lav vekst. I videre forsøk vil det derfor være nødvendig å ha høyere konsentrasjoner av disse avfallskildene. Også muligheten for å kombinere ulike avfallskilder bør undersøkes nærmere. Eksempelvis kultivering av mikroalger på overflødig CO₂ gass fra ulike industrier, for ytterligere å senke produksjonskostnadene og gjør produksjonen mer klimavennlig. For å oppnå en mest mulig kostnadseffektiv og bærekraftig produksjon er også valg av alge viktig. Mikroalger fra nordlige farvann har vist svært lovende resultat, med både høy vekst og et høyt innhold av PUFAer. Både lavere produksjonskostnader og valg av egnede algearter vil være viktige steg i retning av en mer kostnadseffektiv produksjon som på sikt kan bidra til en mer miljøvennlig og bærekraftig produksjon av EPA og DHA.

Innholdsfortegnelse

Takk!	2
Sammendrag	3
Forkortelser	8
1 Introduksjon	9
1.1 Mål	10
2 Teoretisk bakgrunn	11
2.1 De utvalgte algeartene	11
2.2 Lipider og fettsyrer	13
2.3 Viktige faktorer som må vurderes for storskalaproduksjon av mikroalger.....	16
2.3.1 pH	19
2.3.2 Saltkonsentrasjon.....	19
2.3.3 Vekstfaser.....	20
2.3.4 Kultiveringssystem for storskalaproduksjon av mikroalger	20
2.4 Håndtering av avfallsvann	22
2.5 Bruk av avfallsvann ved produksjon av mikroalger	22
3 Materiale og metoder	24
3.1 Mikroalger, avfallskilder og mediepreparering.....	24
3.2 Innledende screening	30
3.2.1 Forberedelser	30
3.3 Hovedscreening.....	32
3.3.1 Klargjøring av dyrkningsrør og vekstmedium.....	32

3.3.2	Eksperimentoppsett, klargjøring og prøvetaking	33
3.4	Analytiske metoder:	34
3.4.1	Optisk tetthet (OD).....	34
3.4.2	Tørrvekt.....	35
3.4.3	Fettsyrer	36
3.4.4	pH	37
3.4.5	Nitrat, fosfat og ammonium i avfallskildene	37
3.4.6	Mikroskopi og kamera.....	38
3.4.7	Statistikk	39
4	Resultat.....	40
4.1	Resultat, innledende screening	40
4.1.1	Seleksjon av mikroalger og avfallsvann.....	40
4.2	Resultat, hovedscreening	43
4.2.1	Vekst.....	44
4.2.2	Tørrvekt.....	49
4.2.3	Fettsyrer	50
4.2.4	Innhold av nitrat, fosfat og ammonium	57
4.2.5	pH.....	58
5	Diskusjon.....	60
5.1	Vekst.....	60
5.2	Fettsyrer.....	64
5.3	Videre arbeid og forslag til metodiske forbedringer.....	67
6	Konklusjon	69

7 Kilder	70
Appendiks 1:	83
WUR medium	83
OD 750	84
Tørrvekt	88
Tørrvektestimater	93
Appendiks 2:	94
Statistikk:	94
Ammoniumkonsentrasjon i forsøkskulturene	95

Forkortelser

ARA	Arakidonsyre
CO₂	Karbondioksid
DHA	Dokosaheksaensyre
EPA	Eikosapentaensyre
FAME	Fettsyre-metylester
TFA	Totale fettsyrer
LcPUFA	Lang-kjedete flerumettede fettsyre
mg	Milligram
mL	Milliliter
NL	Nøytrale lipider
OD	Optical density (optisk tetthet)
PL	Polare lipider
PUFA	Polyunsaturated fatty acid (flerumettede fettsyrer)
rpm	Omdreininger per minutt
TAG	Triacylglyserol

1 Introduksjon

Mikroalger er encellede organismer, som ved hjelp av fotosyntese omdanner solenergi til kjemisk energi. Med sin raske vekst og høye innhold av fettsyrer, proteiner og karbohydrater, er mikroalger en lovende råvare for blant annet storproduksjon av kost- og fôrtilskudd, kjemikalier og biodrivstoff (Spolaore et al., 2006).

Siden menneskekroppen bare i svært liten grad klarer å syntetisere EPA og DHA (Emken et al., 1994), er vi avhengig av å få tilført disse essensielle fettsyrene gjennom kosten (Frøyland et al., 2011). Marin fisk er i dag den største kilden til EPA og DHA. Det er mikroalger som produserer disse fettsyrene, som blir ført oppover i den marine næringskjeden, og til slutt ender opp i fisken. Mer enn halvparten av fisken som i dag konsumeres globalt kommer fra oppdrettsfarmer (Stanford University, 2009). For å oppnå et tilfredsstillende høyt nivå av EPA og DHA i oppdrettsfisk blir fiskeforet tilsatt fiskeolje som er utvunnet av villfisk grunnet sitt innhold av disse essensielle fettsyrene (Nasopoulou and Zabetakis, 2012). Imidlertid har den økende etterspørselen etter marin fiskeolje ført til mangel på denne begrensede ressursen (Francis et al., 2001, Chauton et al., 2015). Fiskeindustrien har derfor sett etter alternative kilder. Til nå har de mest vellykkede alternativene vært plantebaserte oljer som soya og solsikke, grunnet sin gunstige pris og gode tilgjengelighet. Bruken av slike plantebaserte oljer har imidlertid sine begrensninger. De fleste plantebaserte oljene har et lavt innhold av de essensielle fettsyrene (EFA), som resulterer i en mindre gunstig fettsyrekomposisjon i oppdrettsfisken (Bell et al., 2001, Torstensen et al., 2005). Flere mikroalger produserer naturlig EPA og DHA, og har derfor blitt viet stor interesse fra fiskeindustrien, da bruk av disse fettsyrene kan føre til bedre fôrkvalitet og en mer bærekraftig akvakulturnæring (Hemaiswarya et al., 2011, Sudeshna and Ruma, 2015). Storskalaproduksjon av mikroalger som fettsyretilskudd til fiskefôr har imidlertid vist seg å være svært kostnadskrevende, og kan foreløpig ikke konkurrere med fiskeolje (Chauton et al., 2015, Shah et al., 2018). Produksjonen av mikroalger må derfor gjøres mer kostnadseffektiv for å kunne være et reelt alternativ til fiskeolje i dagens marked. Et skritt i riktig retning kan være å bruke ikke-toksisk avfallsvann som næring til mikroalgene for å senke produksjonskostnadene.

På grunn av den økende matvareproduksjonen og næringsmiddelvirksomheten, øker mengden avfallsvann som produseres både i Norge og på verdensbasis (Abdel-Raouf et al., 2012). Avfallsvann har som oftest et høyt næringsinnhold, og slippes dette ut i akvatiske miljø uten forsvarlig behandling, kan overskudd av næring (hovedsakelig nitrogen og fosfor) blant annet føre til eutrofiering, som kan ha en rekke uheldige effekter på miljøet (Anderson et al., 2002). Det finnes i dag flere metoder som er utviklet for å håndtere det vide spekteret av avfallsvann. Disse inkluderer

blant annet fysiske, kjemiske og biologiske behandlingsmetoder (Mobin and Alam, 2014). Både fysiske- og kjemiske behandlingsmetoder krever imidlertid store mengder energi og kjemikalier, og er forbundet med store kostnader (Christenson and Sims, 2011). Det er derfor et stadig økende behov for en mer økonomisk, men også mer miljøvennlig metode å håndtere avfallsvannet på. Dersom avfallsvann benyttes som vekstmedium vil dette kunne senke kostnadene til mikroalgekultivering og avfallsvann kan bli en ressurs istedenfor en kostnad. Bruk av avfallsvann som næringskilde til mikroalger har blitt estimert til å kunne senke produksjonskostnadene med så mye som 10-30% (Park et al., 2011). Fosfor, som er en begrenset og viktig ressurs, brukes i stort omfang innen landbruksnæring, men den vil med dagens voksende forbruk til slutt gå tom (Gross, 2010). Det er derfor et stort behov for metoder som kan brukes til å gjenvinne fosfor fra blant annet avfallsvann.

Ved bruk av saltvannsalger vil algene heller ikke legge beslag på ferskvann under kultivering, og vil dermed ikke konkurrere med landbruksnæringen om denne ressursen. Algekultivering ser altså ut til å være svært lovende på flere nivå, men det er også flere fordyrende ledd ved produksjonen (Tredici et al., 2016). Et steg i riktig retning vil imidlertid være å redusere kostnadene knyttet til næringsbehov gjennom å koble mikroalge biomasseproduksjon med avfallsvann-håndtering.

1.1 Mål

Det overordnede målet med denne oppgaven er å undersøke om ulike avfallskilder fra næringsmiddelbedrifter kan erstatte det store nitrogen- og fosforbehovet som kreves ved storskalaproduksjon av mikroalger. Undersøkelsen vil rette seg inn mot mikroalger med et antatt høyt innhold av de verdifulle fettsyrene EPA og DHA, som på sikt kan være med på å bidra til utviklingen av bedre og mer bærekraftig fôr innen akvakulturnæringen. Fokus i arbeidet vil være å undersøke hvilke avfallskilder og konsentrasjon som er den mest gunstige for algekultivering, og om de testede artene har et tilstrekkelig innhold av de flerumettede fettsyrene EPA og DHA etter kultivering med de ulike avfallskildene.

Som et første ledd i å undersøke muligheten for å dyrke mikroalger på avfallsvann vil det bli utført en innledende screening, hvor syv innsamlede avfallskilder vil bli testet mot de tre mikroalgeartene: *Phaeodactylum tricornutum* (B58), *Microchloropsis gaditana* (CCMP526) og *Tetraselmis suecica* (UTEX LB 2286). Disse algene har i tidligere studier kunnet vise til høy vekstrate og fettsyreinhold, samt at de er robuste og lette å dyrke (Qiao et al., 2016, Otero and Fábregas, 1997, Jinkerson et al., 2013, Prestegard et al., 2016). Deretter følger en hovedscreening, hvor de mest lovende avfallskildene og algene fra innledende-screening vil bli undersøkt videre, med vekt på algenes vekst og deres EPA og DHA-produksjon.

2 Teoretisk bakgrunn

2.1 De utvalgte algartene

Alger er en samlebetegnelse på en svært sammensatt gruppe encellede og flercellede organismer, som har det til felles at de lever i et fuktig miljø og har fotosyntese (Egeland, 2018). Det er en svært divers gruppe, både når det gjelder størrelse og morfologi. Fra de minste, picoplankton på bare 0.2-2.0 μm til kjempetare som kan bli opptil 60 m lang (Barsanti and Gualtieri, 2006). Alger deles inn i to hovedgrupper. Den ene er makroalger, som blant annet omfatter makroskopiske og flercellede marine alger, også kjent som tang og tare (Pedersen, 2012), og den andre gruppen er encellede mikroalger.

Mikroalger har med sin unike metabolske plastisitet kunnet tilpasse seg de fleste miljø (Barsanti and Gualtieri, 2006, Guedes et al., 2011). De er fremfor alt viktige som primærprodusenter i akvatiske miljø. Det vil si produksjon av organisk materiale gjennom fotosyntese. Under denne prosessen dannes det store mengder oksygen, som utgjør mye av det oksygenet man finner i atmosfæren. I tillegg omgjøres store mengder uorganisk karbon til organisk karbon, som blant annet danner næringsgrunnlaget for den akvatiske næringskjeden og dermed for størsteparten av livet i havet (Egeland, 2018). De fleste mikroalger er fotoautotrofe. Noen er også heterotrofe, som vil si at de benytter seg av organisk karbon fra omgivelsene som energikilde. Begge strategiene har sine fordeler og ulemper. Heterotrofi er en god strategi under dårlige lysforhold, mens autotrofi er fordelaktig under begrenset tilgang på organisk materiale. For å kompensere for ulike miljøforhold kan noen alger veksle mellom ulike strategier ved å kombinere autotrof og heterotrof vekst. Dette kalles mixotrofi (Barsanti and Gualtieri, 2006). Under dette forsøket ble det benyttet fotoautotrofe alger. En stor fordel med dette er at biomasse produseres ved bruk av CO_2 , i motsetning til heterotrofe alger som må tilføres organisk karbon, noe som kan øke produksjonskostnadene. I tillegg er det rapportert lavere innhold av proteiner og pigmenter ved heterotrof algevekst, som dermed kan senke algebiomassens kommersielle verdi (Barros et al., 2019). Mange forbinder alger med den typiske grønne fargen, men de forekommer i et vidt spekter av farger og fargetoner. Det er mikroalgers innhold av ulike typer pigmenter som skaper disse forskjellene. Pigmentene kan deles inn i de tre hovedklassene: klorofyll, karotenoider og fykobiliner. Klorofyll kan igjen deles inn i tre undergrupper: klorofyll *a*, *b*, og *c*. Alle alger inneholder klorofyll *a*, men ikke alle inneholder klorofyll *b* og *c* (Barsanti and Gualtieri, 2014). Klorofyll absorberer hovedsakelig i den blå og røde delen av det elektromagnetiske spekteret, og gir dermed algene sin karakteristiske grønne farge (Barsanti and

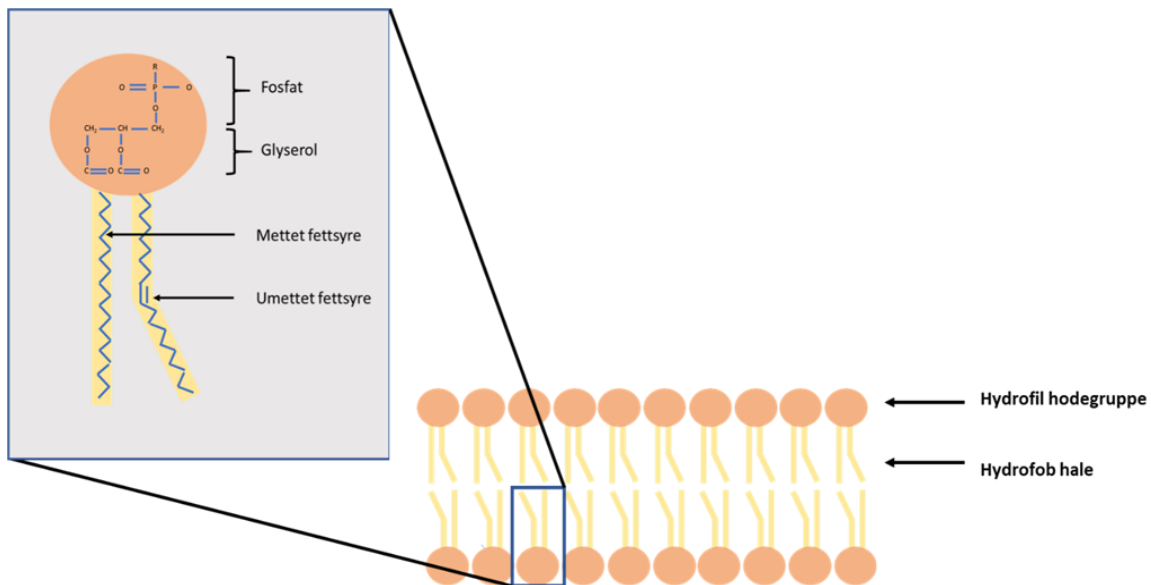
Gualtieri, 2014). Pigmentene karotenoider og fykobiliner kan imidlertid i større eller mindre grad maskerer grønnfargen klorofyllet ellers ville gitt (Barsanti and Gualtieri, 2014). Karotenoider er en gruppe gule, oransje, røde og brune pigmenter som blir syntetisert i alle fotosyntetiserende organismer (Christaki et al., 2013). Fykobilinene absorberer lys i den grønne og gule delen av spekteret, altså i det området som i liten grad absorberes av klorofyll (Universitetet i Oslo, 2011).

P. tricornutum, som er en av de tre algeartene som ble benyttet under forsøket, tilhører klassen Bacillariophyceae (Diatomeer), og inneholder både klorofyll *a* og *c*, og karotenoidet fucoxanthin som gir algene sin brune farge (Kumar et al., 2015). Denne arten kan man finne både i marine- og brakkvannmiljø over hele verden (Martino et al., 2007). Av kommersiell interesse er *P. tricornutum* sin evne til å akkumulere store mengder EPA og noe DHA, og dens høye innhold av proteiner. Den blir blant annet benyttet innen akvakulturnæringen, som fôr til fiskelarver og bløtdyr (Pudney et al., 2019). Det er også gjort interessante funn hvor komponenter fra denne arten har vist seg å inneholde krefthemmende forbindelser (Herfindal et al., 2009). Den andre algen som ble undersøkt, *M. gaditana*, tidligere kjent som *Nannochloropsis gaditana*, tilhører klassen Prasinophyceae. Denne klassen blir sett på som den mest primitive innen grønne alger, og har en relativt enkel cellestruktur, som blant annet består av en enkelt mitokondrie og kloroplast (Not et al., 2004, Palenik et al., 2007). Klassen består hovedsakelig av arter som lever i kystmiljø (Simionato et al., 2013). *M. gaditana* er en kommersielt mye brukt algeart, grunnet sin høye vekstrate, høye lipid- og EPA innhold og sin gode toleranseevne for ulike miljø, som blant annet har gjort den til en lovende kandidat for biodieselproduksjon (Rodolfi et al., 2009, Abomohra et al., 2017, Ma et al., 2014, Guschina and Harwood, 2006). *M. gaditana* inneholder også flere pigmenter av kommersiell verdi som klorofyll *a*, betakaroten, violaxthin, og astaxantin (AlgaSpring, 2018, Lubián et al., 2000). Den tredje algen som ble benyttet var *T. suecica*, en grønnalge innen klassen Eustigmatophyceae, som er å finne i både tidevannsbasseng og det åpne hav (Guiry and Guiry, 2020). Denne arten er mye brukt innen akvakulturnæringen som fôr til mollusker og krepsdyrlarver, grunnet sitt høye PUFA-innhold, og da spesielt EPA (Sansone et al., 2017). Arten er også ideell for storskalaproduksjon, da den har evne til å tilpasse seg store svingninger i salinitet og temperatur (Fabregas et al., 1984, Okauchi and Fukusho, 1984). I tillegg har den et høyt innhold av verdifulle pigmenter, som blant annet har vist evne til å redusere psoriasislesjoner og øke hårveksten. Arten er også rik på vitamin E (Carballo-Cárdenas et al., 2003, Sansone et al., 2017).

2.2 Lipider og fettsyrer

Mikroalger sine lipider er i et kommersielt perspektiv, svært verdifulle komponenter som er av særlig interesse for blant annet biodrivstoffindustrien, akvakulturnæringen og mat- og helsesektoren (Martins et al., 2013). Lipider kan deles inn i de fem klassene: triacylglyseroler, voksesterer, fosfoglyserider, sfingolipider og steroler. Med unntak av steroler inneholder alle de overnevnte klassene fettsyrer. Fosfoglyserider, glyserol glyserid og steroler utgjør viktige komponenter i mikroalgers cellemembran. Blant annet gjennom å opprettholde membranfunksjon, permeabilitetsbarriere og fluiditet (Guschina and Harwood, 2013). Under stressende eller ugunstige forhold vil mange mikroalger hovedsakelig syntetisere triacylglyseroler (TAG) som lagres i cellens cytoplasma. Triacylglyseroler fungerer som energi- og karbonlagring for mikroalger, og kan utgjøre så mye som 50% av tørrvekten (Hu et al., 2008).

Alle lipidmolekyler som utgjør cellemembranen har en hydrofil (vannelskende) og en hydrofob (vannavvisende) ende. Som illustrert i figur 2-1, er lipidene plassert slik at den hydrofobe regionen av lipidet peker innover og er beskyttet av den hydrofile regionen som er i kontakt med miljøet rundt (Alberts et al., 2002).



Figur 2-1: Skjematisk fremstilling av en thylakoidmembran med fosfolipider, hvor den hydrofile hodegruppen og den hydrofobe halen er markert, samt et forstørret utsnitt av et fosfolipidmolekyl, hvor man har det hydrofile hodet som består av fosfat og glyserol, og en hydrofob hale av fettsyrer. Den bøyde fettsyren er en umettet fettsyre mens den rette er en mettet fettsyre. Laget av Sara Carolin Rundqvist (Illustrasjon gjengitt fra OpenStax Biology).

Av de ovennevnte lipidene er det fosfolipider, en glyserolbasert fosfoglyserid, som utgjør majoriteten av lipidene i cellemembranen (Alberts et al., 2002). Halen til lipider består vanligvis av to fettsyrer, som vanligvis inneholder mellom 14 og 24 karbonatomer. Den ene halen har vanligvis ingen dobbeltbindinger, mens den andre halen inneholder en eller flere dobbeltbindinger (Alberts et al., 2002).

Alle fettsyrer består av en kjede med karbonatomer som har en karboksylgruppe (COOH) i den ene enden av kjeden, og en metylgruppe (CH₃) i den andre enden. Fettsyrer kan ha ingen, en eller flere dobbeltbindinger. Med én dobbeltbinding kalles fettsyren monoumettet (enumettet), med flere dobbeltbindinger, flerumettet (PUFA) og ingen dobbeltbindinger, mettet fettsyre (Figur 2-2) (Lande, 2018).

Mettet fettsyre (ingen dobbeltbinding)



Enumettet fettsyre (en dobbeltbinding)

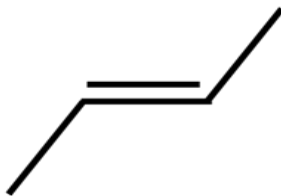


Flerumettet fettsyre (flere dobbeltbindinger)

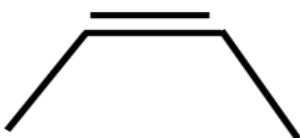


Figur 2-2: Skjematisk fremstilling av ulike fettsyrer. Mettede fettsyrer har ingen dobbeltbindinger, enumettede fettsyrer har en dobbeltbinding, mens flerumettede fettsyrer har flere dobbeltbindinger. Laget av Sara Carolin Rundqvist

Trans-form (rett form)



Cis-form (bøyd form)



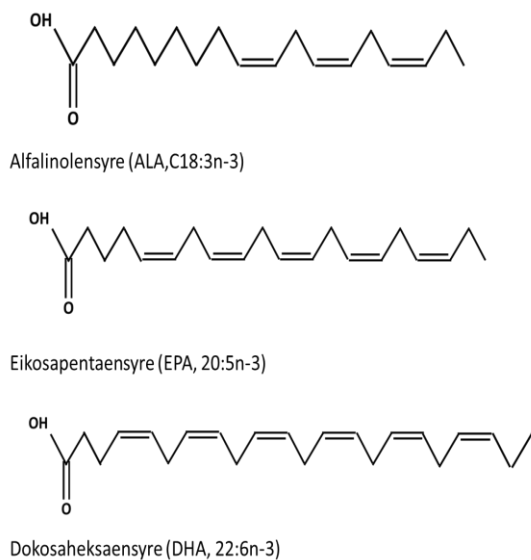
Figur 2-3: Skjematisk fremstilling av dobbeltbinding i umettede fettsyrer. Båndene finner man i de to formene trans og cis. Laget av Sara Carolin Rundqvist

Nesten alle dobbeltbindinger i naturlig forekommende fettsyrer er cis-dobbeltbindinger, som danner en knekk i fettsyren (Figur 2-3). Fettsyren kan også ha dobbeltbinding i trans-konfigurasjon. Knekken er imidlertid ikke like uttalt i denne posisjonen. Det er disse knekkene som påvirker hvor tett fettmolekylene kan pakkes sammen, og påvirker dermed membranens fluiditet (Reece and Campbell, 2011). Cis-fettsyrer kan ikke pakkes like tett som trans-fettsyrer, og kan derfor opprettholde fluiditet over et større temperaturspekter (Reece and Campbell, 2011).

Posisjonen til den første dobbeltbindingen er også en måte å beskrive fettsyren. For eksempel forteller 20:5n-3 (EPA) at fettsyren består av 20 karbonatomer, har 5 dobbeltbindinger og at den første dobbeltbindingen er plassert på det tredje karbonatomet regnet fra metylgruppen, og kalles derfor en

omega-3 fettsyre (Figur 2-4) (Sargent et al., 2002). Tilsvarende har en omega-6 fettsyrer den første dobbeltbinding plassert seks karbonatomer regnet fra metylenden.

Inntak av både omega-3 og 6 har vist seg å ha flere helsefremmende effekter. Blant annet har inntak av omega-3 fettsyrene EPA og DHA vist seg å kunne gjør kroppen mer motstandsdyktig mot tilstander som, diabetes, leddgikt, åreforkalkninger og andre autoimmune og inflammatoriske sykdommer (Zivkovic et al., 2011). EPA og DHA er også essensielle under fosterutvikling, og inntak av disse



Figur 2-4: Skjematisk fremstilling av de tre omega-3 fettsyrene ALA, EPA og DHA. Laget av Sara Carolin Rundqvist.

fettsyrene som supplement under graviditet har blitt koblet til lavere risiko for å utvikle allergier (Furuhjelm et al., 2009). Alfalinolensyre (ALA) som man finner i ulike planter kan omdannes til EPA og DHA i kroppen (Svihus, 2020, Vaaje-Kolstad, 2014). Evnen til å omdanne disse fettsyrene er imidlertid svært begrenset, og tilførsel gjennom kosten er derfor nødvendig (Swanson et al., 2012). Som tidligere nevnt er hovedkilden til disse fettsyrene blant annet fet fisk, som akkumulerer disse fettsyrene gjennom kosten. Mange mikroalger er primærprodusenter av EPA og DHA, og blir sett på som den mest lovende, og også mest bærekraftige erstatningen for fiskeoljen som i dag blir tilsatt foret til oppdrettsfisk for å dekke behovet for disse fettsyrene (Chauton et al., 2015). Mikroalger sin sammensetning og produksjon av fettsyrer varierer imidlertid stort mellom ulike arter. Noen produserer både EPA eller DHA, mens andre igjen inneholder begge fettsyrene. Det er imidlertid flere mikroalger som hverken produserer EPA eller DHA, og mengden som produseres varierer også fra art til art (Adarme-Vega et al., 2012). Eksempelvis er det funnet EPA-verdier helt nede i 0.11 og 0.4% av tørrvekten hos henholdsvis *Oocystis sp.* og *Rhodospirellula baltica* (Patil et al., 2007), og DHA på 0.03 av tørrvekt for *Rhodomonas salina* (Peltomaa et al., 2017). I andre enden av skalaen finner man eksempelvis *M. gaditana*, hvor man har registrert EPA-innhold på mellom 2.8-4.3% av tørrvekt (Camacho-Rodríguez et al., 2013, Pal et al., 2011) og DHA innhold på 3.3% av tørrvekt for *thraustochytrid Aurantiochytrium sp.* (Jakobsen et al., 2008). Også ytre faktorer som lys, næring og temperatur påvirker algers fettsyresammensetning (Breuer et al., 2012, Hu et al., 2008). Alger som er tilpasset lave temperaturer vil potensielt kunne ha et høyere innhold av EPA og DHA, ettersom lave temperaturer

er antatt å øke forekomsten av umettede fettsyrer for å kunne opprettholde membranfluiditet og funksjon (Boelen et al., 2013). Kaldtlevende alger kan dermed være egnede kandidater for kommersiell EPA og DHA produksjon. Et høyt innhold av de essensielle fettsyrene er spesielt utbredt innen grupper som diatoméer, svepeflagellater og dinoflagellater (Volkman et al., 1989, Tonon et al., 2002, Mansour et al., 2005).

2.3 Viktige faktorer som må vurderes for storskalaproduksjon av mikroalger

For å oppnå høy algebiomasse under kultivering er det flere faktorer å ta hensyn til. Både fysiske, kjemiske og biologiske parametere spiller inn. De viktigste er lys, temperatur, omrøring, karbondioksidtilgang, pH, næringskonsentrasjon, giftige forbindelser samt bakterievekst og virus. (Tebbani et al., 2014).

Lys er energikilden mikroalger bruker for fotosyntese ved autotrof vekst. Kilden kan være sollys eller kunstig lys fra f.eks. fluorescensrør eller LED-lys som avgir lys med spesifikke bølgelengder (Tebbani et al., 2014). Mikroalgers fotosyntetiske aktivitet endrer seg i takt med lysintensiteten. Aktiviteten er lav ved lite lys, og øker ved økende lysintensitet, helt til den når et metningspunkt. Etter dette punktet vil ikke lenger økt lysintensitet føre til høyere fotosyntetisk aktivitet. For høy lysintensitet vil skade det fotosyntetiserende apparatet, og føre til at den fotosyntetiske aktiviteten synker (Griffiths, 2013). En av utfordringene under algekultivering er å sikre at alle algecellene blir eksponert for optimal lysmengde. Dette problemet er hovedsakelig forårsaket av selvskygging i tette kulturer og/eller forekomsten av partikler i dyrkingsmediet, som man blant annet kan finne i avfallsvann (Larsdotter, 2006, Mobin and Alam, 2014). For å forhindre lysbegrensning kan bruk av dyrkningssystemer med et høyt overflate til volum forhold, og tilstrekkelig miksing av algebiomassen være effektivt (Larsdotter, 2006). I Norge er det store forskjeller i antall lystimer og lysintensitet mellom sommer og vinter. Målinger fra Florida målestasjon i Bergen viser at det gjennomsnittlig er 189 soltimer i juni (antall timer lys/mørke = 19/5) som er den måneden med flest soltimer, mens gjennomsnittet for desember (antall timer lys/mørke = 6/18) bare ligger på 12 timer (Hentet fra eKlima). Det vil derfor kunne by på utfordringer med utendørs kultivering av mikroalger i Norge, da lysintensitet og antall soltimer vil være betraktelig lavere under vinterhalvåret.

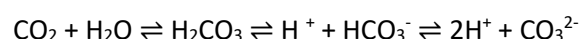
I likhet med lys har også temperatur en stor innvirkning på mikroalgers vekst (Béchet et al., 2010). Med økende temperatur vil også vekstraten øke til den har nådd optimal temperatur. Overstiges optimaltemperaturen vil veksten igjen falle (Forján et al., 2015). Hva som er optimal veksttemperatur varierer fra algeart til algeart. Mange mikroalgerarter klarer imidlertid å utføre både

celledeling og fotosyntetisering over et stort temperaturspekter som strekker seg fra -2 til 30 °C. Optimale temperaturer ligger likevel ofte mellom 20-25 °C (Li, 1980). Temperatur har også en direkte innvirkning på cellens lipidsammensetning. Ved temperaturer under optimalt nivå vil dannelsen av umettede fettsyrer trigges for å kunne opprettholde stabilitet og fluiditet av membranene. Dette beskytter i sin tur det fotosyntetiske apparatet mot fotoinhibering (Nishida and Murata, 1996). Tilsvarende vil innholdet av umettede fettsyrer minke med økende temperatur (Xin et al., 2011).

Vekstmediets sammensetning er en annen viktig faktor som har en signifikant innvirkning på vekstrate og biomasseproduksjon. Foruten de essensielle makronæringene fosfor, nitrogen, karbon og silisium for diatomeer, trenger mikroalger også flere ulike ioner (K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ og Cl⁻), og mikronæringsmetaller (Fe, Mn, Co, Cu og Mo) for vekst (Sunda et al., 2005). Disse næringsstoffene finnes i algenes naturlige habitat, men i begrensede mengder. For å oppnå høy tetthet under algekultivering er det derfor nødvendig å tilsette en mer konsentrert mengde næring. Mangel på et eller flere av næringsstoffene vil kunne minke produktivitet og vekst. Dette er et begrep kjent som Liebig's «Lov om minimum» hvor vekst ikke er kontrollert av den totale mengden næring til stede, men derimot av det næringsstoffet som er mest i underskudd med hensyn til plantens behov (Barsanti and Gualtieri, 2006).

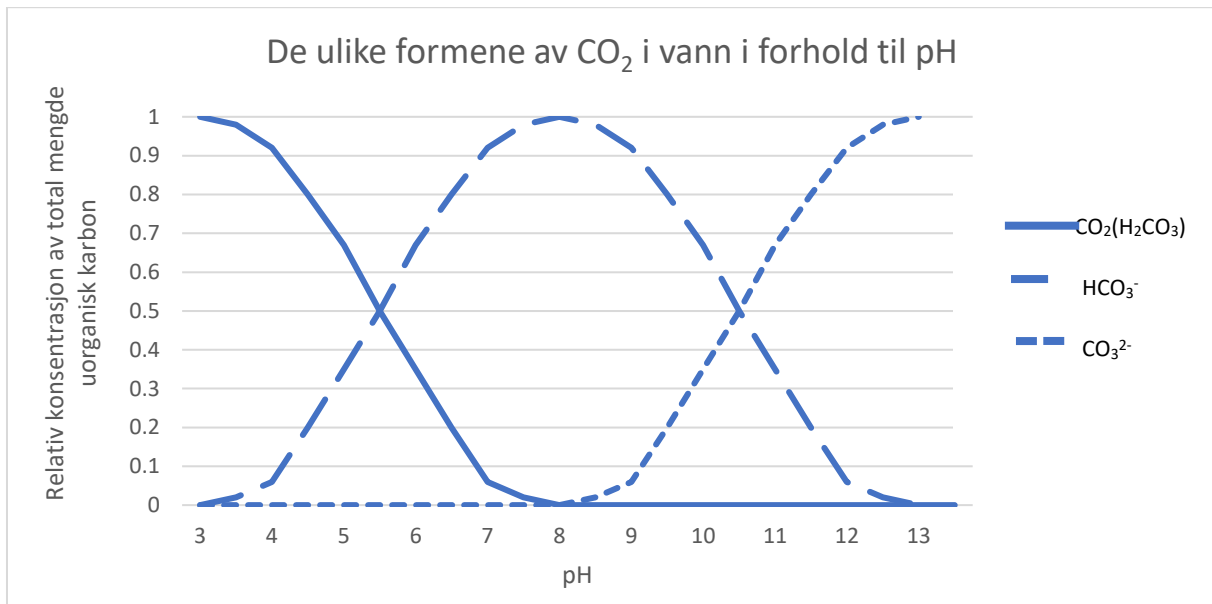
Fotoautotrofe alger bruker karbondioksid (CO₂) ved fotosyntese (Grobbelaar, 2008). I vann er karbon hovedsakelig tilstede i de tre hovedformene karbonsyre (H₂CO₃), bikarbonat (HCO₃⁻) og karbonat (CO₃²⁻) (Gattuso and Hansson, 2011). Når atmosfærisk CO₂ reagerer med vann dannes det karbonsyre, som mikroalgene kan nyttiggjøre seg av. Når karbonet forbrukes under fotosyntese vil imidlertid mengden oppløst CO₂ i kulturen minke, og dette vil føre til en økning i kulturens pH. Økt pH fører til en forskyvning i likevektssystemet (Figur 2-5) (Källqvist, 1999). Når pH øker protolysers karbonsyre (kjemisk reaksjon der et proton (H⁺) tas opp eller avgis). I første trinn avgir karbonsyre et H⁺ ion, og danner bikarbonat, i det neste trinnet avgis det enda et H⁺ ion og det dannes karbonat (se ligning 2) (Kirchman, 2012). Ved pH verdier over 9 er mesteparten av det uorganiske karbonet i form av karbonat. Dette kan ikke algene nyttiggjøre seg av, og fører dermed til karbonbegrenset vekst (Borowitzka, 1998, Larsdotter, 2006).

(2)



I sjøen vil atmosfærisk CO₂ erstatte det karbonet algene tar opp, under algekultivering er imidlertid denne CO₂ kilden ikke tilstrekkelig (Källqvist, 1999). Dette kan løses ved å boble kulturene med luft

tilsatt 1-5 % CO₂, som senker pH i kulturen (Fogg, 1975). Tilførsel av CO₂ kan være kostbart, og det er av den grunn gjennomført flere forsøk med «overskudds» CO₂ fra industrivirksomhet under mikroalgekultivering for å senke disse kostnadene (Haarstad and Rusten, 2016, Zhang, 2015).



Figur 2-5: Karbonatsystemet, viser hvilken form av karbon som er tilgjengelig i vann ved ulike pH-verdier. Y-aksen viser den relative konsentrasjonen av total mengden uorganisk karbon, mens x-aksen viser de ulike pH-verdiene. Figur laget av Sara Carolin Rundqvist.

Av alle næringsstoffene som trengs for vekst, er nitrogen (N) den viktigste etter karbon (Grobbelaar, 2008). Nitrogen trengs i store mengder, og inngår som en viktig komponent i blant annet proteiner, peptider, klorofyll, ATP, DNA og RNA (Barsanti and Gualtieri, 2006). Mikroalger kan benytte seg av flere ulike nitrogenforbindelser. De vanligste kildene er nitrat, ammonium og urea. Ammonium er ofte den foretrukne nitrogenkilden for mikroalger når denne er tilstede (Grobbelaar, 2008), da det ikke trengs en reduksjon av nitrat til ammonium før algen kan nyttiggjøre seg av nitrogenet. Den er dermed en energimessig mer «gunstig» nitrogenkilde (Vega et al., 1991). For høye konsentrasjoner av ammonium kan imidlertid være giftig for mikroalger (Şirin and Sillanpää, 2015).

Fosfor (P) er en annen viktig makronæring som er essensiell for mikroalgers vekst, og inngår blant annet i mange metabolske prosesser, som blant annet inkluderer nukleinsyresyntetisering og energioverføringsreaksjoner med ATP (Forján et al., 2015). Mikroalger kan benytte seg av uorganisk fosfor (H₂PO₄⁻, HPO₄²⁻, PO₄³⁻) og i mindre grad av organiske fosforkilder. Selv om mikroalger kan benytte seg av ulike fosforkilder, er ortofosfat (PO₄³⁻) den foretrukne kilden (Forján et al., 2015). Fosfor trengs bare i relativt små mengder for å opprettholde algevekst, men optak av dette næringsstoffet kan likevel bli begrenset da ortofosfat lett binder seg til andre ioner som jern og

karbonat (CO_3^{2-}). Utfelling oppstår og gjør dermed fosfor utilgjengelig for algene (Grobbelaar, 2013). Flere mikroalger kan lagre både fosfor og nitrogen i cellene når de to næringsstoffene er i overskudd. Disse lagrene kan så benyttes ved næringsmangel for å opprettholde vekst (Grobbelaar, 2013, Larsdotter, 2006).

Silisium (Si) er det nest vanligste grunnstoffet i jordens overflate, og har med tiden blitt inkorporert i majoriteten av levende organismer (Finkel, 2016). Når det kommer til silisium og mikroalger, er det hovedsakelig diatomeer som utpreger seg. Silisium brukes blant annet til å danne det karakteristiske skallet til diatomeer (frustul) som består av en blanding av silisium, proteiner og karbohydrater (Finkel, 2016). Diatomeer er også den eneste kjente klassen innen mikroalger som har et absolutt krav om tilstedeværelse av silisium, med unntak av *P. tricornutum* (Finkel, 2016). Diatomeers behov for silisium kan være en utfordring under storskalaproduksjon av mikroalger, da silisium i for store mengder påvirker pH. Når silisium reagerer med CO_2 i vannet dannes det kiseltsyre som senker pH i kulturen (Boyd, 2014). For lave silisiumkonsentrasjoner kan på sin side føre til at hele algekulturen kollapser (Vadstein and Olsen, 2003). At *P. tricornutum* ikke trenger silisium gjør denne arten svært fordelaktig ved storskalaproduksjon.

2.3.1 pH

Foruten CO_2 , påvirkes også algekulturen sin pH av ammonium og nitrat. Når algenes hovedkilde til nitrogen er ammonium, kan man få et fall i pH, da assimilering av ammonium frigir H^+ ioner. Er nitrat derimot hovedkilden til nitrogen vil det påvirke pH motsatt (Grobbelaar, 2013). pH har også innvirkning på fosfors tilgjengelighet. Høy pH vil føre til utfelling av fosfor som binder seg til kalsium og magnesium, men blir igjen tilgjengelig når pH synker (Borowitzka, 1998). De fleste alger foretrekker pH på mellom 7-9, med en optimalverdi mellom 8.2-8.7 (Barsanti and Gualtieri, 2006), men det finnes unntak. Noen alger, for eksempel *Chlorella vulgaris* har en optimal vekst ved pH-verdier mellom 10-10.5 (Gong et al., 2014). I andre enden av skalaen finner man acidofile mikroalger som eksempelvis *Chlorella protothecoides* som har en optimal vekst med pH 2.5 (Johnson, 2012).

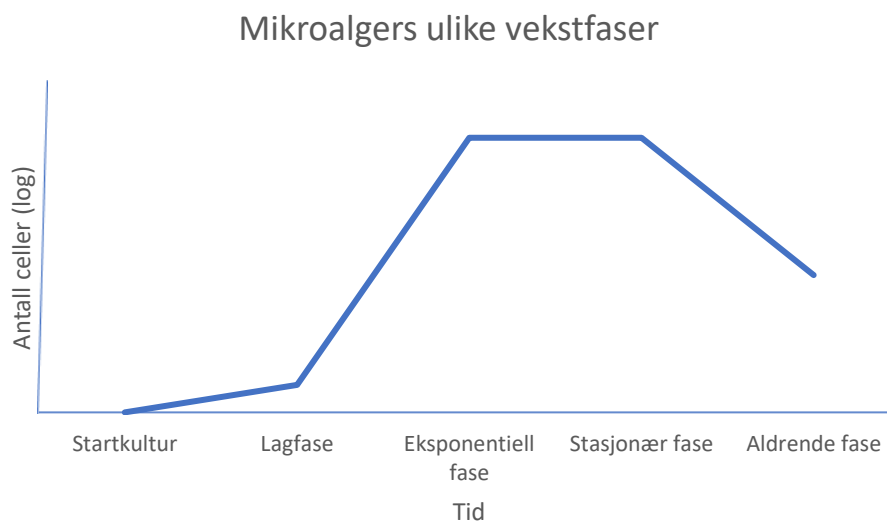
2.3.2 Saltkonsentrasjon

Marine alger har en generell toleranse for store forandringer i saltholdighet. De fleste mikroalger vokser imidlertid best ved et saltinnhold rett under det man finner i deres naturlige habitat (Barsanti and Gualtieri, 2006). Hver mikroalgart tolererer saltholdighet ulikt og vil derfor ha ulik optimal

salinitet. Endringer i saltkonsentrasjonen påvirker mikrolager på ulike måter bl.a. gjennom osmotisk stress og endringer i de cellulære ioneforholdene grunnet membranselektiv ionepermeabilitet (Brand, 1984, Glass, 1983, Moheimani, 2005). For å kunne kontrollere saltkonsentrasjon under kultivering, er den letteste måten å tilsette ferskvann og salt etter behov.

2.3.3 Vekstfaser

Som illustrert i figur 2-6, gjennomgår mikroalgekulturer de fire ulike hoved-vekstfasene: lagfase, eksponentiell fase, stasjonær fase og aldrende fase. Under den første fasen, lagfase, akklimatiserer cellene seg til det nye mediet, som for en kultur på 30-100 celler/ μL varer i sirka 2 til 3 dager, avhengig av ulike forhold som inokulum, temperatur og lysintensitet. Deretter følger eksponentiell fase hvor cellene har en konstant vekstrate. Det er under denne fasen det er vanligst å høste algene. Mikroalgene vil etter hvert gå inn i den stasjonære fasen, hvor veksten avtar og man ikke får en videre økning i celletetthet. Dette kan skyldes ulike forhold som selvskygging, næringsmangel og/eller økt pH. Etter hvert vil cellene gå over i den aldrende fasen hvor celletettheten vil avta (Creswell, 2010).



Figur 2-6: Forenklet vekstkurve med de ulike vekstfasene en mikroalgekultur gjennomgår. Y-aksen viser log av antall celler, mens x-aksen viser tid (Creswell, 2010). Gjengitt av Sara Carolin Rundqvist.

2.3.4 Kultiveringssystem for storskalaproduksjon av mikroalger

Det finnes i dag en rekke ulike kultiveringsmetoder for storskalaproduksjon av mikroalger. Disse metodene kan deles inn i to hovedkategorier: åpent og lukket system (Jerney and Spilling, 2018). Det

alle kultiveringsmetoder har til felles er ønsket om å oppnå en kostnadseffektiv produksjon. Hver enkelt metode har imidlertid sine fordeler og ulemper. Det kan derfor ikke trekkes en entydig konklusjon om hvilken kultiveringsmetode som er den mest effektive, da ulike hensyn som hvilken algeart som skal dyrkes, og hva algebiomassen skal brukes til har stor innvirkning på valg av kultiveringsmetode.

For kommersiell kultivering av mikroalger er åpne system den vanligste kultiveringsmetoden. Åpne system inkluderer blant annet naturlige vannbasseng, sirkulære dammer, kaskadesystem, og renner (Griffiths, 2013). Disse systemene er ofte lettere å konstruere og drive enn lukkede system, og dette kan være en medvirkende årsak til at denne kultiveringsmetoden blir foretrukket fra et økonomisk ståsted (Larsdotter, 2006). Hovedutfordringen med disse systemene er den manglende muligheten til å kontrollere miljømessige faktorer som blant annet kontaminering (Mobin and Alam, 2014). Det vil også være utfordrende å opprettholde en konstant temperatur, og mer kostbart å høste den utvannede biomassen. For å kultivere den ønskede algearten er det også nødvendig med svært spesifikke kultiveringsforhold for å sikre dominansen av den ønskede arten. Dette begrenser dermed antall arter som kan kultiveres i åpne system (Griffiths, 2013). Lukket system refererer til fotobioreaktorer som ikke har noen form for direkte utveksling av gasser eller kontaminering mellom kultiveringssystemet og dets omgivelser. Det finnes i dag flere ulike typer lukkede systemer, blant annet vertikale og horisontale rørformede reaktorer og flatpanelreaktorer (Yen et al., 2014). Disse systemene er designet slik at det blir en god omrøring av mikroalgene for å oppnå jevnere lysfordeling og samtidig forbedre gassutvekslingen (Borowitzka, 1999). Lukkede system har en høyere konstruksjons og driftskostnad enn åpne system, men gir til gjengjeld bedre kontroll over forholdene i kulturen og minsker risikoen for kontaminering (Mobin and Alam, 2014). Dette gjør det mulig å kultivere langt flere ulike arter enn i de åpne systemene. Ved denne kultiveringsmetoden oppnår man også vanligvis en høyere biomasse og celletetthet, som i sin tur gir lavere kostnader knyttet til høsting (Jorquera et al., 2010).

Et annet aspekt ved algekultivering som på nåværende tidspunkt ikke er optimalt, er høsting av mikroalger. Det finnes flere ulike teknikker for å høste mikrolager, som blant annet inkluderer sentrifugering, filtrering, koagulering, flokkulering og flotasjon som kan benyttes hver for seg eller i kombinasjon (Singh and Patidar, 2018). Utfordringen ligger imidlertid i algenes størrelse, som gjør det utfordrende å separere algene fra vannet på en kostnadseffektiv måte (Mobin and Alam, 2014). Denne delen av produksjonslinjen kan stå for så mye som 20-30% av kostnadene (Molina Grima et al., 2003), og gjør det dermed utfordrende å produsere lavkostnadsprodukter av mikroalger.

2.4 Håndtering av avfallsvann

Avfallsvann kan variere stort både i sammensetning, konsentrasjon og volum, og kan inneholde både organiske, uorganiske og giftige komponenter. Avfallsvann har sitt opphav fra ulike kilder, blant annet landbruksnæring, industrielle anlegg og kommunalt avløpsvann (Abdel-Raouf et al., 2012). Det finnes per dags dato ingen universell metode for å rense avfallsvann, da både sammensetning og tilgang på rensemetoder i stor grad spiller inn. Hovedmålet ved rensing av avfallsvann er imidlertid det samme, da man ønsker å unngå forurensning av vann og miljø (Grady et al., 1999). I Norge ble det i 1981 vedtatt en lov mot vannforurensning, også kalt «Lov om vern mot forurensning og om avfall» som har til formål å verne miljøet mot forurensning, redusere mengden og fremme bedre behandling av avfallsvann (Olerud, 2015).

Under håndtering av avfallsvann er det flere bestanddeler som må fjernes, alt etter sammensetning, reguleringer og opphav. For å rense vannet må blant annet suspenderte faste stoffer, ulike næringsstoffer, giftige bestanddeler og koliforme bakterier fjernes, og biokjemisk oksygenbehov (BOD) reduseres (Abdel-Raouf et al., 2012). Det finnes flere metoder som er utviklet for å behandle det vide spekteret av avfallsvann. Disse inkluderer blant annet fysiske, kjemiske og biologiske behandlingsmetoder (Mobin and Alam, 2014). Ved fysisk behandling brukes det mekaniske krefter for å fjerne forurensning i vannet. Det kan også benyttes andre fysiske metoder som absorpsjon i form av eksempelvis torv, aktivert karbon og silikagel. Disse absorbentene kan imidlertid ikke benyttes under komplekse renseprosesser, og er dyre i bruk (Brar et al., 2017). Ved kjemisk behandling benyttes kjemikalier som reagerer med de forurensende komponentene i avfallsvannet. Det benyttes flere ulike kjemiske reaksjonsprosesser, blant annet utfelling, koagulering, oksidasjon, nøytralisering og stabilisering (Thomas Industry, 2020). Ved både fysisk og kjemisk rensing dannes det imidlertid ofte store mengder kjemisk slam som igjen byr på nye utfordringer (Brar et al., 2017). Ved biologiske behandlingsmetoder brukes de naturlige prosesser for å dekomponere organiske substanser. Denne teknikken benytter seg av ulike mikroorganismer for nedbrytning (Grady et al., 1999).

2.5 Bruk av avfallsvann ved produksjon av mikroalger

Biologiske behandlingsmetoder, også kalt bioremediering, er en prosess som benytter mikroorganismers evne til å fjerne forurensning fra ulike kilder som avfallsvann, jord og luft (Boopathy, 2000). På nåværende tidspunkt er det algeremediering, som omfatter bruk av makroalger, mikroalger og cyanobakterier, som har utviklet seg til å bli en av de mest utprøvde og

potensielt mest optimale metodene for å fjerne skadelige og overflødige komponenter i avfallsvann (Olguín and Sánchez-Galván, 2012, Brar et al., 2017).

Et av de største behovene ved behandling av avfallsvann er å fjerne høye konsentrasjoner av næring, og da spesielt nitrogen og fosfor (Pittman et al., 2011). Mikroalger har vist seg å kunne være svært effektive til å fjerne både overflødig næring, giftige metaller og patogener (Abdel-Raouf et al., 2012). Man har for eksempel kunnet redusere mengden totalt fosfor med 80.9-98%, totalt nitrogen med 89.1-98%, og kjemisk oksygenbehov med 90.8% (Caporgno et al., 2015, Li et al., 2011, Xin et al., 2010a). I de tilfellene hvor rensing av avfallsvann har vært mest vellykket har man benyttet alger med spesifikke ønskede egenskaper, slik som god evne til å akkumulere tungmetaller, kjemisk sammensetning av spesiell interesse (f.eks. høyt innhold av ønskede fettsyrer) og god toleranse for ekstreme temperaturer (CapitalEnergy, 2015). Flere ulike algearter har blitt testet ut for avfallsvannhåndtering. Blant annet har *Chlorella* sp., *Coelastrum* sp., *Scenedesmus* sp., *Micractinium* sp., *Actinastrum* sp., *Chlamydomonas* sp., *Hindakia* sp., *Pediastrum* sp., *Dictyosphaerium* sp., *Botryococcus* sp. og *Heynigia* sp. vist gode evner til å kunne fjerne store mengder nitrogen og fosfor så vel som andre bestanddeler fra avfallsvann (Zhou et al., 2014).

Den økende interessen for mikroalger som en alternativ behandlingsmetode for avfallsvann kommer av svakheter i dagens metoder, slik som store kostnader knyttet til behandling, varierende effektivitet og begrensede tilpasningsmuligheter (Zinicovscaia, 2016). Algeremediering er på sin side en miljøvennlig og potensielt kostnadseffektiv behandlingsprosess, som ikke medfører sekundær forurensning så lenge algebiomassen blir utnyttet (Brar et al., 2017). Ved bruk av mikroalger produserer det heller ikke skadelige biprodukter, og kultiveringsprosessen bidrar til å fjerner CO₂ fra vannet, som kan være med på å redusere drivhusgasser (Brar et al., 2017). Algebiomassen som blir produsert har potensielt også en høy næringsverdi som kan være passende til flere ulike bruksområder. Den siste tiden har det vært et økt fokus rundt ekstrahering og bruk av lipider (blant annet EPA og DHA innhold) fra mikroalger kultivert ved bruk av avfallsvann (Tossavainen et al., 2018a, Ma et al., 2016, Zhou et al., 2012, Tossavainen et al., 2018b). Det store spennet i næring og potensielt giftige komponenter som tungmetaller og patogener legger imidlertid føringer for både bruk av mikroalgebiomasse og formålet med kultivering (Abdel-Raouf et al., 2012).

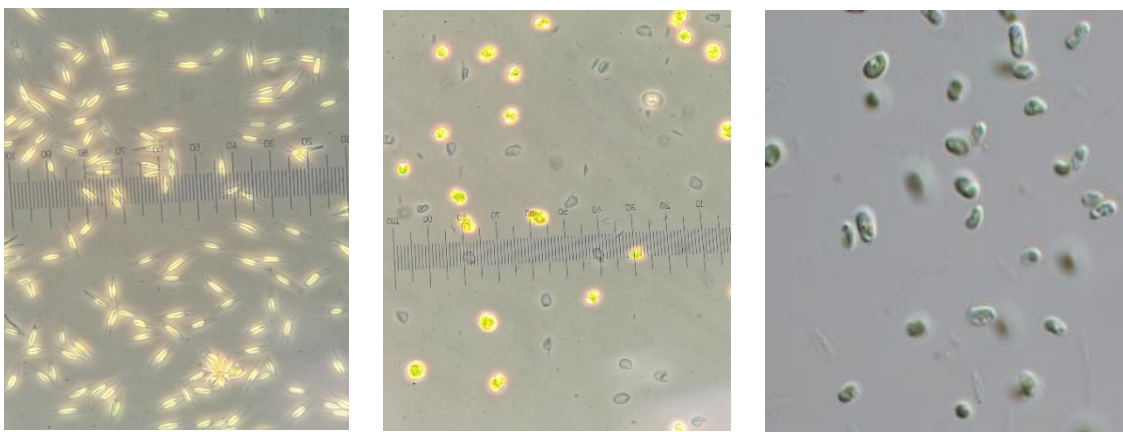
3 Materiale og metoder

I den innledende screeningen ble tre utvalgte mikroalgearter, med et antatt høyt innhold av de verdifulle fettsyrene EPA og DHA, testet mot syv ulike avfallskilder fra ulike næringsmiddelbedrifter. De to artene og de fem mest lovende avfallskildene ble testet videre i en hovedscreening, hvor kulturene ble oppskalert til 300 mL kulturer kultivert som batch kulturer.

3.1 Mikroalger, avfallskilder og mediepreparering

De tre mikroalgeartene *M. gaditana* (stamme CCMP526), *P. tricornutum* (B58) og *T. Suecica* (UTEX LB 2286) ble benyttet under eksperimentet (Tabell 3-1), og ble valgt på bakgrunn av tidligere studier som har kunnet vise til høy vekstrate og fettsyreinnhold, samt at de er robuste og lette å dyrke (Qiao et al., 2016, Otero and Fábregas, 1997, Jinkerson et al., 2013, Prestegard et al., 2016). B58 er en lokalt isolert stamme som har blitt holdt som stamkultur ved UiBs laboratorium siden 1997 (Herfindal et al., 2009). *M. gaditana* og *T. Suecica* kommer fra kultursamlingene CCMP og UTEX.

De tre artene er ulike i både form, størrelse og farge, og er lette å skille fra hverandre under mikroskopet (Figur 3-1). Dette gjøre det lettere å kontrollere at kulturene er rene og ikke kontaminert. Cellene fra *P. tricornutum* ble observert som fusiform-formet, med en lengde på mellom 8-12 μm og bredde på 1.5-2 μm . *T. suecica* hadde en mer sfærisk fasong, med en lengde på 4-5 μm og bredde på 3-4 μm . *M. gaditana* er kokkoid (sfærisk form) med en lengde på mellom 2-8 μm og bredde på 2-4 μm (Lubián L et al., u.å.). Alle artene har flageller.



Figur 3-1: Fra venstre, *P. tricornutum* (B58), *T. suecica* (UTEX LB 2286) og *M. gaditana* (CCMP526). Bildene ble tatt igjennom okularet med objektiv 40x fase 2. Foto: Sara Carolin Rundqvist. *M. gaditana*, bilde hentet fra:

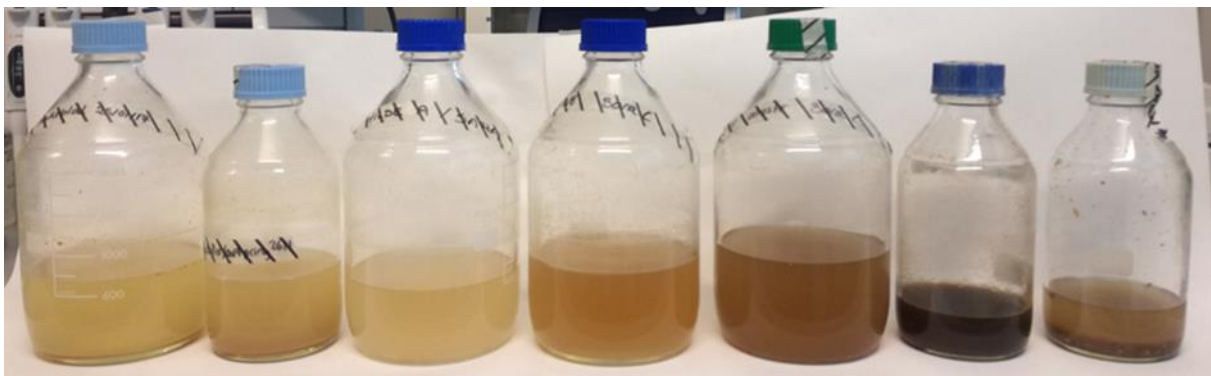
<https://ncma.bigelow.org/ccmp526#.XfTLFWRKhPY>

Tabell 3-1: Oversikt over mikroalgene som ble brukt under eksperimentet. Listen inneholder artsnavn, stamme ID, klasse, opprinnelse og kultursamling.* *Microchloropsis gaditana* tidligere kjent som *Nannochloropsis gaditana* (Fawley et al., 2015).

Artsnavn	Stamme ID	Klasse	Opprinnelse	Kultursamling
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	B58	Bacillariophyceae	Bergen (Store Lungegårdsvann)	Lokal isolat, isolert i 1997 (Herfindal et al., 2009)
* <i>Microchloropsis gaditana</i>	CCMP526	Eustigmatophyceae	Marokko (Middelhavet)	CCMP
<i>Tetraselmis suecica</i>	UTEX LB 2286	Prasinophyceae	Italia (Middelhavet)	UTEX

Avfallskilder

I forkant av eksperimentet ble det foretatt en grundig evaluering av mulige avfallskilder, som ble basert på relevant faglitteratur og avfallskildenes tilgjengelighet. Syv ulike avfallskilder ble hentet inn fra ulike bedrifter i Hordaland (Tabell 3-2), alle med antatt potensiale som algenæringsmedium. De ulike avfallskildene kommer fra vidt forskjellige virksomheter, og vil derfor naturlig nok ha et svært varierende næringsinnhold, konsistens, farge og pH (Figur 3-2). Hvor i behandlingsprosessen og på hvilket tidspunkt prøvene ble samlet inn vil også kunne påvirke de ovennevnte faktorene. Alle de innsamlede avfallsprøvene ble transportert i toliters glassbeholdere som var plassert i en lystett plastkasse. Prøvene ble autoklavert to ganger, og deretter plassert i kjøleskap før videre bruk.



Figur 3-2: Bilde av de utvalgte avfallskildene benyttet under eksperimentet. Fra venstre: fiskeblod, fiskeslam, kloakk, avfallsvann fra meieri, avfallsvann fra bryggerivirksomhet, bløme og mask. Foto: Sara Carolin Rundqvist.

Tabell 3-2: Oversikt over de ulike avfallskildene som ble benyttet, og fra hvilke bedrifter de ble hentet inn.

Bedrift	Avfallskilde
Lerøy	Fiskeslam
Vann- og avløpsetaten (Bergen kommune)	Kloakk
Sekkingstad	Fiskeblod
7-Fjell	Mask
Hansa Borg bryggerier	Avfallsvann fra bryggerivirksomhet
Tine	Avfallsvann fra Meieri
Invertapro (Larveriet)	Bløme

Lerøy

Lerøy Seafood Group ble startet så tidlig som i 1899, og er i dag et verdensledende sjømatelskap. Selskapet har hovedkontor i Bergen, men driver med fangst og havbruk langs hele Norskekysten. Hovedvirksomheten er oppdrett av ørret og laks samt fangst av hvitfisk. Selskapet driver også med foredling, markedsføring, produktutvikling, salg og distribusjon av sjømat (Lerøy, 2017a). En blanding av fôr-rester og feces ble samlet inn fra et Tubmerd-anlegg lokalisert på Årland (Figur 3-3). Et Tubmerd-anlegg er et semi-lukket fiskeanlegg, hvor det drives oppdrett av postsmolt som er en større og mer robust smolt, som plasseres ut i åpne sjøanlegg når den har oppnådd en vekt på mellom 0,5-1,0 kg (Lerøy, 2017b). Anlegget er utstyrt med en slamfelle hvor en blanding av fôr-rester og feces blir samlet opp og filtrert ut før det rensede vannet blir sluppet ut igjen i sjøen. Vannet blir ikke fullstendig rensert før det slippes ut igjen, men det var ikke mulig å oppdrive noen målinger av næringsinnhold (Pers. med. ansatt på anlegget, 2018). Det ble samlet inn to prøver fra slamfellen. En 1 liters prøve fra et forkammer i slamfellen (før filtrering), og en prøve på ca. 0,5 liter fra selve slamfellen (konsentrert prøve). Etter endelig vurdering av prøvene ble prøven fra selve slamfellen utprøvd i eksperimentet. Denne prøven vil videre bli kalt «fiskeslam».

Vann- og avløpsetaten (Bergen kommune)

Vann- og avløpsetaten er Bergens største bedrift innen miljø og næringsmiddel. Etaten er blant annet ansvarlig for å levere drikkevann til 96% av byens befolkning, og er også hovedansvarlig for rensing av avløpsvann (Bergen Kommune, 2013). Knappen kloakkrenseanlegg holder til mellom Sælenvatnet og Grimstadjorden (Figur 3-3). Dette er et kjemisk renseanlegg som blant annet mottar avløpsvann fra Fana, Fyllingsdalen og Loddefjord (Bergen Kommune, 2016). Anlegget har et krav om at minst 90% av fosforet fjernes før vannet slippes ut i fjorden (Pers. med. Kristine Askevold, 2018). Konsentrasjonen på avfallsvannet som kommer inn til anlegget viser store variasjoner. Både tid på døgnet og nedbørmengder spiller inn (Pers. med. Kristine Askevold, 2018). Prøven på ca.1 liter ble samlet inn etter to dager med oppholdsvær, og inneholdt derfor lite overvann. Denne prøven vil videre bli kalt «kloakk».

Sekkingstad

Sekkingstad AS er en familiebedrift lokalisert på Skaganeset, Sotra, i Øygarden kommune (Figur 3-3), like utenfor Bergen. Dette er en spesialisert bedrift med hovedfokus på laks og ørret. Bedriften har egen fabrikk på Skaganeset som driver med fiskeforedling (Sekkingstad, u. å.). Det var fra dette anlegget prøven ble innhentet. Blod og vann fra fileteringen går igjennom et renseanlegg på fabrikken, som renses vannet for næringsstoffer før det slippes ut igjen i sjøen. Bedriften hadde ikke tilgjengelige opplysninger om næringsinnhold i vannet før og etter rensing. Prøven på 1 liter som ble tatt før rensing ble oppbevart kjølig i en forseglet plastbeholder i 24 timer før avhenting. Denne prøven vil videre bli kalt «fiskeblod».

7 Fjell

Bryggeriet 7 Fjell er et lokalt ølbryggeri med produksjonslokaler på Bønes (Figur 3-3). Øl består hovedsakelig av fire hovedingredienser: vann, gjær, humle og malt. Malt fremstilles gjennom å spire korn slik at det dannes enzymer i kornet som spalter stivelse og proteiner. Under denne prosessen dannes det blant annet forgjærbart sukker (maltose) som utvinnes til ølbryggingen. Alle kornsorter kan maltes, men til ølproduksjon er de vanligste sortene bygg og hvete. Etter at viktige bestanddeler er ekstrahert fra malten under ølbryggingen sitter man igjen med mask, som er restene av maltet etter at det meste av stivelsen er fjernet. Mask består hovedsakelig av de tyngst løselige karbohydratene, selve kornskallet, fett og råproteiner. Næringen i mask gjør det til et ettertraktet fôr til kyr (Øystå, 2009, Øystå, 2018, Øystå, 2017). Bedriften har derfor et samarbeid med en lokal bonde som samler inn overflødig mask etter produksjon (Pers. med. Torvald Storaas, 2018). Fersk

mask ble hentet fra dagens produksjon og oppbevart i en toliters glassflaske. Denne prøven vil videre bli kalt «mask».

Hansa Borg bryggerier

Hansa Borg er Norges største norskeide drikkevare- og bryggerivareaktør, og står for omkring 20% av markedsandelen av øl i Norge. Foruten ølproduksjon produserer Hansa blant annet sider og brus (Hansa Borg Bryggeri, 2009, Hansa Borg Bryggeri, 2010). Prøven ble samlet inn fra Hansa sitt bryggeri på Kokstad (Figur 3-3). Fabrikken har en felles oppsamlingstank for de ulike produksjonsleddene i hele anlegget. Det brukes store mengder vann og lut for å rengjøre underveis i produksjonen. Lut benyttes også for å balansere pH (ca. 6) i oppsamlingstanken, hvor all væske fra produksjonen samles opp før den kan slippes ut i det offentlige kloakkanlegget. Bryggeriet tar daglig ut prøve på 0.5 liter. Prøven på ca. 1 liter som ble hentet inn var en samleprøve for en uke, og består av avfallsvann fra alle ledd i produksjonen. Den foregående uken hadde det hovedsakelig vært ølproduksjon på fabrikken, med unntak av én siderproduksjon (Pers. med. Ivar Selheim, 2018). Denne prøven vil videre bli kalt «avfallsvann fra bryggerivirksomhet».

Tine

Tine startet opprinnelig som en produsent av melk, ost og smør, og er i dag ett av Norges største næringsmiddelkonsern med over 500 ulike produkter (TINE, u.å.-b). Tine har flere meierier lokalisert på ulike steder i landet, og et av disse meieriene ligger på Minde i Bergen (Figur 3-3). Her produseres det blant annet søtmeik, kulturmelk, fløte og Sunniva juice. Anlegget har en produksjon på ca. 45 millioner liter per år (TINE, u.å.-a). Fabrikken har en felles oppsamlingstank for de ulike produksjonsleddene i hele anlegget. Dette gir en blanding som hovedsakelig består av store mengder vann, kjemikalier (baser og syrer) og organisk masse fra selve produksjonen. Svinn som utgjør 0,5% av produksjonen er ikke en del av denne væsken. Dette blir istedenfor videresendt til Hamar for videre bearbeidelse. For hver liter produkt produsert blir det benyttet to liter vann, og ca. 20% av vannet blir resirkulert under produksjon. I tillegg spyles og rengjøres hele anlegget med store mengder vann hver dag. I selve oppsamlingstanken blir det tilsatt enten syrer eller baser for å holde pH mellom 6-9. Når pH er innenfor kriteriene slippes avfallsvannet ut i det offentlige kloakksystemet. Det er viktig å bemerke at anlegget ikke er representativt for andre meierier, da de benytter seg av en annen type renseanlegg. Anlegget i Bergen produserer heller ikke like mye fettholdige produkter (ost, yoghurt etc.) som de andre anleggene i Norge. Hva som blir produsert varierer også med årstiden (Pers. med. Terje Johannessen, 2018). Anlegget tar daglige prøver som blir sendt til et eget

laboratorium for analyse. Prøven på 1 L fra Tine var en blanding av 100 mL prøver som var tatt ut hver dag i en måned. Denne prøven vil videre bli kalt «avfallsvann fra meieri».

Invertapro (Larveriet)

Larveriet på Voss (Figur 3-3) er et selskap som har valgt å satse på å utvikle plantenering og proteiner av høy kvalitet ved bruk av melorm (*Tenebrio-molitor*) og svart soldatfluelarve (*Hermetia illucens*), som begge er svært velegnet til blant annet fôr brukt i akvakultur og husdyrhold. Selskapet holder for tiden på med å optimalisere larvenes diettkomposisjon, ved å utnytte organiske ressurser tilgjengelig på Vestlandet, blant annet organisk avfall fra landbruk og næringsmiddelindustrien. Ekskret og skall fra larvene markedsføres under produktnavnet bløme, som er en god næringsrik plantegjødsel (Invertapro, u. å.). En pakke på 2 kg bløme i fast form ble innhentet av Jeroen Hendrik De Vree. Denne prøven vil videre bli kalt «bløme».

Kontrollmedium (WUR)

For å kontrollere og sammenligne hvor godt algene vokste på de ulike avfallskildene ble det benyttet et kontrollmedium, WUR (Appendiks 1, tabell A1). WUR er et veldefinert vekstmedium for mikroalger, som i teorien skal inneholde tilstrekkelige mengder av de nødvendige næringsstoffene for å gi god algevekst.



Figur 3-3: Til høyre vises et Norgeskart med et utsnitt av hvor Hordaland er plassert. Til venstre vises et forstørret kart over utsnittet av Hordaland, hvor det er markert med tall hvor de ulike avfallskildene ble innhentet. 1 = Sekkingstad, 2 = Hansa borg bryggeri, 3 = Knappen renseanlegg, 4 = 7 Fjell bryggeri, 5 = Tine meieri, 6 = Lerøy og 7 = Invertapro. Kart hentet fra <https://www.norgeskart.no/#!/?project=seeiendom&layers=1002,1015&zoom=4&lat=7408952.59&lon=-383182.00>.

Tillagning av mask- og bløme-ekstrakt, og oppdyrking av mikroalger

To av avfallskildene, mask fra 7-fjell og bløme fra Invertapro, var i fast form. Det ble derfor laget til et ekstrakt fra hver av dem. Ved tillagning av mask-ekstraktet, ble 20g fuktig mask tilsatt 500 mL destillert vann før blandingen ble ristet godt, og autoklavert. For bløme-ekstraktet ble de benyttet samme fremgangsmåte. 20g tørr bløme ble tilsatt 500 mL destillert vann. Til forsøket ble bare væsken som la seg over bunnfallet benyttet.

80% sterilisert sjøvann, som ble benyttet under kultivering av mikroalgene under innledende- og hovedscreening, ble laget til ved å blande 2 deler sterilisert vann og 8 deler rent sjøvann (fra 90 m dyp i fjorden, salinitet på 35). Dette ble så autoklavert og plassert i kjøleskap før videre bruk. For hver liter tillaget 80% sterilisert sjøvann (salinitet på 28), ble det tilsatt 1 mL mikronæring (Appendiks 1, tabell A1) for å unngå mangel på disse næringsstoffene under kultivering.

Før screeningen kunne starte måtte algene dyrkes opp. Dette ble gjort ved å inokulere algene til 250 mL Erlen Meyer kolber tilsatt 80%-sterilisert sjøvann og 2 mL WUR medium. Kolbene ble deretter inkubert i klimaskap satt til 15°C med en dag og natt-syklus på 14:10 timer, til tilfredsstillende tetthet på kulturene var oppnådd (14 dager). En syklus på 14:10 timer ble valgt da det gir en god og stabil vekst, og egner seg godt for lengre oppbevaring. De tre algeartene ble overført til nytt medium hver uke gjennom hele eksperimentet slik at det alltid var en to-ukers kultur tilgjengelig.

3.2 Innledende screening

Under den innledende screeningen ble de ovennevnte 3 artene og 7 avfallskildene undersøkt (Tabell 3-1 og 3-2). I denne delen av eksperimentet var ønsket å undersøke muligheten for høy vekst ved kultivering av de utvalgte algene på de ulike avfallskildene. Dette ble undersøkt ved å observere visuelt og ta bilder over en lengre periode for å kunne sammenligne og vurdere resultatet. Både fargeendring og tetthet ble evaluert for å bedømme vekst. Den innledende screeningens formål var å selektere ut de mest lovende avfallskildene, som videre ble oppskalert og testet i hovedscreeningen.

3.2.1 Forberedelser

Totalt 90 autoklaverte 250 mL Erlen Meyer kolber ble klargjort for den innledende screeningen. For hver avfallskilde og algeart ble det laget til fire ulike konsentrasjoner. Hver kolbe ble tilsatt enten 5 mL, 10 mL, 20 mL eller 40 mL avfallsvann, og 100 mL 80%-sterilisert sjøvann (Tabell 3-3). Det ble også

laget til seks kontroller (to for hver algeart) som hver ble tilsatt 2 mL WUR og 100 mL 80%-sterilisert sjøvann. Alle flaskene ble så fotografert før 5 mL algekultur ble tilsatt alle kolbene og fotografert på nytt. De klargjorte kolbene ble deretter inkubert i klimaskap satt til 15°C med en dag og natt-syklus på 14:10 timer, i 14 dager.

Vekst i de ulike kulturene ble observert visuelt. Endringer i grønn/brunfarge indikerte hvor godt de ulike algene vokste. Dette steget fungerte som en utvelgelsesprosess hvor de avfallskildene algene generelt responderte best på ble selektert videre for oppskalering i hovedscreeningen.

Tabell 3-1: Oversikt over mengden avfallsvann, algekultur og 80% sterilisert sjøvann tilsatt hver kolbe og det totale volumet for hver kolbe. Alle verdier er oppgitt i mL. * Mengden WUR tilsatt kontrollene.

Mengden tilsatt avfallsvann (mL)	Avfallsvann (mL)	Algekultur (mL)	80% sterilisert sjøvann (mL)	Tot. Volum (mL)
Lav konsentrasjon (5 mL)	5	5	100	110
Middels lav konsentrasjon (10 mL)	10	5	100	115
Middels høy konsentrasjon (20 mL)	20	5	100	125
Høy konsentrasjon (40 mL)	40	5	100	145
Kontroll (WUR) (2 mL)	2*	5	100	107

3.3 Hovedscreening

De avfallskildene og algene som viste best algevekst i den innledende screeningen ble valgt for videre undersøkelse i hovedscreeningen. Dette var de fem avfallskildene: mask, bløme, fiskeblod, fiskeslam og kloakk, og de to algene *P. tricornutum* og *T. suecica*. *M. gaditana* og de to avfallskildene: avfallsvann fra meieri og avfallsvann fra bryggerivirksomhet hadde ikke like tilfredsstillende resultat, og ble derfor vurdert som lite egnet for videre kultivering i hovedscreeningen. Det ble valgt å begrense antall konsentrasjoner av den enkelte avfallskilde til de to som hadde vist seg å gi best vekst i innledende screening. Dette var for alle tilfeller de to høyeste konsentrasjonene (20 mL og 40 mL). I hovedscreeningen ble dyrkningsvolumet oppskalert fra mellom 107-145 mL i den innledende screeningen, til 300 mL dyrkningsrør og med duplikater for hver avfallskilde/alge kombinasjon.

3.3.1 Klargjøring av dyrkningsrør og vekstmedium

Før hovedscreeningen ble både dyrkningsrør og vekstmedium klargjort. Det ble benyttet førtiåtte 300 mL dyrkningsrør med en diameter på 3.5 cm, som ble forseglet med en gummikork med to tynne glassrør som gjennomboret korken. På enden av det lengste glassrøret som strakk seg til bunnen av dyrkningsrøret ble det festet en avklippet pipettespiss. De klargjorte dyrkningsrørene ble autoklavert før bruk. For hver avfallskilde ble det laget til to ulike konsentrasjoner. Dette ble gjort for hver algeart. Hvert dyrkningsrør ble tilsatt enten 55 mL eller 110 mL avfallsvann. Det ble tilsatt andre mengder bløme (41 og 82 mL), i samråd med veileder, Jeroen Hendrik De Vree, da han tidligere har utført screeninger med de samme mikroalgestammene på denne avfallskilden. Det ble også laget til to kontroller tilsatt 55 mL eller 110 mL WUR, for de to algene (Tabell 3-4). Hvert dyrkningsrør ble tilsatt mellom 165-234 mL 80% sterilisert sjøvann, alt etter hvilken mengde avfallsvann som ble tilsatt, og 25 mL algekultur slik at hvert rør hadde et totalvolum på 300 mL. Gummikorken ble umiddelbart satt tilbake på rørene for å hindre kontaminering.

Tabell 3-2: Oversikt over mengden avfallsvann, algekultur og 80% sterilisert sjøvann tilsatt hvert dyrkningsrør og salinitet. Alle verdier er oppgitt i mL. * Salinitet i kulturene tilsatt fiskeblod og fiskeslam.

	Avfallsvann (mL)	Algekultur (mL)	80% sterilisert sjøvann (mL)	Tot. Volum (mL)	Salinitet	Avfallsvann i % av tot. volum
Kontroll, lav konsentrasjon (WUR)	55	25	220	300	22.9	18.3
Kontroll, høy konsentrasjon (WUR)	110	25	165	300	17.8	36.7
Lav konsentrasjon (Fiskeblod, fiskeslam, kloakk og mask)	55	25	220	300	22.9 (*29.3)	18.3
Høy konsentrasjon (Fiskeblod, fiskeslam, kloakk og mask)	110	25	165	300	17.8 (*30.6)	36.7
Lav konsentrasjon (bløme)	41	25	234	300	24.2	13.7
Høy konsentrasjon (bløme)	82	25	193	300	20.4	27.3

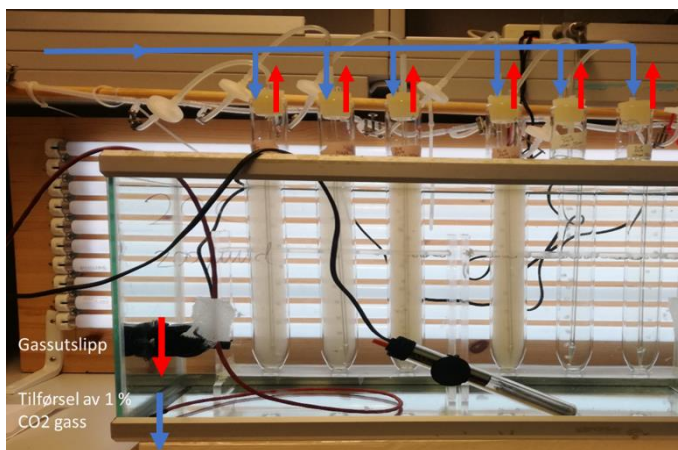
3.3.2 Eksperimentoppsett, klargjøring og prøvetaking

Før selve hovedscreeningen kunne starte, ble det spesielt tilpassede kjølerommet klargjort (Figur 3-4). Akvariene ble fylt med vann, før temperaturen ble stilt inn på 16°grader og kontrollmålt daglig med et Digitron 2000T termometer. De førtiåtte klargjorte dyrkningsrørene ble satt i plexiglass stativer, som så ble plassert i akvariene lengst mulig inn mot lysrørene. Totalt seks rør ble plassert i hvert akvarium. Bak akvariene var det plassert lysrør som ga en kontinuerlig og jevn lystilførsel til algekulturene. De første dagene av eksperimentet ble lysintensiteten holdt mellom 15 og 38 μmol



Figur 3-4: Oppsette for algekultivering for hovedscreeningen. Foto: Sara Carolin Rundqvist.

fotoner $m^{-2}s^{-1}$, før intensiteten gradvis ble hevet til $300 \mu\text{mol fotoner } m^{-2}s^{-1}$ (målt med en Biospherical lysmåler med 4π sensor). Lysstyrken ble deretter holdt konstant gjennom eksperimentet, uten døgnlig syklus (lys/mørke). For å sikre tilstrekkelig karbontilgang og miksing av algene ble kulturene tilført $0.2\mu\text{m}$ filtrert 1% CO_2 gass fra en felles gasstank, som ble koblet til det lengste glassrøret i gummikorken på dyrkningsrørene. Dette røret strakk seg til bunnen av dyrkningsrøret. Gassen ble så skrudd på og intensiteten på gasstrømmen ble regulert ut fra øyemål, til en mest mulig lik og stabil gasstrøm over tid (Figur 3-5).



Figur 3-5: Skjematisk fremstilling av oppsett under hovedscreeningen. De blå pilene indikerer gasstilførsel til hvert av rørene fra en felles gasstank, som ble fordelt mellom de ulike dyrkningsrørene. De røde pilene indikerer gassutslipp. Foto: Sara Carolin Rundqvist.

Det ble daglig tatt OD 750 målinger fra alle dyrkningsrør for å følge algenes vekst. Disse målingene ble så brukt til å beregne vekstrate og identifisere algenes vekstfase. Fettsyre- og tørrvektprøver ble tatt i både eksponentiell og stasjonær fase. De individuelle vekstfasene inntraff ulikt mellom kulturene og ble derfor definert individuelt for hvert avfallsvann og algekombinasjon. Kulturene ble høstet etter 7-9 dager for eksponentiell fase og etter 10-20 dager for stasjonær fase.

Kulturenes pH ble målt annenhver dag gjennom hele eksperimentet. For OD 750- og pH-målingene ble det samlet inn en enkelt prøve på 5 mL fra hvert enkelt dyrkningsrør. Ved innsamling til tørrvekt- og fettsyreprøver ble det tatt triplikatprøver på 3×5 mL, respektive 3×10 mL fra hver dyrkningsrør. Alle prøvene ble tatt med en pipette, og overført til reagensrør. Prøvene ble samlet inn mellom kl. 9.00 og 10.00 på dagene for prøvetaking. Utgangskonsentrasjonen av ammonium, nitrat og fosfat i avfallskildene ble målt først etter at hovedscreeningen var gjennomført.

3.4 Analytiske metoder:

3.4.1 Optisk tetthet (OD)

OD ble målt på bølgelengde 750nm, med et UV-1800 Shimadzu spectrophotometer. For å oppnå et mest mulig nøyaktig måleresultat ble prøvene vannet ut med milli-Q vann for å holde en OD-verdi på

mellom 0.2-0.8. For å bestemme den spesifikke vekstraten under eksponentiell fase for kulturene ble likning (1) benyttet. N_{tx} er OD ved tid X (t_x) og N_{tx-1} er OD verdien ved tid $X-1$ (t_{x-1}).

$$(1) \quad \mu = \frac{\ln(N_{tx}) - \ln(N_{tx-1})}{tx - tx_{-1}}$$

3.4.2 Tørrvekt

For bestemmelse av tørrvekt, ble det benyttet GF/F (47 mm) Whatman filtre. Disse ble først vasket med destillert vann (30 mL x 3) og plassert i små petriskåler. Skålene ble plassert i en Termaks-skap (95°C) i 24 timer, og deretter i en dessikator i minst 2 timer. De tørkede filtrene ble så veid på en Mettler Toledo MT5 mikrovekt før videre bruk. Når kulturene var klare for høsting ble de forhåndsveide filtrene plassert på en filtreringsoppsats, som filtrerte ved hjelp av lavt vakuum. 1-3 mL algekultur, avhengig av kulturens tetthet ble overført til filtrene, før de ble skylt tre ganger med 5 mL ammoniumformat for å fjerne saltrester. Filtrene ble så lagt tilbake i petriskålene og tørket på nytt i Termaks-skapet i 24 timer, før de ble plassert i en dessikator i minst 2 timer, og veid på nytt. Algenes tørrvekt (mg) ble bestemt ved å regne ut differansen mellom vekten til filtrene før og etter filtrering. Biomasse per volumenhet ble regnet ut ved å dele på volumet som ble filtrert (appendiks 1, tabell A3).

Det har i ettertid vist seg at måten tørrvektprøvene ble behandlet på gir unøyaktige tørrvektverdier. Lokket til petriskålene ble ikke fjernet under tørking i Termaks-skap, og kondens har dermed samlet seg inne i skålene. Tørrvektprøvene kunne derfor ikke brukes videre i forsøket. Det var dermed ikke mulig å regne ut EPA, DHA og det totale fettsyreinnholdet i forhold til algenes tørrvekt og heller ikke algenes biomasseproduktivitet.

For å gi et estimat på tørrvekt i de ulike kulturene ble det derfor benyttet OD-tørrvekt kalibrering. Først ble det dyrket opp tette kulturer av både *P. tricornutum* og *T. suecica*. Fra disse kulturene ble det laget 4 fortyninger (5 for *P. tricornutum*). Uttyningen var som følger: 1:1, 1:2, 1:4 og 1:8 (1:16), slik at kulturen for hver fortyning var halvparten av den foregående. Deretter ble OD og tørrvekt målt for alle fortyningene, og resultatet ble plottet i en graf, med OD på x-aksen og tørrvekt på y-aksen (Appendiks 1, figur A1 og A2). En trendlinje ble satt gjennom punktene på grafen, og gjorde det dermed mulig og kalkulerer tørrvekt fra OD. Oppdyrkingen og kalibreringen av algene ble foretatt av Pia Steinrücken. Dette estimatet er imidlertid ikke nøyaktig nok til å kalkulere EPA og DHA av tørrvekt, men gir et estimat på algenes tørrvekt.

3.4.3 Fettsyrer

De innsamlede prøvene for fettsyrer på 10 mL (triplikatprøver), ble overført til Pyrex kulturrør. Kulturrørene ble sentrifugert i en Beckman Coulter (Allegra 2IR Centrifuge) i 10 minutter med en omdreining på 3500 rpm. Etter sentrifugering ble supernatanten sugd ut ved hjelp av en glasspipette koblet til en pumpe (Figur 3-6). Korken ble deretter skrudd på kulturrørene med den gjenværende pelleten, og ble plassert i fryseren i vente på videre analyse.

Ekstrahering av fettsyrer ble gjennomført ved Kjemisk institutt på UiB av Jeroen Hendrik De Vree. Pelletene ble hentet ut av fryseren og tørket for å fjerne overflødig væske. Dette ble gjort ved å fjerne korken og plassere kulturrørene i en Thermo Scientific fordampner (Reacti-Therm I #TS-1882) (Figur 3-7), som tilførte nitrogengass til prøvene. Når pelleten hadde tørket ble de tilsatt

Indre Standard 23:0 FAME oppløst i isooktan. Hvor mye som ble tilsatt hvert kulturrør ble bestemt av prøvenes tørrvekt. Pelletene ble tørket på nytt under tilførsel av nitrogengass i fordampneren, og tilsatt 0.5 mL

methanolysereagens (2,5 M HCl i metanol) før korkene ble skrudd hardt på. Prøvene ble inkubert i 2 timer i et Termaks-skap ved 90°C. Når man tilsetter methanolysereagens skjer det en kjemisk reaksjon som fører til at fettsyrene i prøvene blir omdannet til fettsyremetyler (FAME). Etter inkubering fikk prøvene stå til avkjøling i romtemperatur, før korkene ble skrudd av og halvparten av methanolysereagens ble fjernet ved fordamping under tilførsel av nitrogengass i fordampneren. Rørene ble så tilsatt 0,5 mL destillert vann og 1 mL isooctan HPLC grad, før prøvene ble mikset på en Vortex mikser i 30 sekunder og deretter sentrifugert i 5 minutter ved 3000 rpm. Etter sentrifugeringen dannet det seg et væskelag over bunnfallet i rørene. Denne væsken som inneholder de ekstraherte fettsyrene, ble forsiktig overført til klargjorte 2-mL-hetteglass som ble forseglet med et plastlokk.

Deretter ble det på ny tilsatt 1 mL isooctan i prøvene som ble mikset og sentrifugert. Væskelaget over bunnfallet ble



Figur 3-6: Glasspipette koblet sammen med en kolbe og en pumpe. Utstyret ble brukt til å fjerne supernatant fra fettsyreprøvene. Foto: Sara Carolin Rundqvist



Figur 3-7: Thermo Scientific fordampneren som ble brukt til å tørke pelleten under tilførsel av nitrogengass. Foto: Sara Carolin Rundqvist

igjen overført til hetteglassene. Det ble så laget en fortykning av fettsyrene ved å tilsette 1 mL isooctan og 2.5 μL ekstrahert fettsyre, som ble overført til et nytt hetteglass. Glasset ble forseglet og plassert i kjøleskapet før analyse. FAME analysen ble gjennomført av Svein Are Mjøs på Kjemisk institutt ved UiB. Det ble benyttet en Agilent 7890A gasskromatograf (Agilent, Santa Clara, CA, USA) utstyrt med en 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 konstant 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.

3.4.4 pH

pH i kulturene ble målt med et PHM210 standard pH-meter, som har en nøyaktighet på to desimaler. pH-meteret sin elektrode ble plasseres i prøven, og pH-verdien ble avlest når pH var stabilisert. Etter hver måling ble elektroden skylt med destillert vann og plassert tilbake i den tilhørende hetten med elektrolytter.

3.4.5 Nitrat, fosfat og ammonium i avfallskildene

Utstyret for å måle innhold av nitrat, fosfat og ammonium for de ulike avfallskildene var ikke tilgjengelig i starten av eksperimentet, og ble derfor ikke målt før hovedscreeningen var gjennomført. Målingene ble utført på de innsamlede prøvene, og det tillagede bløme- og mask ekstraktet. For å måle innhold av nitrat og fosfat ble det brukt et kompaktfotometer PF-12plus (Figur 3-8), som har en nøyaktighet på to desimaler. Det ble benyttet de tilhørende testkittene, visocolor eco 931241 nitrat og visocolor eco 931284 phosphate for måling av nitrat og fosfat. Hvert kit inneholdt to reagenser, her betegnet som reagens 1 og 2 for nitrat, og 3 og 4 for fosfat.



Figur 3-8: Kompaktfotometer PF-12plus som ble benyttet for å måle nitrat og fosfat innhold i de ulike avfallskildene. Foto: Sara Carolin Rundqvist

For måling av nitrat ble det tilsatt 5 mL prøve i fire reagensrør, en nullkilde og tre replikater. De tre replikantene ble tilsatt 5 dråper reagens 1 før de ble ristet for hånd og tilsatt en måleskje reagens 2. Korken ble skrudd på og rørene ristet i 1 minutt før de fikk hvile i fem minutter. Prøvenes utside ble rengjort med en spesialklut for å fjerne fettflekker som kan gi feil avlesning. Først ble røret uten reagenser målt for å registrere nullpunktet, deretter ble de tre replikantene satt i måleapparatet og resultatet ble avlest. For måling av fosfat ble det brukt samme fremgangsmetode som for nitrat. Prøvene ble tilsatt 6 dråper reagens 3, for så å bli ristet. Deretter ble 6 dråper reagens 4 tilsatt, og prøvene ble på ny ristet for hånd. Prøvene fikk hvile i ti minutter før resultatet kunne avleses.

For måling av ammonium (NH_4^+) ble det benyttet et Tetra testkit, hvor en tilsetter reagenser som reagerer med nitrogenforbindelsen og danner fargestoff. Denne fargeendringen blir avlest mot et fargeskjema som indikerer hvilket ammoniuminnhold prøven har i mg/L.

En kyvette ble fylt med 5 mL prøve, som så ble tilsatt 14 dråper reagens 1. Korken ble satt på og ristet forsiktig før syv dråper reagens 2 ble tilsatt.

Beholderen ble på ny ristet før 7 dråper reagens 3 ble tilført. Kyvetten ble så forsiktig ristet før den fikk «hvile» i 20 minutter. Før avlesning ble prøven igjen ristet, og deretter sammenlignet med fargeskjemaet (Figur 3-9).



Figur 3-9: Kyvetten plassert ved siden av fargeskjemaet for å sammenligne fargeforandring, og avlese innhold (mg/L) av ammonium i prøven. Foto: Sara Carolin Rundqvist

3.4.6 Mikroskopi og kamera

Mikroalgene ble undersøkt i et Leica FDMRBE lysmikroskop for å kontrollere at kulturene ikke var kontaminert, og for å observere algenes morfologi og tetthet. Kulturene ble undersøkt ved behov (mistanke om kontaminering), og ved prøvetakning i eksponentiell og stasjonær fase. Bilder ble tatt igjennom okularet med objektiv 40x fase 2. Bildedokumentasjon ble gjort med en Huawei P8 lite mobil.

3.4.7 Statistikk

Statistiske tester ble utført i statistikkprogrammet RStudio. Det ble utført t-test med $P < 0.05$, for å undersøke om det var en signifikant forskjell i:

- Relativt EPA- og DHA-innhold i de ulike kulturene mellom eksponentiell og stasjonær fase.
- Oppnådd celletetthet (OD 750) mellom høy og lav mengde tilsatt avfallsvann i stasjonær fase.
- Total fettsyrekonsentrasjon (mg/L) i stasjonær fase mellom lav og høy mengde tilsatt avfallsvann.
- EPA-konsentrasjon (mg/L) i stasjonær fase mellom lav og høy mengde tilsatt avfallsvann.

R-syntax og eksempler på t-tester som ble utført finnes i appendiks 2, tabell A4 og A5. Statistiske analyser av fettsyreprøvene ble delvis gjort automatisk ved bruk av et Chrombox program ved Kjemisk institutt.

4 Resultat

For å utforske ulike avfallskilder sitt potensiale som en alternativ N- og P kilde for mikroalger, ble forsøket satt opp i de to delene, innledende- og hovedscreening, som vil bli forklart separat. Det som var interessant å undersøke i dette studiet var i første omgang å se om de ulike avfallskildene klarte å tilfredsstille næringsbehovet til de aktuelle mikroalgene *P. tricornutum*, *T. suecica* og *M. gaditana*. Videre ble de to egenskapene som gjør visse mikroalger mer interessante i et kommersielt perspektiv, nemlig rask vekst og et høyt innhold av EPA og DHA vektlagt. Det ble på bakgrunn av dette satt minimumskriterier for vekstrate på 0.7 d^{-1} , som tilsvarer en dobling av antall celler per døgn, og er regnet som en god vekstrate for mikroalger. *P. tricornutum* har blitt registret med EPA-innhold av totale fettsyrer (TFA) på 13-17.4% (Steinrücken et al., 2018a, Ohse et al., 2015). *T. suecica* har blitt registrert med et EPA-innhold på 5.36% av TFA. Et minimumskriterium ble derfor satt til 13% og 5% for *P. tricornutum*, respektive *T. suecica*. Siden tørrvektprøvene ikke ble korrekt fremstilt (se side 38), var det ikke mulig å regne ut EPA- og DHA-innhold av tørrvekt.

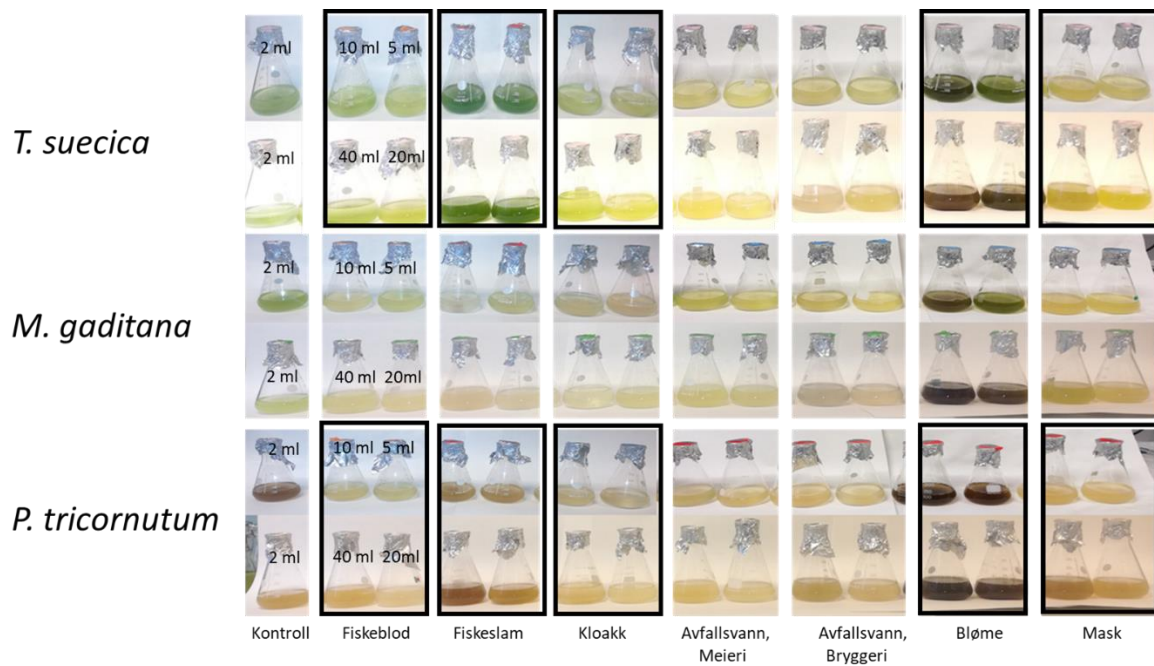
4.1 Resultat, innledende screening

Den innledende screeningens formål var å selektere ut de mest lovende avfallskildene, før videre oppskalering og testing i hovedscreeningen. Under den innledende screeningen ble *P. tricornutum*, *T. suecica* og *M. gaditana* sin evne til å utnytte de aktuelle avfallskildene som en potensiell næringskilde vurdert ut fra visuell observasjon, der fargeforandring (fra svak til kraftig) ble brukt som et mål på vekst. Fargeforandringen ble også sammenlignet med kontrollene, som var tilsatt vekstmediet WUR for å gi et godt sammenligningsgrunnlag. WUR er et veldefinert vekstmedium for mikroalger, som i teorien skal inneholde tilstrekkelige mengder av de nødvendige næringsstoffene for å gi god vekst. Bilder ble tatt både før og etter tilsettelse av alger, og også etter 7 og 14 dager for å kunne sammenligne fargeutvikling. God vekst ble observert som tette kulturer med en tydelig grønn/brun farge, mens dårlig vekst ble tolket ut fra liten til moderat fargeforandring.

4.1.1 Seleksjon av mikroalger og avfallsvann

Etter undersøkelse av de ulike mediene, ble det observert fargeendring hos alle artene med alle avfallskilder, men ikke ved alle avfallskonstrasjoner (Figur 4-1). Etter inspeksjon av alle flaskene, var det tydelig sterkere fargeforandring for både *P. tricornutum* og *T. Suecica* med fiskeslam, fiskeblod, kloakk, bløme og mask som vekstmedium (Tabell 4-1). Bløme og fiskeslam var de to

avfallskildene som hadde den tydeligste fargeforandringen. Det ble generelt observert svært begrenset fargeforandring for avfallsvann fra bryggeri og meier for både *P. tricornutum*, *T. suecica* og *M. gaditana*. Den tydeligste fargeforandringen ble generelt observert i kulturene tilsatt de høyeste mengden avfallsvann (20 mL og 40 mL). Ut fra de observerte resultatene ble de fem næringskildene: fiskeblod, fiskeslam, kloakk, bløme og mask som kunne opprettholde høyest algevekst selektert for videre bruk i hovedscreeningen. Flere av avfallskildene hadde en relativt kraftig farge, blant annet bløme, som gjorde det noe utfordrende å anslå den reelle fargeforandringen i kulturene.



Figur 4-1: Bilder fra den siste dagen av eksperimentet (dag 14), som sammenligner de syv ulike vekstmediene: fiskeblod, fiskeslam, kloakk, avfallsvann fra meieri, avfallsvann fra bryggeri, bløme, mask og kontrollene (WUR) med fire ulike konsentrasjoner (5 mL, 10 mL, 20 mL og 40 mL (*2 mL kontroll)) hos de tre artene: *P. tricornutum* (B58), *T. suecica* (UTEX LB 2286) og *M. gaditana* (CCMP526). De svarte boksene indikerer hvilke avfallskilder og arter som ble valgt ut for videre undersøkelse. Foto: Sara Carolin Rundqvist.

Tabell 4-1: Oversikt over de ulike mengdene avfallsvann (mL), vekstmediene og algene som ble testet. Tabellen viser hvor god responsen var under de ulike kultiveringsforholdene (basert på visuell observasjon). Et (++) symbol tilsvarer tydelig fargeforandring, (+) tilsvarer moderat til liten fargeforandring, mens (-) tilsvarer ingen fargeforandring. De svarte boksene indikerer hvilke avfallskilder og algeart som ble valgt ut for videre undersøkelse i hovedscreeningen.

Algeart, og mengden tilsatt avfallsvann (mL)	Fiskeblod	fiskeslam	Kloakk	Avfallsvann, Meieri	Avfallsvann, Bryggeri	Bløme	Mask
<i>T. suecica</i> (5 mL)	+	++	+	+	+	++	+
<i>T. suecica</i> (10 mL)	+	++	+	+	+	++	+
<i>T. suecica</i> (20 mL)	++	++	+	+	+	++	+
<i>T. suecica</i> (40 mL)	++	++	++	+	-	++	++
<i>M. gaditana</i> (5 mL)	+	+	+	+	+	++	+
<i>M. gaditana</i> (10 mL)	-	-	+	+	+	+	+
<i>M. gaditana</i> (20 mL)	-	-	-	-	-	-	+
<i>M. gaditana</i> (40 mL)	-	-	-	-	-	-	+
<i>P. tricorutum</i> (5 mL)	+	++	+	+	+	++	+
<i>P. tricorutum</i> (10 mL)	+	++	+	+	+	++	+
<i>P. tricorutum</i> (20 mL)	+	++	+	-	-	++	+
<i>P. tricorutum</i> (40 mL)	++	++	+	-	-	++	++

Selv om både *P. tricornutum*, *T. suecica* og *M. gaditana* viste vekst i form av fargeutvikling i kulturene (Figur 4-2), ble det jevnt over observert en betydelig svakere vekst for *M. gaditana*. *M. gaditana* responderte heller ikke tilfredsstillende på de høyeste mengdene tilsatt avfallsvann (20-40ml), og ble derfor ikke undersøkt videre i eksperimentet, da det i et kommersielt perspektiv vil være



Figur 4-2: De utvalgte artene brukt under forsøket. Fra venstre: *T. suecica* (UTEX LB 2286), *M. gaditana* (CCMP526) og *P. tricornutum* (B58). Foto: Sara Carolin Rundqvist.

nødvendig med god algevekst og høyt EPA/DHA-innhold. Det var også begrenset kapasitet i det spesialtilpassede kjølerommet, som begrenset antall arter og avfallskilder som kunne testes.

4.2 Resultat, hovedscreening

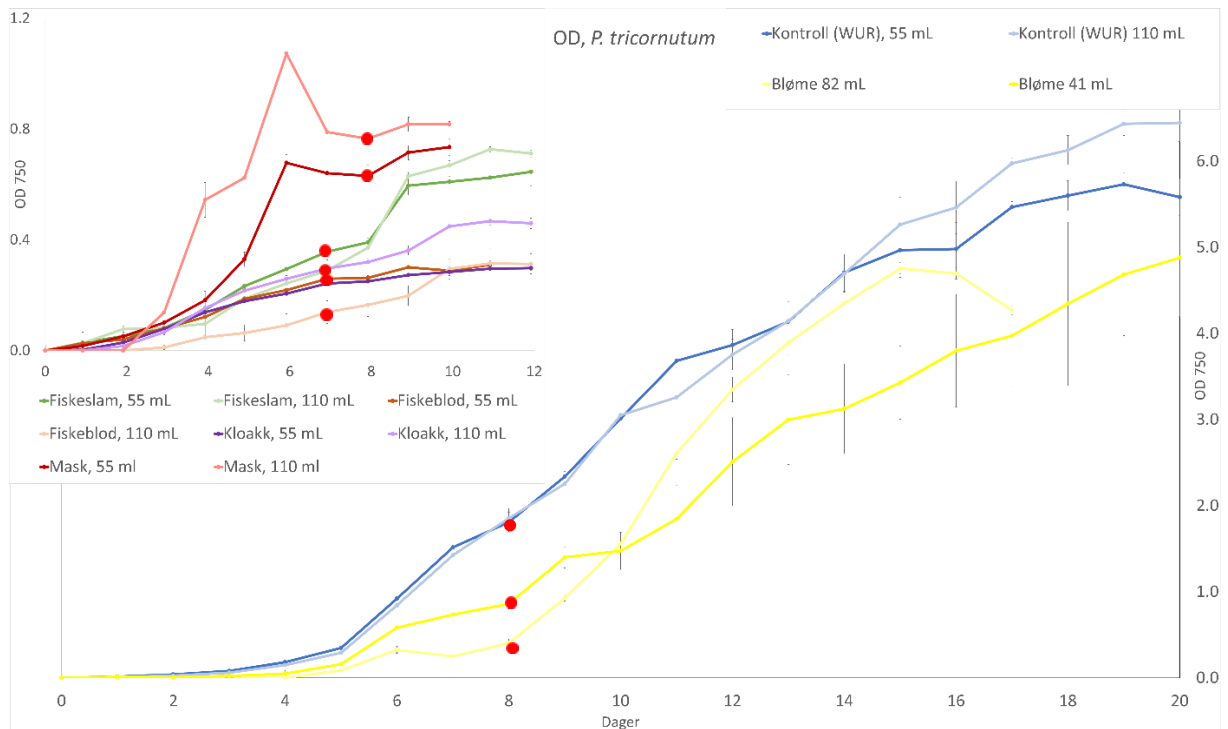
Under hovedscreeningen ble de fem mest lovende avfallskildene: mask, bløme, fiskeblod, fiskeslam og kloakk testet ut mot *P. tricornutum* og *T. Suecica*. Kulturene ble kultivert i dyrkningsrør tilsatt 55 mL (41 mL* bløme) eller 110 mL (82 mL* bløme) avfallsvann eller kontrollmedium (WUR). Det ble også tillaget duplikater for hver avfallskilde/alge kombinasjon.

Det som var interessant å undersøke i denne delen av eksperimentet var hvilke avfallskilder og hvilken mengde tilsatt avfallsvann som ga best vekst, og om høy vekst også samsvarte med et høyt innhold av EPA og DHA. Hvor godt algene responderte på kultivering med de ulike avfallskildene ble sammenlignet med kontrollene (WUR), som også ble benyttet under den innledende screeningen for å avgjøre hvor velegnede avfallskildene var for kultivering av mikroalger.

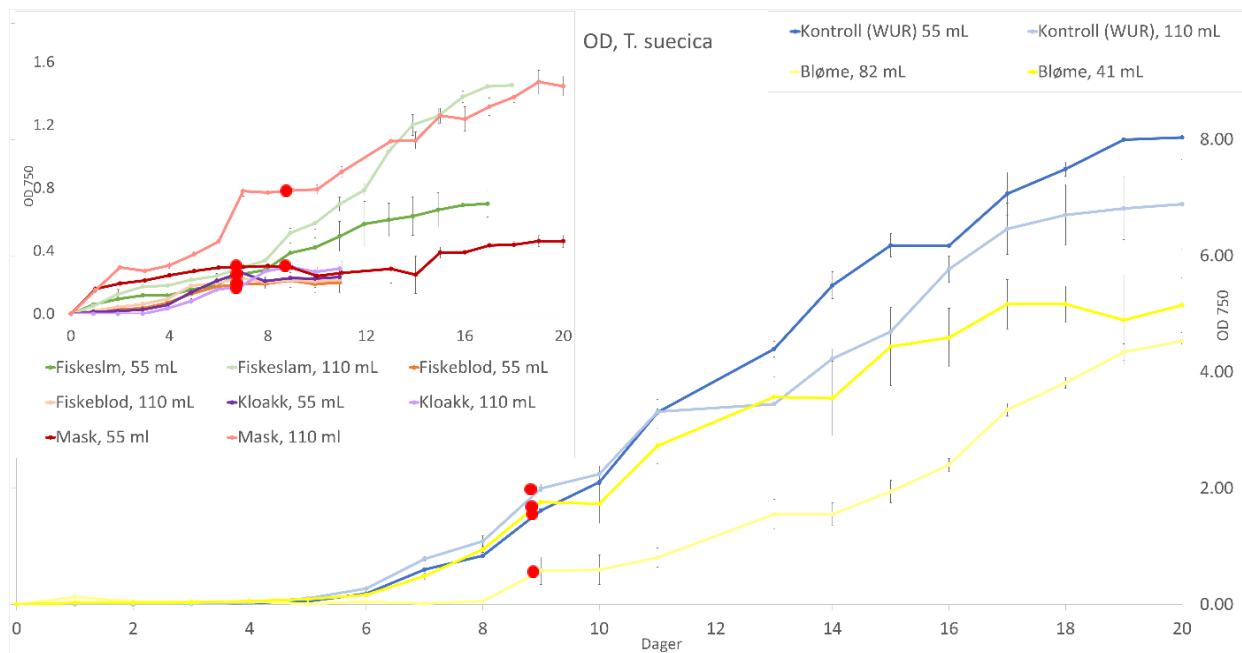
4.2.1 Vekst

Optisk tetthet (OD 750) ble målt hver dag under eksperimentet, og ble brukt som et mål på algekulturenes celletetthet. Det ble registrert vekst ved kultivering med alle avfallskildene og konsentrasjonene for begge artene. Det var imidlertid stor spredning i hvor godt algene vokste på de ulike avfallskildene (Figur 4-3 og 4-4). Generelt fant man det klassiske vekstforløpet for artene, hvor algene i starten hadde en lagfase som gikk over i eksponentiell fase, for så å flate ut i en tilnærmet stasjonær fase. For både *P. tricornutum* og *T. Suecica* fant en at algekonsentrasjonene oppnådd i stasjonær fase dannet to grupperinger. En med høy algekonsentrasjon, bestående av kontrollene (WUR) og bløme, og en med lav algekonsentrasjon, bestående av de resterende avfallskildene. Gruppen som oppnådde lav celletetthet kom også fortere i stasjonær fase. Gruppen som oppnådde høy celletetthet hadde en betydelig lengre eksponentiell fase, og veksten begynte ikke å flate ut før tidligst etter 15 dager for både *P. tricornutum* og *T. suecica*. Celletetthet i stasjonær fase syntes generelt å øke fra lav til høy mengde tilsatt avfallsvann, men bare for *P. tricornutum* med kloakk og *T. suecica* med kloakk og bløme var denne forskjellen signifikant ($p < 0.05$).

Utenom kontrollene var bløme 41 mL den avfallskilden som ga høyest celletetthet for begge artene (Figur 5-3 og 5-4), men disse kulturene hadde også et relativt stort standardavvik fra dag 10 og utover. I starten av eksperimentet hadde de ulike kulturene en lagfase på ca. 2 dager før veksten begynte å ta seg opp. Kulturene med bløme 82 mL hadde imidlertid et noe atypisk vekstmønster, hvor veksten ikke begynte å ta seg opp før etter 8 dager for både *P. tricornutum* og *T. suecica* (Figur 5-3 og 5-4). Den samme kulturen hadde også en nedgang i celletetthet etter dag 15 med *P. tricornutum* (Figur 5-3). Dette så man også for *P. tricornutum* med mask 110 mL, som hadde en relativt kraftig vekst frem til dag 6, før den fikk et kraftig fall i celletetthet, for så å stabilisere seg utover i eksperimentet.



Figur 4-3: Vekstkurve for *P. tricornutum* ved kultivering i de ulike avfallskildene. Hovedgrafene viser vekstkurven for kontrollene (WUR 55 mL og 110 mL), samt den avfallskilden som oppnådde den høyeste celletettheten (bløme, 41 mL og 82 mL). Grafene opppe til venstre viser de resterende avfallskildene som ikke hadde en tilfredsstillende vekst under kultivering (fiskeslam, fiskeblod, kloakk og mask). Grafene viser gjennomsnittet \pm SD av duplikatene for hver avfallskilde. Y-aksen viser OD₇₅₀, mens X-aksen viser antall dager. De røde dottene markerer hvilke dager de ulike kulturene ble høstet for eksponert fase.

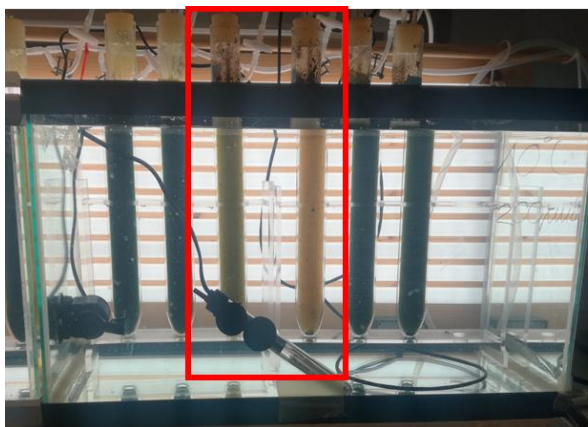


Figur 4-4: Vekstkurve for *T. suecica* ved kultivering i de ulike avfallskildene. Hovedgrafene viser vekstkurven for Kontrollene (55 mL og 110 mL WUR), samt den avfallskilden som oppnådde den høyeste celletettheten (bløme, 41 mL og 82 mL). Grafene opppe til venstre viser de resterende avfallskildene som ikke hadde en tilfredsstillende vekst under kultivering (fiskeslam, fiskeblod, kloakk og mask). Grafene viser gjennomsnittet \pm SD av duplikatene for hver avfallskilde. Y-aksen viser OD₇₅₀, mens X-aksen viser antall dager. De røde dottene markerer hvilke dager de ulike kulturene ble høstet for eksponert fase.

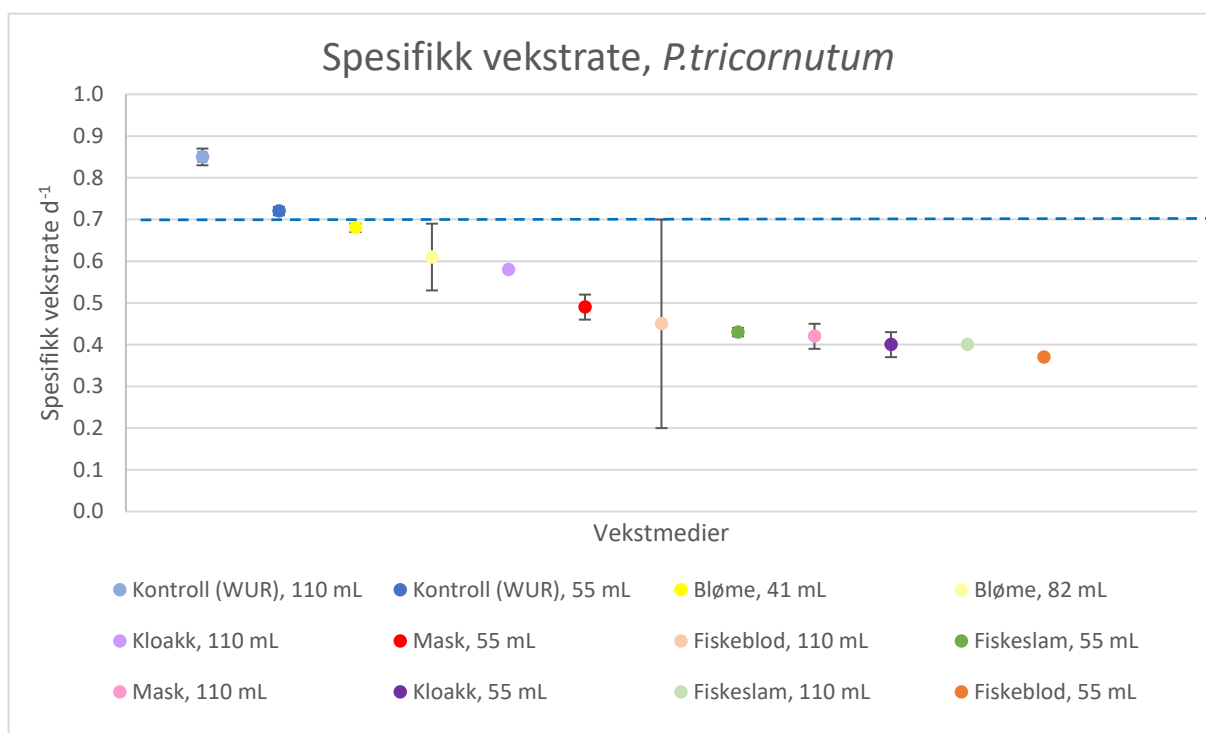
Spesifikk vekstrate på 0.7 d^{-1} ble satt som et minimumskriterium. Av avfallskilden oppnådde bare *T. suecica* med kloakk 110 mL ($0.7 \pm 0.2 \text{ d}^{-1}$), og *P. tricornutum* med bløme 41 mL ($0.7 \pm 0.0 \text{ d}^{-1}$) dette kriteriet (Figur 4-6 og 4-7). Med kultivering med kontrollene (WUR), oppnådde *T. suecica* en spesifikk vekstrate på $0.8 \pm 0.2 \text{ d}^{-1}$ (WUR 110 mL). *P. tricornutum* oppnådde en vekstrate på $0.9 \pm 0.0 \text{ d}^{-1}$ (WUR 110 mL). Begge artene har derfor potensiale til å oppnå en vekstrate over 0.7 d^{-1} .

Det ble ikke funnet noen generell trend mellom høy mengde tilsatt avfallsvann og høyere vekstrate. Hvilken konsentrasjon avfallsvann som ga best vekst varierte både mellom avfallskildene og artene. Med unntak av kontrollene ble den høyeste spesifikke vekstraten for *T. suecica* registrert under kultivering med kloakk 110 mL, men denne kulturen hadde også et svært høyt standardavvik sammenlignet med kultivering med de andre avfallskildene (Figur 4-7). Ser man bort i fra kloakk 110 mL for *T. suecica*, var det ved kultivering med bløme 41 mL som ga den høyeste vekstraten på $0.5 \pm 0.0 \text{ d}^{-1}$, og begge algene oppnådde også sin høyeste celletetthet med dette vekstmediet (Figur 4-3 og 4-4). *T. suecica* oppnådde generelt lavere spesifikk vekstrate enn *P. tricornutum*, og hadde verdier helt ned til $0.1 \pm 0.0 \text{ d}^{-1}$ ved kultivering med mask 55 mL (Figur 4-7). *P. tricornutum* hadde på sin side en jevnt over høyere spesifikk vekstrate. Den laveste verdien registrert for *P. tricornutum* var under kultivering med fiskeblod 55 mL, med en vekstrate på $0.4 \pm 0.0 \text{ d}^{-1}$ (Figur 4-6).

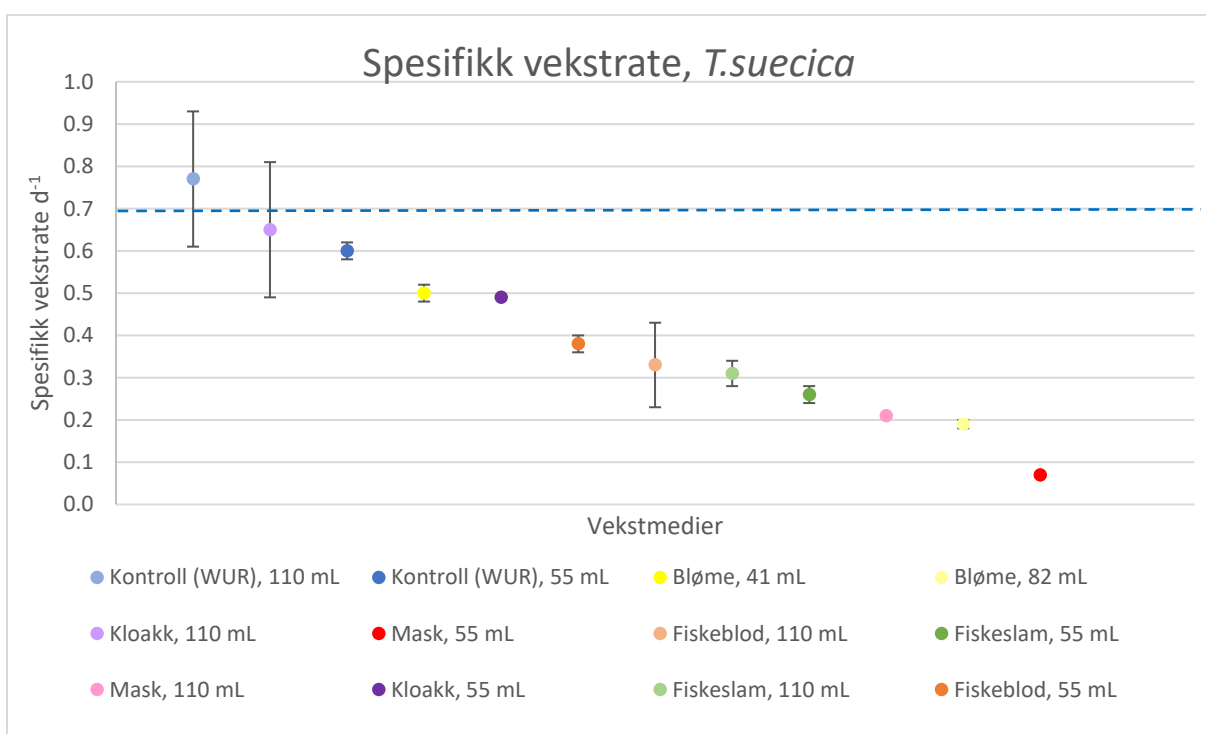
Selv om *T. suecica* oppnådde den høyeste vekstraten ved kultivering i kloakk 110 mL, stoppet veksten for denne kulturen raskt opp. Den oppnådde ved avsluttet forsøk en lav celletetthet sammenlignet med kultivering med bløme 82 mL, som hadde en vekstrate på 0.2 d^{-1} , men oppnådde likevel en svært høy celletetthet (Figur 4-4). *T. suecica* kultivert med bløme 82 mL hadde en noe treg vekst i starten av forsøket, før kulturene begynte å ta seg opp. Det var også til tider et relativt stort OD 750 standardavvik mellom duplikatkulturene, som også kunne observeres som tydelige fargeforskjeller mellom dem (Figur 4-5).



Figur 4-5: *T. suecica* under kultivering, dag 9. De markerte dyrkningsrørene viser duplikatene til bløme 82 mL. Foto: Sara Carolin Rundqvist.

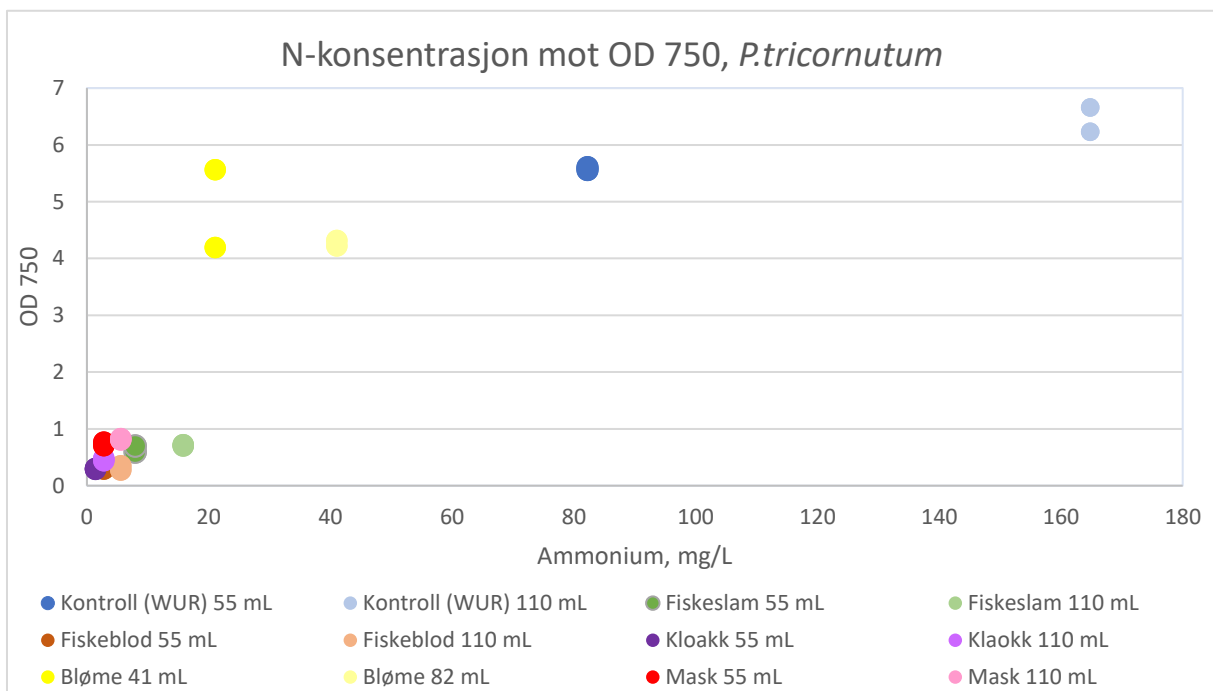


Figur 4-6: Oversikt over spesifikk vekstrate (d^{-1}) for *P. tricornutum*, ved kultivering i de ulike avfallskildene. Alle verdiene er et gjennomsnitt av duplikatene, \pm SD. Blå linje markerer minimumskriteriet for spesifikk vekstrate på $0.7 d^{-1}$.

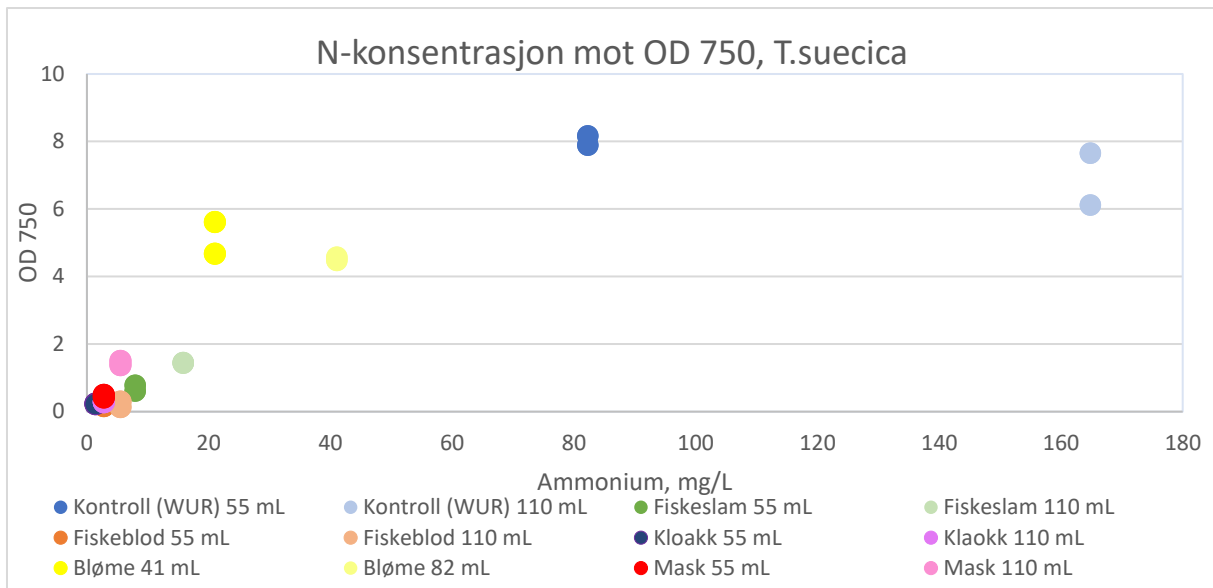


Figur 4-7: Oversikt over spesifikk vekstrate (d^{-1}) for *T. suecica*, ved kultivering i de ulike avfallskildene. Alle verdiene er et gjennomsnitt av duplikatene \pm SD. Blå linje markerer minimumskriteriet for spesifikk vekstrate på $0.7 d^{-1}$.

Analysene som i ettertid ble utført på næringsinnhold (N og P) i de forskjellige avfallskildene viste at de fleste kulturrene kunne betraktes som næringsfattige i de konsentrasjonene som ble brukt i eksperimentet (Appendiks 2, tabell A6). N-konsentrasjonen målt som ammonium varierte fra 1.4 mg/L i lav konsentrasjon (Kloakk 55 mL) til 41.0 mg/L i høy konsentrasjon (Bløme 82 mL). Hvor høy celletetthet kulturen oppnådde, gitt som OD 750 i stasjonær fase, ble plottet mot N-konsentrasjonen, som vist i figur 4-8 og 4-9 for henholdsvis *P. tricornutum* og *T. suecica*. For begge algene fant en at oppnådd celletetthet var lav ved lav N-konsentrasjon og syntes å øke med økende N-konsentrasjon, for så å flate ut.



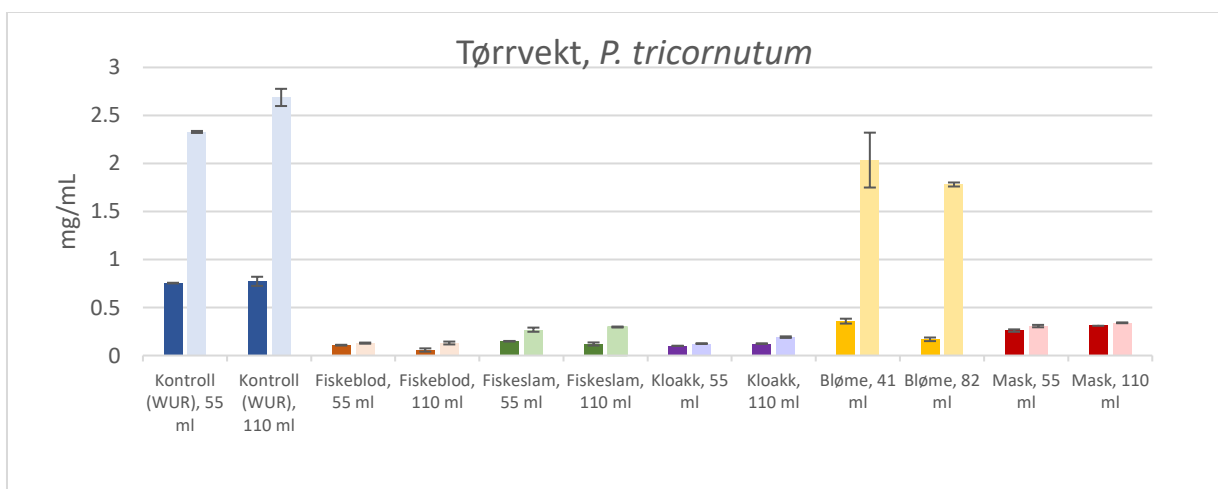
Figur 4-8: N-konsentrasjonen mot OD 750 i stasjonær fase for *P. tricornutum*. Duplikatverdiene for hver avfallskilde er vist. Y-aksen viser OD 750 i stasjonær fase, mens x-aksen viser ammonium innholdet i de ulike kulturrene (mg/L). Nitratinnholdet i kontrollene er regnet om til tilsvarende mengde ammonium (Appendiks 2, tabell A6).



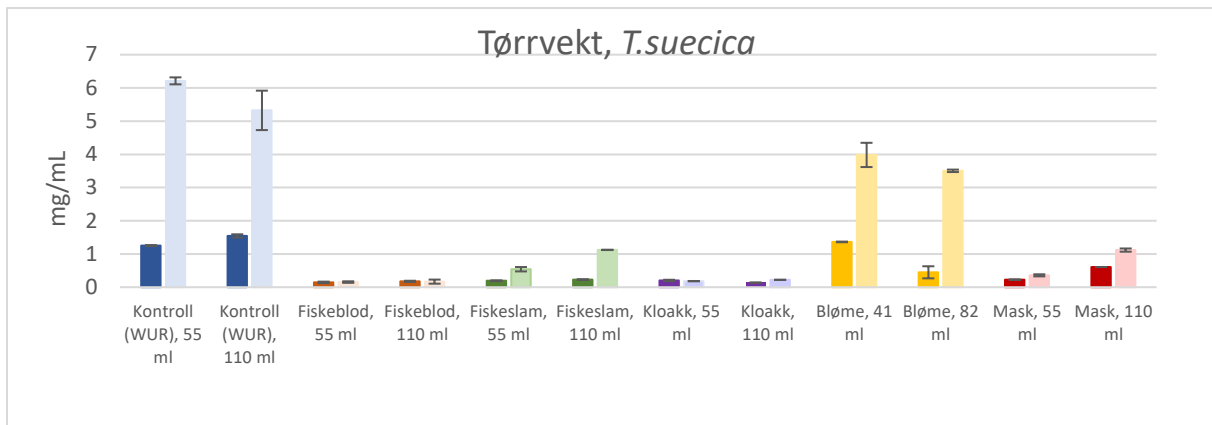
Figur 4.9: N-konsentrasjonen mot OD 750 i stasjonær fase for *T. suecica*. Duplikatverdiene for hver avfallskilde er vist. Y-aksen viser OD 750 i stasjonær fase, mens x-aksen viser ammonium innholdet i de ulike kulturene(mg/L). Nitratinnholdet i kontrollene er regnet om til tilsvarende mengde ammonium (Appendiks, tabell A6).

4.2.2 Tørrvekt

Det ble benyttet OD-tørrvekt kalibrering for å estimere tørrvekt for algene (Appendiks 1, Figur A1 og A2). For både *P. tricornutum* og *T. suecica* var bløme den avfallskilden algene oppnådde høyest estimert tørrvekt på henholdsvis 2.0 ± 0.3 og 4.0 ± 0.4 mg/mL (Figur 4-10 og 4-11). På de resterende avfallskildene oppnådde de to artene en generelt lav tørrvekt (under 0.5 mg/mL for *P. tricornutum* og under 1.5 mg/mL for *T. suecica*) under både eksponentiell og stasjonær fase. *T. suecica* var den algen som totalt sett oppnådde den høyeste tørrvekten ved kultivering med de ulike avfallskildene, som generelt ga omtrent dobbelt så høye verdier sammenlignet med *P. tricornutum*.



Figur 4-10: Estimert tørrvekt (mg/mL) for *P. tricornutum* oppgitt som gjennomsnitt av duplikater, \pm SD i eksponentiell og stasjonær fase. De mørke fargene representerer eksponentiell fase, mens de lyse viser stasjonær fase.



Figur 4-11: Estimert tørrvekt (mg/mL) for *T. suecica* oppgitt som gjennomsnitt av duplikater, \pm SD i eksponentiell og stasjonær fase. De mørke fargene representerer eksponentiell fase, mens de lyse viser stasjonær fase.

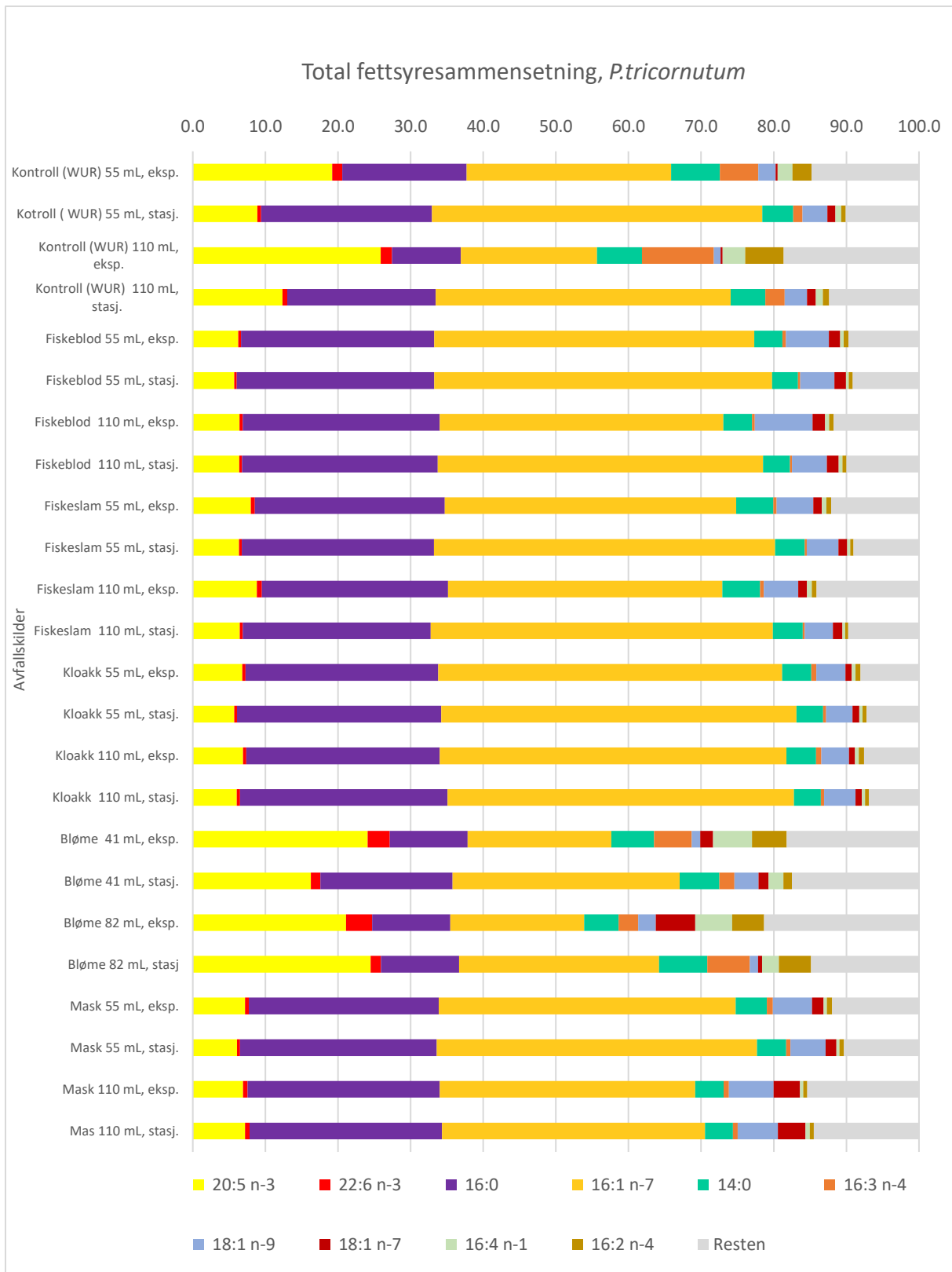
4.2.3 Fettsyrer

Fettsyresammensetningen til *P. tricornutum* var dominert av EPA (20:5 n-3), Palmitoleic-syre (16:1 n-7) og Palmitinsyre (16:0) som utgjorde mellom 5.7-25.5%, 18.5-48.9%, respektive 9.5-28.6% av den totale fettsyresammensetningen (TFA) (Figur 4-12). For *T. suecica* var det fettsyrene Oljesyre (18:1 n-9), Palmitinsyre (16:0), Alfalinolensyre (ALA) (18:3 n-3) og Hexadekatetraensyre (16:4 n-3) som var de mest dominerende, på henholdsvis 6.1-38.4%, 16.1-31.4%, 5.44-17.6% og 3.3-19.7% av TFA (Figur 4-13). Det ble registrert et tydelig skifte i den relative fettsyresammensetningen fra eksponentiell til stasjonær fase for begge algene under kultivering med kontroll og bløme. Fra generelt å ha et høyere nivå av flerumettede fettsyrer som EPA, DHA (bare *P. tricornutum*) og ALA i den eksponentielle fasen, ble det en større dominans av mettede og monumettede fettsyrer som oljesyre, palmitoleic-syre og palmitinsyre i den stasjonære fasen. Skiftet i EPA-innhold var imidlertid ikke gjeldende for *T. suecica*. Skiftet i fettsyreprofil mellom de to vekstfasene var heller ikke like fremtredende for de resterende avfallskildene (Figur 4-12 og 4-13).

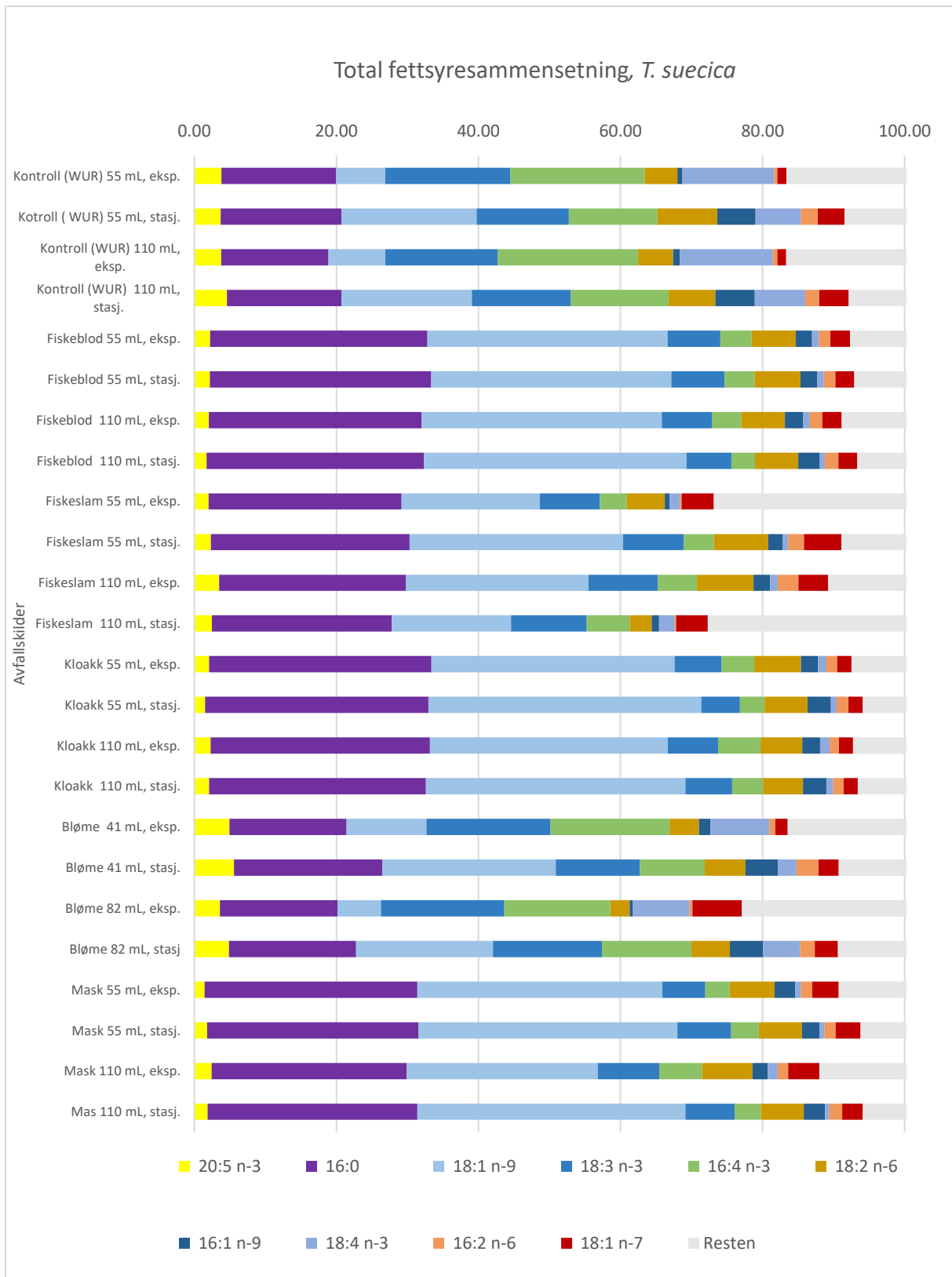
Både *P. tricornutum* og *T. suecica* inneholdt EPA i varierende mengder, men DHA ble bare registrert hos *P. tricornutum* (Figur 4-14 og 4-15). Innholdet av EPA i % av TFA var generelt høyere for *P. tricornutum* enn for *T. suecica*. For *P. tricornutum* var relativt EPA-innhold også generelt høyere i eksponentiell enn i stasjonær fase. Unntaket var bløme 82 mL, som hadde signifikant høyere EPA nivå i stasjonær fase, og mask 110 mL, hvor det ikke kunne påvises noen forskjell mellom de to vekstfasene (Figur 4-14). Den samme trenden gjaldt også for relativ DHA-innhold, med unntak av fiskeblod 110 mL, kloakk 110 mL og mask 110 mL som ikke hadde signifikant forskjell mellom de to vekstfasene. Den høyeste andelen relativt DHA hos *P. tricornutum* var med bløme både i

eksponentiell og stasjonær fase. Trenden med lavere EPA-innhold syntes ikke å gjelde for *T. suecica*, hvor bare fiskeblod 110 mL, fiskeslam 110 mL, kloakk 55 mL og mask 110 mL hadde et signifikant lavere relativt EPA innhold i stasjonær fase (Figur 4-15). De resterende kulturene hadde enten ingen signifikant forskjell eller signifikant høyere EPA innhold i eksponentiell fase.

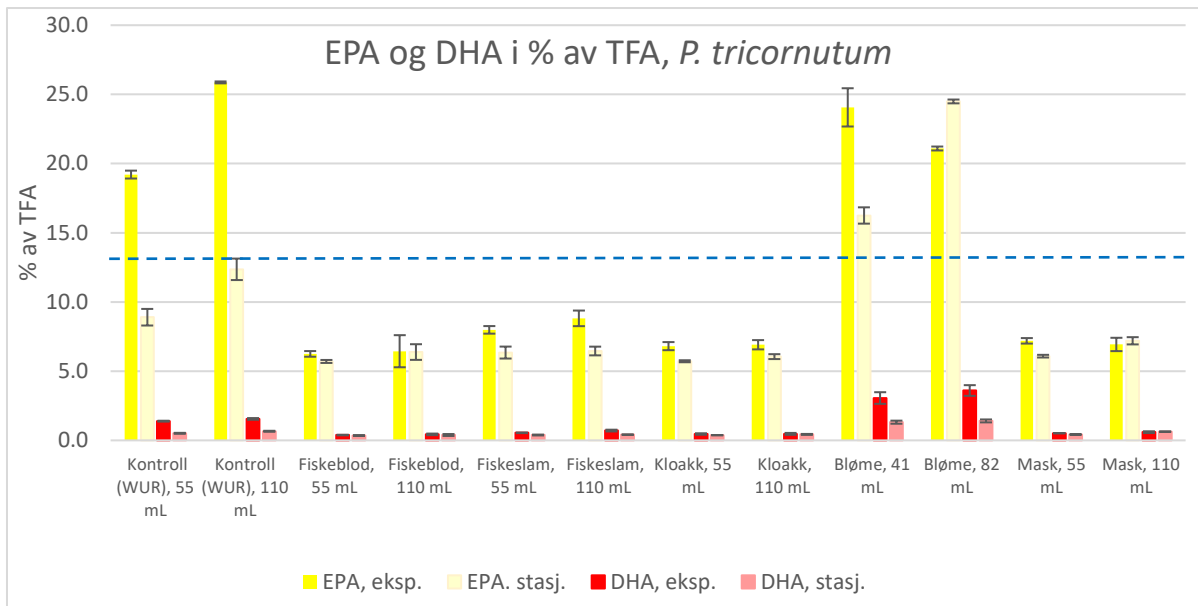
Begge artene oppnådde generelt høyere EPA i % av TFA ved kultivering med bløme og kontrollene, enn med de andre avfallskildene. Ved sammenligning av artene med de ulike vekstmediene, ble det funnet en generell trend med mer enn tre ganger så mye EPA i % av TFA for *P. tricornutum* enn *T. suecica*. I de kulturene som oppnådde høyest celledetthet (bløme og kontroll) var denne forskjellen nærmere fem ganger så høy. *P. tricornutum* oppnådde bare minimumskriteriet på 13% EPA av TFA ved kultivering med bløme og kontrollene. Det høyeste relative innholdet av EPA var ved kultivering med bløme 82 mL, som hadde et EPA-innhold på $24. \pm 0.1\%$ av TFA i stasjonær fase. Dette var nesten dobbelt så høyt som ved kultivering med kontrollene i den samme fasen. For *T. suecica*, var minimumsnivået satt til 5%. Dette nivået ble bare oppnådd ved kultivering med bløme 41 mL ($5.6 \pm 0.2\%$) i stasjonær fase (Figur 4-15). Begge artene oppnådde dermed et høyere relativt EPA-innhold med avfallskilden bløme enn kontrollene både i eksponentiell og stasjonær fase med *T. suecica*, og i stasjonær fase for *P. tricornutum*. *P. tricornutum* hadde et betydelig lavere innhold av DHA i % av TFA enn EPA. Det høyeste registrerte innholdet var også her ved kultivering med bløme 41 mL og 82 mL, som hadde et DHA-innhold på $3.1 \pm 0.4\%$, respektive $3.6 \pm 0.4\%$ i eksponentiell fase.



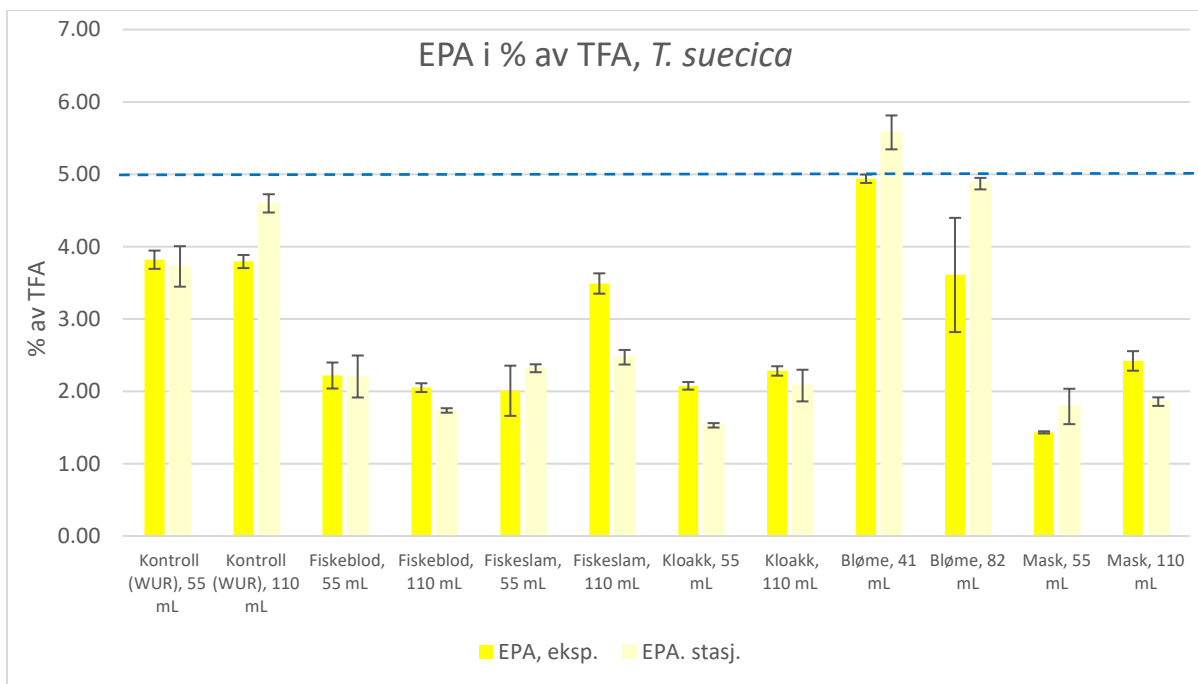
Figur 4-12: Total fettsyresammensetning for hver avfallskilde og konsentrasjon under eksp. og stasj. fase for *P. tricornutum*. Oversikten viser hvilke fettsyrer og hvor mange prosent de ulike fettsyrene utgjør av artenes totale fettsyresammensetning. Fettsyrer med et prosentinnhold på under 3% er samlet under «resten».



Figur 4-13: Total fettsyresammensetning for hver avfallsskilde og konsentrasjon under eksp. og stasj. fase for *T. suecica*. Oversikten viser hvilke fettsyrer og hvor mange prosent de ulike fettsyrer utgjør av artenes totale fettsyresammensetning. Fettsyrer med et prosentinnhold på under 3% er samlet under «resten».

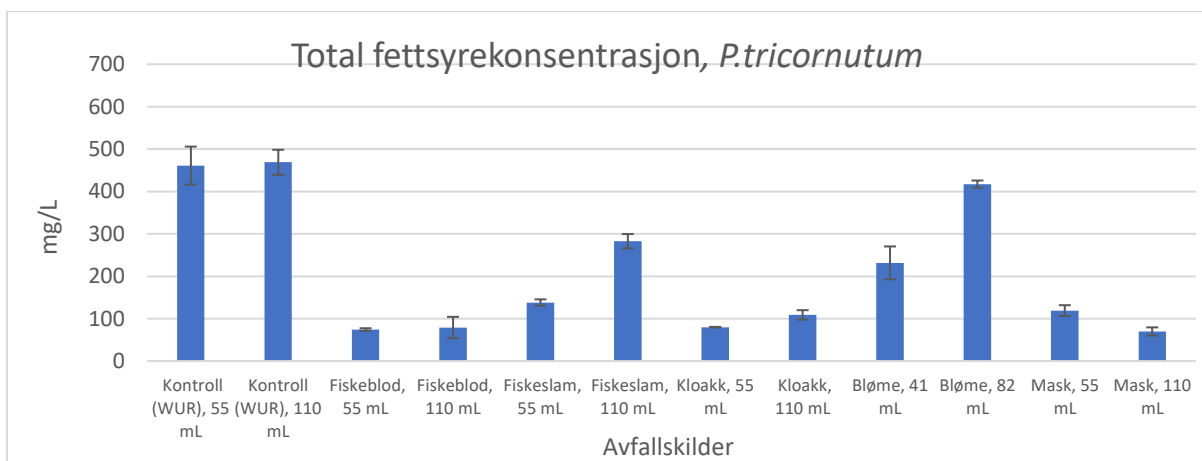


Figur 4-14: EPA (gult) og DHA (rødt) vist som prosent av TFA for *P. tricornutum*. Blå stiplet linje indikerer minimumskriteriet på 13% EPA av TFA som ble satt for denne arten. De mørke fargene indikerer eksponentiell fase, mens de lyse viser stasjonær fase.

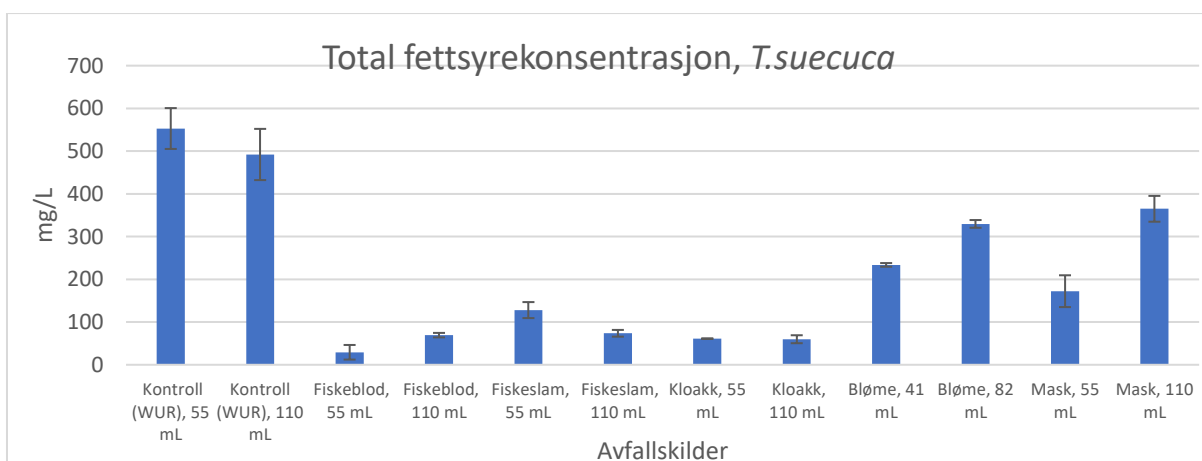


Figur 4-15: EPA (gult) vist som prosent av TFA for *T. suecica*. Blå stiplet linje indikerer minimumskriteriet på 5% EPA av TFA som ble satt for denne arten. De mørke fargene indikerer eksponentiell fase, mens de lyse viser stasjonær fase.

Total fettsyrekonsentrasjon, gitt som mg/L i stasjonær fase, er vist i figur 4-16 og 4-17 for henholdsvis *P. tricornutum* og *T. suecica*. For begge algene varierte verdiene over tilnærmet samme størrelsesområde: fra 74.1 ± 25.2 - 461 ± 44.8 mg/L hos *P. tricornutum*, og 29.3 ± 17.1 - 552.9 ± 47.8 mg/L hos *T. suecica*. Hvordan fettsyrekonsentrasjonen varierte mellom de forskjellige avfallskildene fulgte også mye den samme trenden for de to algene. For *P. tricornutum* var høyeste verdi med bløme 82 mL (417.3 ± 8.5 mg/L), og for *T. suecica* bløme 82 mL (329 ± 9.0 mg/L) og mask 110 mL (365.0 ± 30.2 mg/L). Når man går fra lav til høy mengde tilsatt avfallsvann var det generelt en økning i fettsyrekonsentrasjon eller ingen påviselig endring. For begge algene var det imidlertid ett tilfelle hvor fettsyrekonsentrasjonen sank når man økte avfallskonsentrasjonen. Hos *P. tricornutum* var dette med mask, og hos *T. suecica* med fiskeslam. For begge tilfellene fant en, som figurene viser, at den andre algen hadde en relativt stor fettsyre økning fra lav til høy konsentrasjon på den samme avfallskilden.

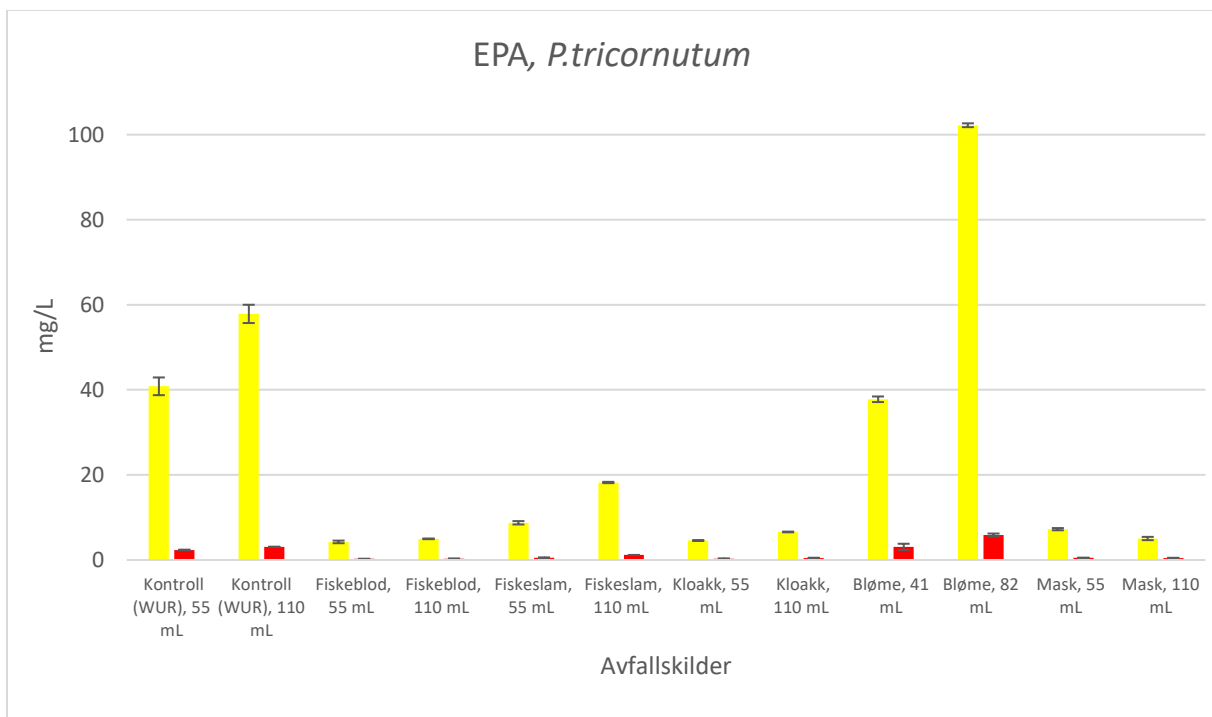


Figur 4-16: Total fettsyrekonsentrasjon oppgitt i mg/L i stasjonær fase for *P. tricornutum*. Verdiene er et gjennomsnitt av duplikatkulturene \pm SD.

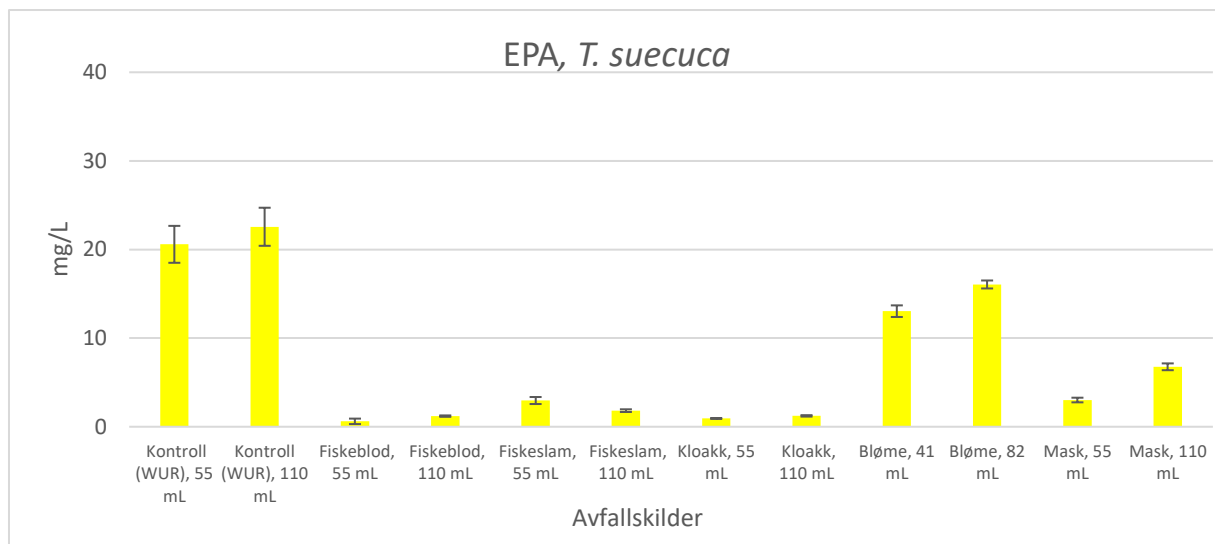


Figur. 4-17: Total fettsyrekonsentrasjon oppgitt i mg/L i stasjonær fase for *T. suecica*. Verdiene er et gjennomsnitt av duplikatkulturene \pm SD.

Ser en på EPA-konsentrasjonen i stasjonær fase, var denne generelt betydelig høyere hos *P. tricornutum* enn *T. suecica* på alle avfallskilder (Figur 4-18 og 4-19). For begge algene var bløme den avfallskilden som ga den høyeste EPA-konsentrasjonen, hvor *P. tricornutum* og *T. suecica* på bløme 82 mL oppnådde henholdsvis 102.2 ± 2.5 mg/L og 16.1 ± 0.5 mg/L. Den høye EPA-konsentrasjonen på bløme 82 mL var også signifikant høyere enn kontrollene med klar margin for *P. tricornutum*. Som for total fettsyrekonsentrasjon, var det også for EPA en generell økning eller ingen påviselige endringer i EPA-konsentrasjon mellom lav og høy mengde tilsatt avfallsvann, med unntak av mask for *P. tricornutum* og fiskeslam for *T. suecica*. *P. tricornutum* dannet DHA i langt mindre grad enn EPA, og maksverdi var også her med bløme 82 mL (5.9 ± 0.3 mg/L).



Figur 4-18: EPA- og DHA-konsentrasjon oppgitt i mg/L i stasjonær fase for *P. tricornutum*. Verdiene er et gjennomsnitt av duplikatkulturene \pm SD. De røde søylene viser DHA, mens de gule viser EPA.

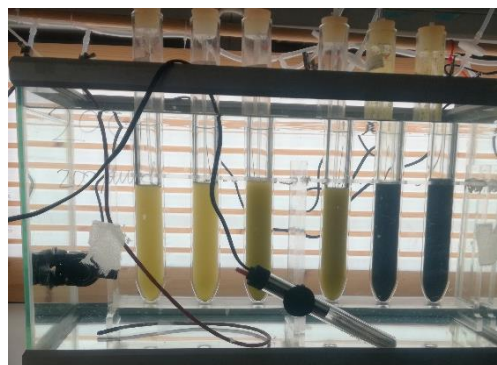


Figur 4-19: EPA-konsentrasjon oppgitt i mg/L i stasjonær fase for *T. suecica*. Verdiene er et gjennomsnitt av duplikatkulturene \pm SD. De gule søylene viser EPA.

4.2.4 Innhold av nitrat, fosfat og ammonium

Av de to nitrogenkildene som ble testet, inneholdt alle avfallskildene ammonium, men i svært varierende mengder (Tabell 4-2). Nitratinnholdet i de ulike avfallskildene var generelt svært lavt (>1.0-1.7 mg/L). Alle avfallskildene inneholdt fosfat, fra 2.1 mg/L i kloakk til 245 mg/L i bløme. Det var generelt et lavt innhold av nitrat, ammonium og fosfat i de ulike avfallskildene, med unntak av bløme, som hadde et høyt innhold av både fosfat og ammonium, på henholdsvis 245 mg/L og 150 mg/L. For kontrollen (WUR) var eneste nitrogenkilden nitrat. Nitrat er imidlertid et tungt molekyl sammenlignet med ammonium (ca. 3.5 ganger tyngre). Det vil derfor være mindre nitrogen tilgjengelig per milligram nitrat.

Tar man utgangspunkt i Redfieldforholdet med et optimalt N:P forhold på 16:1, var det kontrollen (WUR) som lå tette opp til dette forholdet, med en ratio på 15:1 (Tabell 4-2). Av avfallskildene var det kloakk og fiskeblod som hadde det mest optimale N:P forholdet på henholdsvis 20:1 og 22:1. Disse avfallskildene hadde imidlertid det laveste innholdet av både nitrogen og fosfor. Det ble også observert fargeforandring fra grønn til en mer gul kultur når *T.*



Figur 4-20: Duplikatene for *T. suecica*. Fra venstre mask 55 mL, mask 110 mL og kontroll (WUR) 55 mL. Foto: Sara Carolin Rundqvist

suecica ble kultivert med disse avfallskildene (Figur 4-20). Det var ikke mulig å observere den samme fargeforandringen for *P. tricornutum*, da både avfallskildene og arten hadde en brun farge.

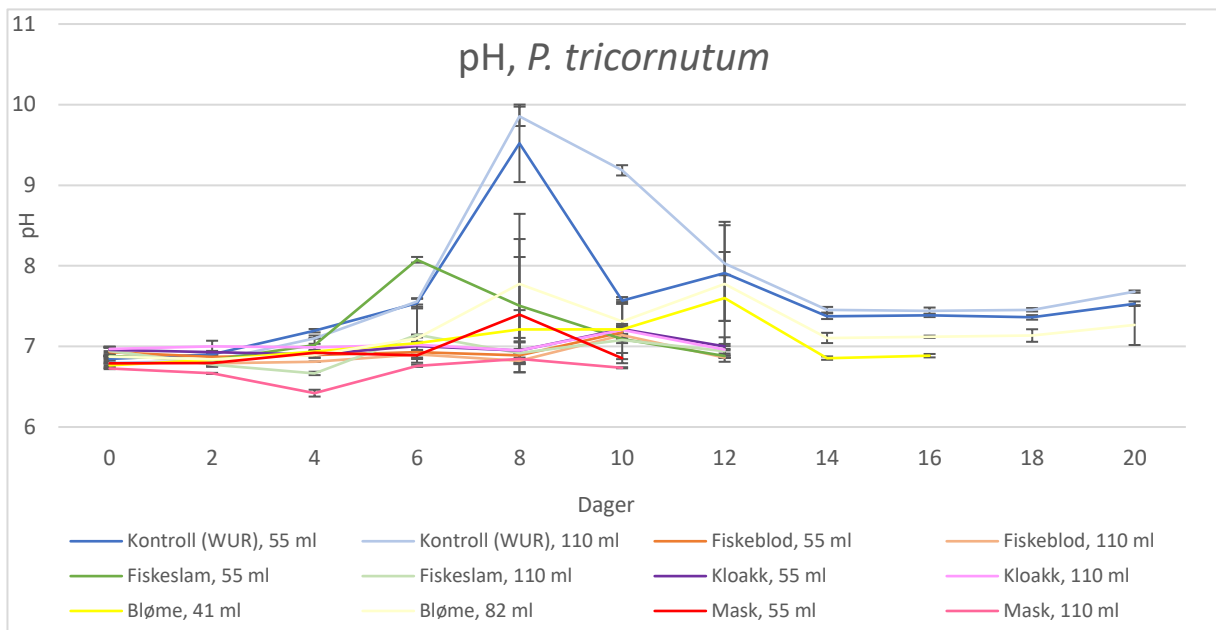
Tabell 4-2: Oversikt over innholdet av nitrat, fosfat og ammonium (mg/L) i de fem avfallskilden: fiskeblod, fiskeslam, kloakk, bløme og mask.* Innhold av nitrat og fosfat i kontrollen (WUR) er regnet ut fra oppskrift (appendiks 1, tabell A1). N:P forholdet er regnet ut fra molarmassen til nitrat, fosfat og ammonium.

Avfallskilder (mg/L)	Nitrat (NO ₃ ⁻)	Ammonium (NH ₃ /NH ₄ ⁺)	Fosfat (PO ₄ ³⁻)	N:P
Kontroll (WUR)*	1546	0	160	15:1
Fiskeblod	1.7	15.0	3.9	22:1
Fiskeslam	>1.0	43.0	35.5	7:1
Kloakk	1.1	7.5	2.1	20:1
Bløme	1.7	150.0	245.0	3:1
Mask	>1.0	15.0	56.0	2:1

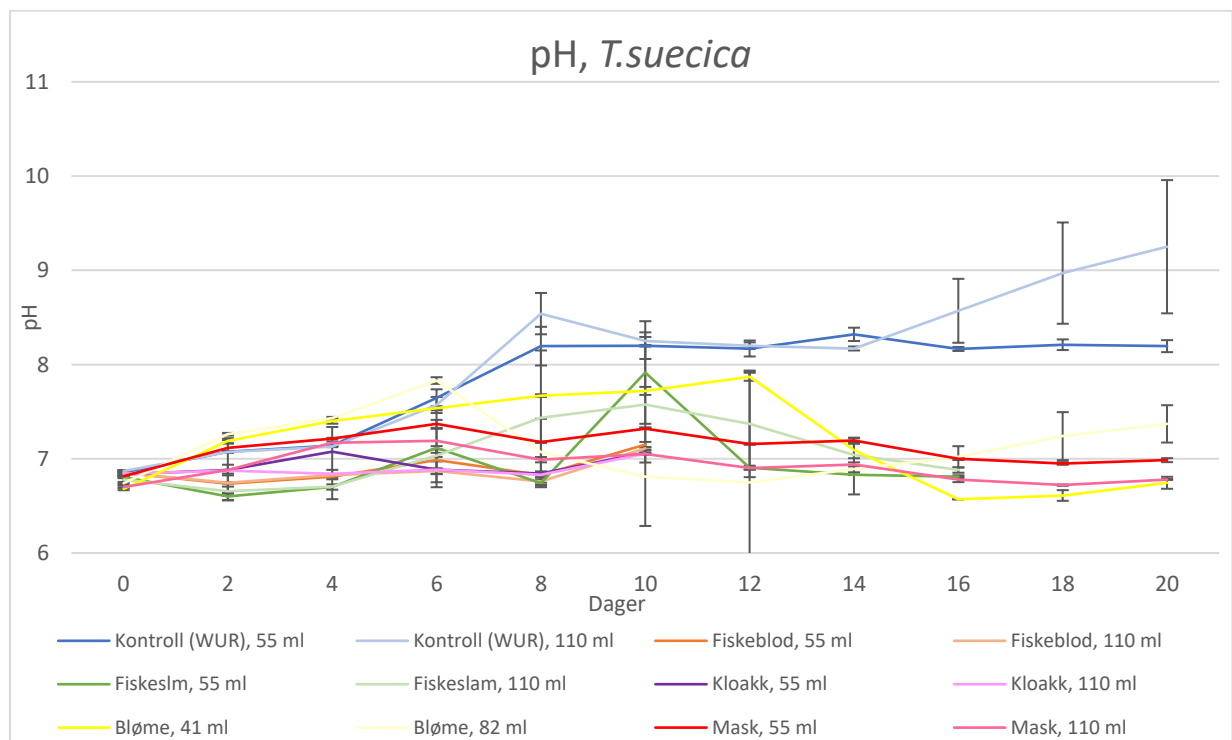
4.2.5 pH

pH for *P. tricornutum* og *T. suecica* i de ulike kulturene holdt seg i området 6.5-7.5 de fire første dagene av eksperimentet. Deretter var det en markant økning i pH for kontrollkulturene (WUR 55mL og 110 mL) (Figur 4-21 og 4-22), som for *P. tricornutum* nådde sitt toppunkt på dag 8, med en pH på mellom 9-10, for så igjen å falle utover i eksperimentet, og stabilisere seg på rundt 7.5. For *T. suecica* økte pH i kontrollkulturene frem til dag 8 for så å stabilisere seg på mellom 8-8.5. Stigningen i kontrollene de første dagene faller også godt sammen med økningen i celletetthet for disse kulturene (Figur 4-3 og 4-4). For de resterende avfallskildene ble det observert en nokså beskjeden økning av pH i kulturrørene utover i eksperimentet. I noen kulturer ble det tidvis en kraftig stigning i pH grunnet partikler i mediet som førte til tilstopping av CO₂-tilførselen. Dette kan man blant annet se for *P. tricornutum* med fiskeslam 55mL og mask 55 mL etter 6, respektive 8 dager, og *T. suecica* med fiskeslam 55 mL og bløme 82 mL etter henholdsvis 10 og 12 dager (Figur 4-21 og 4-22). pH holdt seg med unntak av de største svingningene i området 6.5-7.5 for begge artene. Selv om begge artene

viste god vekst med både bløme og kontroll, var det i all hovedsak bare ved kultivering med kontrollene man hadde en kraftig økning i pH under eksperimentet.



Figur 4-21: pH i dyrkningsrørene for *P. tricornutum* under kultivering med de ulike avfallskildene. Grafen viser gjennomsnittet \pm SD av duplikatene for hver avfallskilde. Y-aksen viser pH, mens X-aksen viser antall dager.



Figur 4-22: pH i dyrkningsrørene for *T. suecica* under kultivering med de ulike avfallskildene. Grafen viser gjennomsnittet \pm SD av duplikatene for hver avfallskilde. Y-aksen viser pH, mens X-aksen viser antall dager.

5 Diskusjon

Det overordnede målet med denne oppgaven var å undersøke om ulike avfallskilder fra næringsmiddelbedrifter kan være en egnet kilde til den store mengden nitrogen og fosfor som kreves ved storskalaproduksjon av mikroalger. Både algenes vekst og innhold av fettsyrene EPA og DHA er viktige faktorer som har betydning for mikroalgens potensiale i et kommersielt perspektiv. Det ble derfor satt minimumskriterier på både vekstrate ($0.7d^{-1}$) og relativt EPA-innhold på 13% for *P. tricornutum* og 5% for *T. suecica* av TFA. Fettsyreinnholdet i mikroalger er kjent for å endre seg med vekstfase, og ble derfor målt både i eksponentiell og stasjonær fase. Generelt finner en at disse to faktorene påvirkes av flere ulike parametere som temperatur, lys, salinitet, pH og næringstilgang (Papapolymerou et al., 2019, Li et al., 2012, Liang et al., 2014, Xin et al., 2010b, Jiang and Gao, 2004, Martins et al., 2013), og vil derfor bli sett i sammenheng med de oppnådde resultatene.

5.1 Vekst

Vekst ble i den innledende screeningen basert på visuelle observasjoner. *M. gaditana* ble vurdert til å ha lavere vekst på alle avfallskildene enn både *P. tricornutum* og *T. suecica*. Dette var ikke som forventet da *M. gaditana* er en vel utprøvd art innen ulike typer avfallsvannhåndtering, og er kjent for sin gode tilpasningsevne til en rekke ulike kultiveringsforhold (Onay, 2018, Sepúlveda et al., 2015, Dourou et al., 2018, Devasya and Bassi, 2019). Blant annet har slam fra fiskefarmer vist seg å være et velegnet vekstmedium for denne arten (Dourou et al., 2018). *M. gaditana* viste imidlertid relativt god vekst på bløme, i likhet med *T. suecica* og *P. tricornutum*. Dette kan tyde på at denne arten ikke i like stor grad kunne tilpasse seg det lave innholdet av N og P som ble målt for de resterende avfallskildene (Tabell 4-2).

Alle artene viste tilsynelatende liten eller ingen vekst ved kultivering på avfallsvann fra meieri og bryggeri. Dette var ikke helt uventet, da disse avfallskildene etter informasjonen fra de aktuelle bedriftene, var svært utvannet, i tillegg til å inneholde kjemikalier som lut og syrer. De fem andre avfallskildene, fiskeblod, fiskeslam, kloakk, bløme og mask viste betydelig vekst hos både *P. tricornutum* og *T. suecica*, og ble valgt for oppskalering i hovedscreeningen. Algeartene hadde ulike optimale dyrkningskriterier, men for å lette eksperimentets gjennomførbarhet ble algene kultivert under de samme og konstante temperatur- og lysforholdene.

Under hovedscreeningen var bløme den avfallskilden som totalt sett oppnådde de mest lovende resultatene for både *P. tricornutum* og *T. suecica*. Begge artene oppnådde betydelig høyere

celletetthet på bløme enn på de fire andre avfallskildene (Figur 4-3 og 4-4), men ingen kulturer på bløme oppnådde like høy celletetthet som kontrollene. For de resterende fire avfallskildene: fiskeblod, fiskeslam, kloakk og mask vokste algene generelt saktere og kom også fortere i stasjonær fase enn med de mest næringsrike vekstmediene, bløme og kontroll (WUR).

Generelt var høy vekstrate forbundet med høy oppnådd celletetthet og vice versa, men med visse unntak. Minimumskravet for vekstrate på 0.7 d^{-1} oppnådde bare *P. tricornutum* med bløme 41 mL og *T. suecica* med kloakk 110 mL (Figur 4-6 og 4-7). Det var noe overraskende at kloakk som ble målt til å inneholde de laveste N- og P-verdiene oppnådde en såpass høy vekstrate. Denne verdien hadde imidlertid en relativt høy usikkerhet, og den høye vekstraten var også begrenset til et kort tidsrom før veksten flatet av. *T. suecica* kultivert med bløme oppnådde ikke vekstratekriteriet, men oppnådde likevel en høy celletetthet ved slutten av eksperimentet. Det kan se ut til at algene brukte noe lengre tid på å tilpasse seg dette mediet, som ga en lengre lagfase. Dermed ble eksponentiell fase trolig estimert for tidlig for disse kulturrene. Eksponentiell vekst ble beregnet individuelt for hver duplikatkultur, og det var til tider utfordrende å anslå hvilken vekstfase algene befant seg i. Vekstraten for *P. tricornutum* har i tidligere eksperiment blitt målt til mellom $0.94\text{-}1.0 \text{ d}^{-1}$ (Kvamme, 2017, Steinrucken et al., 2017) og *T. suecica* til 1.2 d^{-1} (Carballo-Cárdenas et al., 2003). Det er derfor nærliggende å tro at de testede artene har potensiale til å oppnå høyere vekst under andre kultiveringsforhold. *T. suecica* viste ved kultivering med de mest næringsfattige vekstmediene en fargeendring fra grønn til mer gulaktig kultur utover i eksperimentet. Slik fargeendring er blitt knyttet til næringsmangel (Fernandes et al., 2013, Pancha et al., 2014). Det var ikke mulig å observere en slik fargeforandring for *P. tricornutum*. For å oppnå god algevekst kreves det en tilstrekkelig tilførsel av blant annet næring (Larsdotter, 2006). Alle avfallskildene, med unntak av bløme, hadde et lavt innhold av både nitrogen (N) og fosfor (P) (Tabell 4-2). De samme avfallskildene oppnådde også generelt en lav vekstrate og celletetthet. Bløme var den avfallskilden hvor begge artene oppnådde høyest celletetthet, og var også den avfallskilden med det høyeste innholdet av N og P, som trolig var årsaken til den gode veksten med denne avfallskilden.

Redfield forholdet for N og P på 16:1 (Redfield, 1958), brukes for å sannsynliggjøre om algeveksten er N eller P begrenset. Hva som er optimalt N:P forhold varierer fra art til art (Choi and Lee, 2015), og derfor gir denne ratioen bare en pekepinn på om veksten er N- eller P-begrenset. Tar man utgangspunkt i Redfield ratioen er det nærliggende å tro at N var den begrensede næringskilden for både fiskeslam, mask og bløme (Tabell 4-2). For fiskeblod og kloakk synes heller P å være den begrensende faktoren. Ser man på mengden N og P i hver kilde, var det trolig et generelt lavt innhold av næring som forårsaket den lave veksten. P binder seg også lett til ioner, eksempelvis jern (Fe^+)

(Rastogi et al., 2017), og kan dermed gjøre P mindre tilgjengelig for algene. Fiskeblod var trolig den avfallskilden som var mest utsatt for dette, da den har et naturlig jerninnhold. Kontrollmediet (WUR) var det eneste som var tilsatt EDTA, som hindrer denne typen binding.

Måling av N-innhold i de ulike avfallskildene viste at ammonium var den dominerende nitrogenkilden, og med bare mindre mengder nitrat tilstede (maks 7% av målt N-innhold) (Tabell 4-2). Det er derfor grunn til å tro at mikroalgenes primære nitrogenkilde ved kultivering med avfallsvann var ammonium. Både *P. tricornutum* og *T. suecica* har i tidligere studier vist seg å kunne benytte ammonium som nitrogenkilde (Yongmanitchai and Ward, 1991, Azma et al., 2011). Ammonium kan imidlertid gi en lavere vekstrate sammenlignet med nitrat ved kultivering av *T. suecica* (Azma et al., 2011). Forsøk har også vist at tilstedeværelse av ammonium kan hindre opptak av nitrat hos *P. tricornutum* (Cresswell and Syrett, 1979). Kun innholdet av ammonium, nitrat og fosfat ble målt for de ulike avfallskildene. Det foreligger dermed ingen eksakt komposisjonsprofil, og det kan ikke utelukkes at avfallskildene inneholdt andre nitrogen og fosforkilder som algene kunne nyttiggjøre seg av. Noen av avfallskildene, eksempelvis kloakk inneholdt også med stor sannsynlighet giftige komponenter, og begrenser dermed algenes potensielle bruksområde. Sammensetningen av de ulike avfallskildene vil også kunne variere etter hvilken dag og årstid prøvene blir samlet inn. Dette kan påvirke hvor egnet de ulike avfallskildenes er for dyrking av alger, og må derfor i eventuelt videre arbeid tas med i vurderingen.

Ved autotrof algevekst forbrukes det CO₂ som fører til at pH i kulturene øker. For å motvirke denne effekten ble kulturene boblet med 1% CO₂ gass. Når alger forbruker ammonium frigis det H⁺ ioner som senker pH i kulturen. Denne nedgangen i pH er imidlertid moderat. Nitrat som nitrogenkilde fører derimot til økt pH. Nitrat var eneste nitrogenkilden i kontrollene (WUR)), og kan være en forklaring på den markante økningen i pH utover i eksperimentet for disse kulturene, som steg til en maksverdi på 9.9 ± 0.1 og 8.8 ± 0.7 for *P. tricornutum*, respektive *T. suecica* (Figur 4-21 og 4-22). pH i de ulike avfallskildene holdt seg i området 6.5-7.5 gjennom forsøket, med unntak av tidvise kraftige økninger i pH i de mest partikkelrike avfallskildene, mask og bløme, hvor partiklene hadde en tendens til å tilstoppe CO₂-tilførselen.

Det var noe overraskende ingen generell trend hvor høyest mengde tilsatt avfallsvann (110 mL, 82 mL*) ga signifikant høyere celletetthet (stasjonær fase) og vekstrate for noen av artene (Figur 4-3, 4-4, 4-6 og 4-7). Dette kan tyde på at andre forhold enn økt næringstilgang spilte inn. Både lys, temperatur og salinitet kan påvirke algers vekst (Li et al., 2012, Liang et al., 2014, Jiang and Gao, 2004). Alle avfallskildene hadde en relativt kraftig farge, og flere inneholdt også en stor andel

partikler, hvor spesielt bløme utmerket seg. Dette kan være problematisk under kultivering, da fargen på vannet i kombinasjon med partikler kan ha påvirket lysgjennomstrømning til algene, og dermed redusert fotosyntese og i sin tur algevekst. Dette har blitt rapportert fra tidligere forsøk, med blant annet avfallsvann fra en olivenoljefabrikk, hvor fargen på vannet var en av hovedårsakene til begrenset algevekst (Hodaifa et al., 2012). Dette kan også være grunnen til at *T. suecica* kultivert med bløme 82 mL, som var den mest næringsrike kulturen, ikke oppnådde like høy celletetthet som ved kultivering med bløme 41 mL, da kulturen ble fortere lysbegrenset. De første dagene av eksperimentet ble lysintensiteten holdt mellom 15 og 38 $\mu\text{mol fotoner m}^{-2}\text{s}^{-1}$, før intensiteten gradvis ble hevet til 300 $\mu\text{mol fotoner m}^{-2}\text{s}^{-1}$ og deretter holdt konstant gjennom eksperimentet. Kulturene vokste forskjellig under de ulike kultiveringsforholdene, men opplevde den samme økningen i lysintensitet. For de tetteste kulturene kan dermed lysintensiteten ha vært for lav, mens andre kulturer som ikke hadde rukket å oppnå like høy celletetthet, opplevde for mye lys per celle.

Flere studier har vist at temperatur har en betydelig effekt på algers vekstrate (Ras et al., 2013, Singh and Singh, 2015). Hva som er optimal temperatur er imidlertid artsspesifikt, og blir i stor grad bestemt av artens opphav. Under eksperimentet ble algene kultivert ved 16°C. *T. suecica* kommer opprinnelig fra Italia (Middelhavet) og vil derfor trolig ha en høyere optimal veksttemperatur enn *P. tricornutum* som er isolert fra store Lungegårdsvann i Bergen, hvor temperaturene er målt til å ligge mellom -0.5–20 °C (Steinrucken et al., 2017). Tidligere studier har kunnet vise til optimale veksttemperaturer for *T. suecica* på mellom 25-27 °C (Weiss et al., 1985). Dette er betydelig høyere enn den temperaturen som ble brukt under eksperimentet. Kvamme (2017) fant i sin studie at *P. tricornutum* (B58) hadde en høyere vekst ved 15 enn ved 10 graderer. Dette stemmer også godt med Prestegard et al. (2014) sitt forsøk med den samme *P. tricornutum* stammen som viste økt vekstrate ved temperaturøkning fra 10-25°C. Kultivering ved 30 °C førte imidlertid til kulturkollaps. Ut ifra det ovennevnte ville derfor en høyere kultiveringstemperatur trolig ført til høyere vekst for både *P. tricornutum* og *T. suecica*. *P. tricornutum* var nok likevel bedre tilpasset kultiveringstemperaturen på 16°C enn *T. suecica*, algertypens opphav tatt i betraktning.

Saliniteten i de ulike dyrkningsrørene varierte mellom 17.8-30.6 (Tabell 3-4). Disse variasjonene kom av ulike mengder tilsatt avfallsvann, og om disse opprinnelig inneholdt saltvann eller ferskvann. Kulturene tilsatt fiskeslam og fiskeblod hadde en høyere salinitet, da disse var basert på sjøvann. Siden de forskjellige kulturene hadde ulik saltholdighet var det derfor vanskelig å kunne bedømme salinitetens innvirkning på mikroalgens vekst. *P. tricornutum* stammen B58 er isolert fra brakkvannsmiljø med store svingninger i salinitetsnivå, på mellom 11-32 (Steinrucken et al., 2017). Det er derfor grunn til å tro at denne stammen har en høyere toleranse for lav salinitet enn *T. suecica*

som stammer fra Middelhavet. Undersøkelsene til Abdullahi et al. (2006) tyder på at *P. tricornutum* tilhører gruppen diatommer som kan tilpasse seg et vidt spekter av saliniteter som strekker seg fra 5-65. Prestegard et al, (2014) fant imidlertid at *P. tricornutum* sin vekstrate minket med en salinitet over 20. Ifølge undersøkelsen til Pugkaew et al. (2019) har *T. suecica* optimal biomasseproduktivitet med en salinitet på mellom 20-60. Andre studier viser til optimal vekst med en salinitet mellom 25-35 (Serdar et al., 2007, Fabregas et al., 1984). De ovennevnte funnene tyder derfor på at både *P. tricornutum* og *T. suecica* har et stort toleransespekter for salinitet.

5.2 Fettsyrer

Bløme var den avfallskilden som generelt ga høyest celletetthet og vekstrate, og hvor det også ble målt det høyeste innholdet av EPA og DHA i % av TFA og for både *P. tricornutum* og *T. suecica* (Figur 4-14 og 4-15). Dette var også den eneste avfallskilden som oppnådde minimumskriteriet for relativt EPA innhold for disse artene. De andre avfallskildene ga et betydelig lavere relativt innhold av EPA og DHA, og var i større grad dominert av mettede fettsyrer både i eksponentiell og stasjonær fase.

Det ble registrert et tydelig skifte i den relative fettsyresammensetningen fra eksponentiell til stasjonær fase for kulturene med de mest næringsrike mediene, kontroll og bløme, hvor det var en relativ økning i mettede og monoumettede fettsyrene som palmitinsyre og henholdsvis oljesyre og palmitoleic-syre, og en nedgang i PUFAer som ALA, EPA og DHA. Relativ nedgang i EPA mellom de to vekstfasene var imidlertid bare gjeldende for visse avfallskilder og konsentrasjoner med *T. suecica*. Fettsyreskiftet mellom de to vekstfasene var ikke like fremtredende ved kultivering med de resterende avfallskildene (Figur 4-12 og 4-13). Det må imidlertid bemerkes at flere av kulturene tilsatt avfallsvann kom fort i stasjonær fase, og tidsrommet mellom prøvetakning for eksponentiell og stasjonær fase var derfor kortere, og kan ha redusert «synligheten» av slike trender.

Økning av mettede og monoumettede fettsyrer er forbundet med triacylglyserol (TAG) akkumulering (Shen et al., 2016). Både N og P begrensning har blitt koblet til TAG akkumulering hos mikroalger (Breuer et al., 2012, Alipanah et al., 2018). Når alger blir utsatt for næringsmangel trigger dette ulike stressresponser i cellen. Blant annet hemmes ofte vekst, og man ser en økning i akkumuleringen av nøytrale lipider, hovedsakelig TAG, som fungerer som lagringskomponenter for karbon og energi under næringsfattige forhold (Wang et al., 2019, Martins et al., 2013). Noen mikroalgearter akkumulerer imidlertid karbohydrater under næringsmangel (Park et al., 2018). TAG har vanligvis et høyt innhold av mettede og monoumettede fettsyrer, og inneholder i liten grad LC-PUFAer som EPA (Martins et al., 2013). Wang et al. (2019) fant at EPA hovedsakelig ble funnet i polare lipider (PL). Når

algene ble utsatt for N-begrensning minket den relative mengden PL, som kan føre til en reduksjon av cellens innhold av EPA. Videre har forsøk med både *P. tricornutum* og *T. suecica* vist at fettsyreprofilen i større grad domineres av henholdsvis Palmitoleic-syre (16:1n7) og palmitinsyre (16:0) ved sterk N-begrensning (Wang et al., 2019, Go et al., 2012). Dette mønsteret så man også igjen i mine kulturer, hvor det var en tydelig sammenheng mellom lavt N innhold og en relativ økning i de to ovennevnte fettsyrene. Blant annet hadde kloakk, som hadde det laveste registrerte N-innholdet også det høyeste innholdet av palmitoleic-syre og palmitinsyre (Figur 4-12 og 4-13). Disse funnene er med på å styrke teorien om næringsmangel som hovedårsaken til det lave relative innholdet av EPA og det høye innholdet av mettede fettsyrer for de fleste avfallskildene.

Selv om det generelt ble registrert et signifikant høyere innhold av EPA og DHA i % av TFA for *P. tricornutum* i den eksponentielle fasen (Figur 4-14), er det ikke gitt at algecellene hadde et høyere EPA og DHA innhold i denne fase. Prestegard et al. (2016) sin studie viste at både det totale innholdet av fettsyrer, og EPA var høyere per celle i stasjonær fase for *P. tricornutum*. Det kan derfor ikke utelukkes at selv om det ble registrert et lavere relativt EPA-innhold i stasjonær fase, kan det derfor ikke fastslås at EPA-innholdet per celle var lavere i denne fasen. Grunnet svakheter med målemetoden for tørrvekt var det ikke mulig å anslå algenes innhold av TFA, EPA og DHA av tørrvekt (se 3.4.2 Tørrvekt). Andre studier kan vise til EPA-verdier på mellom 2.6-3.4% av tørrvekt under gode vekstforhold for *P. tricornutum* (Steinrucken et al., 2017, Kvamme, 2017, Jiang and Gao, 2004). Det er imidlertid svært begrenset med informasjon om *T. suecicas* EPA innhold i forhold til tørrvekt, men *T. suecica* er en av de mest brukte mikroalgeartene innen akvakultur, og er sett på som en svært god kilde til PUFAer, spesielt EPA (Guzmán et al., 2010).

I motsetning til *P. tricornutum* hadde ikke *T. suecica* en generell trend for høyere eller lavere relativt innhold av EPA mellom de to vekstfasene (Figur 4-15). Dette kan tyde på at *T. suecica* sitt EPA-innhold ikke i like stor grad blir påvirket av næringsmangel og/eller vekstfase. Denne forklaringen styrkes av funnene til Dörner et al. (2014) som fant at *T. suecica* sitt innhold av n-3 PUFA og EPA ikke fulgte et spesifikt mønster relatert til en økning eller senkning av N i mediet. Ved sammenligning av algeartene med de ulike vekstmediene, ble det funnet en generell trend med mer enn tre ganger så mye EPA i % av TFA for *P. tricornutum* enn *T. suecica*. I de kulturene som oppnådde høyest celletetthet (bløme og kontroll) var denne forskjellen nærmere fem ganger så høy. *P. tricornutum* hadde et signifikant ($P < 0.05$) høyere innhold av EPA i % av TFA ved kultivering med avfallskilden bløme 82 mL enn de resterende kulturene, med et EPA-innhold på $24.0 \pm 0.1\%$ av TFA i stasjonær fase. Dette var nesten dobbelt så høye verdier som ved kultivering med kontrollene under samme vekstfase. Dette avvek også fra den generelle trenden med en relativ nedgang i EPA og økning av

mettede fettsyrer i stasjonær fase for *P. tricornutum*. Dette kan indikere at algekulturen enda ikke hadde kommet i stasjonær fase, eller fremdeles var på et så tidlig stadium at næringsbegrensning ikke hadde fått tid til å påvirke fettsyreinholdet i så stor grad.

Fettsyrekonsentrasjon gitt som mg/L i stasjonær fase, var for *P. tricornutum* og *T. suecica* i samme størrelsesorden og varierte også mye på samme måte mellom de forskjellige avfallskildene (Figur 4-16 og 4-17). For konsentrasjonen av EPA var det imidlertid et større skille mellom algene, der verdiene for *P. tricornutum* generelt var mer enn to ganger høyere enn for *T. suecica*. Spesielt bløme som vekstmedium skilte seg ut. Begge algene oppnådde sin høyeste EPA-konsentrasjon med bløme 82 mL. For *P. tricornutum* var dette mer enn fem ganger så mye som for *T. suecica* på det samme mediet, og nærmere dobbelt så høyt som for kontrollene. Den høye EPA-konsentrasjonen med bløme som vekstmedium kan skyldes innholdet av kitin (Larveriet, 2020), som har vist seg å kunne øke mikroalgers lipidinnhold. Enkelte mikroalger kan også bruke kitin som nitrogenkilde (Blank and Hinman, 2016). Som vist i figur 4-3 og 4-10 var henholdsvis celletettheten og estimert tørrvekt for *P. tricornutum* høyere i stasjonær fase med kontroll som vekstmedium enn for bløme. Dette indikerer dermed at mengden EPA per celle var høyere med bløme som vekstmedium for denne algen. Både *P. tricornutum* og *T. suecica* oppnådde betydelig lavere EPA-konsentrasjon med de andre avfallskildene. Dette kan blant annet skyldes lave næringskonsentrasjoner. Det var blant annet en tydelig sammenheng mellom økt EPA-konsentrasjon med den høyeste mengden tilsatt avfallsvann. Det var imidlertid noen unntak, for *P. tricornutum* med mask og *T. suecica* med fiskeslam sank EPA-konsentrasjonen. At algene responderte så ulikt på disse vekstmediene, tyder på at både valg av avfallskilde, og algenes evne til å produsere EPA påvirker hvor mye EPA som kan produseres på de gitte avfallskildene. Dette underbygges også av Steinrücken et al. (2018b) sine funn som viste at EPA-produktivitet var sterkt påvirket av både valg av algestamme og kultiveringsforhold. Bare *P. tricornutum* produserte DHA, og disse verdiene var også svært lave sammenlignet med EPA. De høyeste verdiene ble også for DHA oppnådd med bløme som vekstmedium.

Lave temperaturer under kultivering har blitt rapportert som en av hovedfaktorene for å øke mikroalgers lipidinnhold (Boelen et al., 2013), og har også vist seg å kunne øke innholdet av PUFA, og da spesielt EPA hos *P. tricornutum* (Jiang and Gao, 2004). Under Kvammes (2017) forsøk ble *P. tricornutum* (B58) testet ved både 10 og 15 °C. Det var imidlertid ingen signifikant forskjell i EPA innhold. Lavere temperaturer må derfor trolig til for å øke EPA-innholdet for denne algen. Lave temperaturer kan imidlertid påvirke algers vekstrate negativt (Ras et al., 2013, Singh and Singh, 2015). Det blir derfor en avveining mellom å kultivere under en temperatur som både kan gi tilfredsstillende vekst og EPA- og DHA-innhold. Kjøling er også en av hovedkostnadene under

storskala algeproduksjon (Steinrucken et al., 2017). Det er derfor hensiktsmessig med algearter som kan opprettholde god vekst og PUFA-innhold over et bredt temperaturspekter. Selv om artene kommer fra svært ulike geografiske områder, og derfor trolig vil ha en ulik optimal kultiveringstemperatur for å oppnå maksimal EPA- og DHA-innhold, oppnådde både *P. tricornutum* og *T. suecica* likevel de gitte EPA-kriteriene for relativt innhold av TFA (Figur 4-14 og 4-15). Forsøk har vist at lav lysintensitet med noen få unntak favoriserer dannelsen av PUFAer (Hu et al., 2008). Under forsøket ble det benyttet en relativt høy lysintensitet på 300 $\mu\text{mol fotoner m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Bløme var et forholdsvis mørkt medium, og hadde derfor trolig mindre tilgang til lys per celle enn kontrollene. Dette kan ha vært en medvirkende årsak til det signifikant høyere relative EPA innholdet i stasjonær fase for kulturene kultivert med bløme, sammenlignet med kontrollene for begge artene.

Forsøket viser at mange parametere må belyses mere for bedre å kunne kartlegge de forskjellige alge og avfallskildekombinasjonenes potensiale for EPA og DHA produksjon.

5.3 Videre arbeid og forslag til metodiske forbedringer

Resultatene fra forsøket peker i retning av næringsmangel som den primære begrensende faktoren for algevekst med de anvendte avfallskonsentrasjonene. Det vil derfor være av interesse å undersøke høyere konsentrasjoner avfallsvann. En kombinasjon av ulike avfallskilder for å få et mer balansert forhold mellom N og P kan også prøves ut. Ved å kombinere ulike avfallskilder med eksempelvis overflødig CO₂ gass fra ulike industrier kan man potensielt senke kostnadene med mikrolageproduksjon ytterligere, og samtidig redusere utslippet av CO₂ til atmosfæren. Det pågår blant annet et pilotstudie på Mongstad oljeraffineri, som har Norges største punktutslipp av CO₂. Her dyrkes mikroalger på CO₂ utslippet fra raffineriet (Haarstad and Rusten, 2016). Termisk hydrolyse kan også være aktuelt. Dette er en kjemisk prosess som bryter ned organisk materiale ved bruk av høy temperatur og trykk (Hofstad, 2018), og gjør dermed næringen mer tilgjengelig for algene. Videre bør muligheten for å ta ut avfallsvann fra andre ledd i bedriftens produksjonsprosess undersøkes nærmere. Tine har eksempelvis et relativt stort matsvinn, hvor restproduktene samles opp og sendes til avfallsstasjoner. En slik «ren» prøve vil ha et høyere næringsinnhold, og vil heller ikke inneholde syrer og baser, slik den innhentede prøven gjorde. Flere av bedriftene hvor de testede avfallskildene ble innhentet, ytret et ønske om en mer bærekraftig og økonomisk produksjon. En såkalt sirkulær økonomi, som blant annet oppnås ved å minimere avfall, utslipp og energiforbruk. Ved å koble algekultivering opp mot bedriftenes avfallsproduksjon kan man trolig komme nærmere dette målet.

Bare et fåtall mikroalgearter blir kultivert i stor skala for PUFA-produksjon. Med en stadig økende etterspørsel, er det derfor av økende interesse å finne rasktvoksende arter med et høyt PUFA-

innhold (Steinrücken et al., 2017, Priyadarshani and Rath, 2012). Av særlig interesse er mikroalger fra nordlige breddegrader, da det i tidligere studier er blitt vist at ulike mikroalger øker mengden umettede fettsyrer ved lave temperaturer (Jiang and Gao, 2004, Boelen et al., 2013). Steinrücken et al. (2017) sine undersøkelser av ulike mikroalger fra nordlige breddegrader viste lovende resultat, hvor flere av de testede algene viste svært god vekstrate ($> 0.7 \text{ d}^{-1}$) ved lave temperaturer (15°C eller lavere) og et høyt nivå av EPA ($> 3\%$ tørrvekt).

Bløme var den avfallskilden som ved kultivering med både *P. tricornutum* og *T. suecica* viste best evne til å opprettholde både god vekst og høyt relativt EPA- og DHA-innhold. Interessen for insekter som en alternativ kilde til næring og proteiner har økt de siste årene, da det er et økende behov for proteiner fra bærekraftige kilder. Insekter kan dyrkes med mindre bruk av naturressurser enn dagens kjøttproduksjon, som i dag er en av hovedkildene til proteiner, og kan også lett produseres i store kvanta. Det forventes derfor en økning i produksjonen av insekter i løpet av de neste årene. Insekter som en kilde til proteiner for både mat og fortilskudd er også under evaluering av det EU-finansierte prosjektet PROTEINSECT (PROteINSECT, 2016). Ekskretet fra insektene produserer har et høyt næringsinnhold som gjør dette produktet svært interessant for kommersiell produksjon av mikroalger. Bløme som er en blanding av ekskretter og skall fra larver inneholder kitin (Larveriet, 2020), som har vist seg å kunne øke mikroalgens lipidinnhold. Visse mikroalger kan også bruke kitin som nitrogenkilde (Blank and Hinman, 2016).

En metodisk forbedring av eksperimentoppsettet vil være å kartlegge den komplette næringsprofilen til de ulike avfallskildene før oppstart, for bedre å kunne vurdere hvilke avfallskonstruksjoner som skal til for å gi maksimal algevekst. Mengden N og P i kulturene både før og etter kultivering bør også testes, for å måle algenes evne til å rense avfallsvannet for disse næringsstoffene. Man har for eksempel kunnet redusere mengden totalt fosfor med 80.9-98%, og totalt nitrogen med 89.1-98 ved kultivering av alger i avfallsvann (Caporgno et al., 2015, Li et al., 2011, Xin et al., 2010a).

Avfallskildene ble ikke filtrert før bruk, da det i et kommersielt perspektiv vil være et fordyrende ledd, og for å kunne teste hvor godt algene vokser under disse forholdene. Filtrering av avfallskildene vil imidlertid kunne minimere problemet med tilstoppelse av CO_2 -tilførselen, og samtidig minke partiklenes innvirkning på lysgjennomstrømning til algene. Å filtrere avfallskildene vil også redusere faren for bakteriekontaminering. Dess mer partikler det er i mediet desto mere substrat vil være tilgjengelig for bakterier. Det vil derfor være hensiktsmessig å sette opp parallelle tester, med og uten filtrerte avfallskilder, for å undersøke hvor stor innvirkning partiklene har på algenes vekst.

6 Konklusjon

Denne undersøkelsen ønsket å utforske om ulike typer avfallsvann kan egne seg som vekstmedium for mikroalger, og da med spesielt hensyn på algenes produksjon av fettsyrene EPA og DHA. Resultatene indikerer at dette er mulig, men i svært varierende grad. Av de testede avfallskilden er det bløme som utmerket seg som det mest lovende vekstmediet. Med denne avfallskilden oppnådde både *P. tricornutum* og *T. suecica* sin høyeste verdi for relativt EPA-innhold med henholdsvis $24.0 \pm 0.1\%$, respektive $5.6 \pm 0.2\%$ av TFA. *P. tricornutum* oppnådde også en høy EPA-konsentrasjon (102.2 ± 2.5 mg/L i stasjonær fase), fem ganger så høyt som for *T. suecica* med den samme avfallskilden. Bløme var også den avfallskilden med det høyeste målte innholdet av N og P i tillegg til å inneholde kitin, som har vist seg å kunne øke algers lipidinnhold. Næringsmangel var med stor sannsynlighet den begrensede hovedfaktoren for de resterende avfallskildene. Det vil derfor være hensiktsmessig å teste disse med høyere konsentrasjoner avfallsvann for å bedømme avfallskildenes potensiale. Muligheten for å kombinere ulike avfallskilder bør også undersøkes nærmere. Av de testede artene viste *P. tricornutum* på avfallskilden bløme de klart mest lovende resultatene. Denne alge og avfallskildekombinasjonen kan derfor være en aktuell kandidat for produksjon av fettsyre med bruk av avfallsvann. Videre undersøkelser er imidlertid nødvendig, for å kartlegge både algenes og de testede avfallskildenes reelle potensiale.

7 Kilder

- ABDEL-RAOUF, N., AL-HOMAIDAN, A. A. & IBRAHEEM, I. B. M. 2012. Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19, 257-275.
- ABDULLAHI, A. S., UNDERWOOD, G. J. C. & GRETZ, M. R. 2006. Extracellular matrix assembly in diatoms (Bacillariophyceae). V. Environmental effects on polysaccharide synthesis in the model diatom, *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Phycology*, 42, 363-378.
- ABOMOHRRA, A. E.-F., EL-SHEEKH, M. & HANELT, D. 2017. Screening of marine microalgae isolated from the hypersaline Bardawil lagoon for biodiesel feedstock. *Renewable Energy*, 101, 1266-1272.
- ADARME-VEGA, T. C., LIM, D. K., TIMMINS, M., VERNEN, F., LI, Y. & SCHENK, P. M. 2012. Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. *Microbial cell factories*, 11, 96.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, JULIAN., RAFF, MARTIN., ROBERTS, K. & WALTER, P. 2002. Membrane structure. In: ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, JULIAN., RAFF, MARTIN., ROBERTS, K. & WALTER, P. (eds.) *Molecular biology of the cell*. 4th ed. ed. New York: Garland Science.
- ALGASPRING. 2018. *Marine phytoplankton Nannochloropsis gaditana micro-algae* [Online]. Available: <https://www.algaspring.nl/nannochloropsis-gaditana-micro-algae/> [Accessed 5.5 2020].
- ALIPANAH, L., WINGE, P., ROHLOFF, J., NAJAFI, J., BREMBU, T. & BONES, A. M. 2018. Molecular adaptations to phosphorus deprivation and comparison with nitrogen deprivation responses in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *PloS one*, 13.
- ANDERSON, D. M., GLIBERT, P. M. & BURKHOLDER, J. M. 2002. Harmful algal blooms and eutrophication: Nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries*, 25, 704-726.
- AZMA, M., MOHAMED, M. S., MOHAMAD, R., RAHIM, R. A. & ARIFF, A. B. 2011. Improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae, *Tetraselmis suecica*, using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 53, 187-195.
- BARROS, A., PEREIRA, H., CAMPOS, J., MARQUES, A., VARELA, J. & SILVA, J. 2019. Heterotrophy as a tool to overcome the long and costly autotrophic scale-up process for large scale production of microalgae. *Scientific reports*, 9, 13935.
- BARSANTI, L. & GUALTIERI, P. 2006. *Algae : anatomy, biochemistry, and biotechnology*, Boca Raton, Fla, CRC/Taylor & Francis.
- BARSANTI, L. & GUALTIERI, P. 2014. General Overview. In: BARSANTI, L. & GUALTIERI, P. (eds.) *Algae : Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology, Second Edition*. Baton Rouge: Baton Rouge: CRC Press LLC.
- BÉCHET, Q., SHILTON, A., FRINGER, O. B., MUÑOZ, R. & GUIEYSSE, B. 2010. Mechanistic Modeling of Broth Temperature in Outdoor Photobioreactors. *Environmental Science & Technology*, 44, 2197-2203.

- BELL, J. G., MCEVOY, J., TOCHER, D. R., MCGHEE, F., CAMPBELL, P. J. & SARGENT, J. R. 2001. Replacement of fish oil with rapeseed oil in diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid compositions and hepatocyte fatty acid metabolism. *The Journal of nutrition*, 131, 1535-1543.
- BERGEN KOMMUNE. 2013. *Om oss* [Online]. Bergen Kommune. Available: <https://www.bergen.kommune.no/omkommunen/avdelinger/vannog-avloppetaten/9080/article-9285> [Accessed 03.10 2018].
- BERGEN KOMMUNE. 2016. *Knappen avløpsrensaneanlegg* [Online]. Bergen Kommune. Available: <https://www.bergen.kommune.no/omkommunen/avdelinger/vannog-avloppetaten/9080/article-9285> [Accessed 03.10 2018].
- BLANK, C. E. & HINMAN, N. W. 2016. Cyanobacterial and algal growth on chitin as a source of nitrogen; ecological, evolutionary, and biotechnological implications. *Algal Research*, 15, 152-163.
- BOELEN, P., VAN DIJK, R., SINNINGHE DAMSTÉ, J. S., RIJSTRA, W. I. C. & BUMA, A. G. 2013. On the potential application of polar and temperate marine microalgae for EPA and DHA production. *AMB Express*, 3, 26.
- BOOPATHY, R. 2000. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, 74, 63-67.
- BOROWITZKA, M. A. 1998. Limits to growth. *Wastewater treatment with algae*. Wong, Yuk-shan. Tam, Nora, F.Y. ed.: Springer.
- BOROWITZKA, M. A. 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of biotechnology*, 70, 313-321.
- BOYD, C., E. 2014. Silicon, Diatoms In Aquaculture. *global aquaculture advocate*
- BRAND, L. E. 1984. The salinity tolerance of forty-six marine phytoplankton isolates. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 18, 543-556.
- BRAR, A., KUMAR, M., VIVEKANAND, V. & PAREEK, N. 2017. Photoautotrophic microorganisms and bioremediation of industrial effluents: current status and future prospects. *3 Biotech*, 7, 1-8.
- BREUER, G., LAMERS, P. P., MARTENS, D. E., DRAAISMA, R. B. & WIJFFELS, R. H. 2012. The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. *Bioresource Technology*, 124, 217-226.
- CAMACHO-RODRÍGUEZ, J., CERÓN-GARCÍA, M. C., GONZÁLEZ-LÓPEZ, C. V., FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M., CONTRERAS-GÓMEZ, A. & MOLINA-GRIMA, E. 2013. A low-cost culture medium for the production of *Nannochloropsis gaditana* biomass optimized for aquaculture. *Bioresource Technology*, 144, 57-66.
- CAPITALENERGY. 2015. *ALGAE SPECIES USED FOR PHYCOREMEDIATION* [Online]. Available: <http://capitalenergy.biz/?p=8765> [Accessed 5.5 2018].

- CAPORGNO, M. P., TALEB, A., OLKIEWICZ, M., FONT, J., PRUVOST, J., LEGRAND, J. & BENGOA, C. 2015. Microalgae cultivation in urban wastewater: Nutrient removal and biomass production for biodiesel and methane. *Algal Research*, 10, 232-239.
- CARBALLO-CÁRDENAS, E. C., TUAN, P. M., JANSSEN, M. & WIJFFELS, R. H. 2003. Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. *Biomolecular Engineering*, 20, 139-147.
- CHAUTON, M. S., REITAN, K. I., NORSKER, N. H., TVETERÅS, R. & KLEIVDAL, H. T. 2015. A techno-economic analysis of industrial production of marine microalgae as a source of EPA and DHA-rich raw material for aquafeed: Research challenges and possibilities. *Aquaculture*, 436, 95-103.
- CHOI, H. J. & LEE, S. M. 2015. Effect of the N/P ratio on biomass productivity and nutrient removal from municipal wastewater. *Bioprocess and biosystems engineering*, 38, 761-766.
- CHRISTAKI, E., BONOS, E., GIANNENAS, I. & FLOROU-PANERI, P. 2013. Functional properties of carotenoids originating from algae. Chichester, UK.
- CHRISTENSON, L. & SIMS, R. 2011. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology Advances*, 29, 686-702.
- CRESSWELL, R. C. & SYRETT, P. J. 1979. Ammonium inhibition of nitrate uptake by the diatom, *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Science Letters*, 14, 321-325.
- CRESWELL, L. 2010. *Phytoplankton culture for aquaculture feed*, Southern Regional Aquaculture Center.
- DEVASYA, R. & BASSI, A. 2019. Investigation of phyco-remediation of road salt run-off with marine microalgae *Nannochloropsis gaditana*. *Environmental technology*, 40, 553-563.
- DÖRNER, J., CARBONELL, P., PINO, S. & FARÍAS, A. 2014. Variation of fatty acids in *Isochrysis galbana* (T-Iso) and *Tetraselmis suecica*, cultured under different nitrate availabilities. *Fisheries and Aquaculture Journal*, 5, 1.
- DOUROU, M., TSOLCHA, O. N., TEKERLEKOPOULOU, A. G., BOKAS, D. & AGGELIS, G. 2018. Fish farm effluents are suitable growth media for *Nannochloropsis gaditana*, a polyunsaturated fatty acid producing microalga. *Engineering in Life Sciences*, 18, 851-860.
- EGELAND, E. S. 2018. *Alger* [Online]. Store norske leksikon. Available: <https://snl.no/alger> [Accessed 07.03 2018].
- EMKEN, E. A., ADLOF, R. O. & GULLEY, R. M. 1994. Dietary linoleic acid influences desaturation and acylation of deuterium-labeled linoleic and linolenic acids in young adult males. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1213, 277-288.
- FABREGAS, J., ABALDE, J., HERRERO, C., CABEZAS, B. & VEIGA, M. 1984. Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture*, 42, 207-215.

- FAWLEY, M. W., JAMESON, I. & FAWLEY, K. P. 2015. The phylogeny of the genus *Nannochloropsis* (Monodopsidaceae, Eustigmatophyceae), with descriptions of *N. australis* sp. nov. and *Microchloropsis* gen. nov. *Phycologia*, 54, 545-552.
- FERNANDES, B., TEIXEIRA, J., DRAGONE, G., VICENTE, A. A., KAWANO, S., BIŠOVÁ, K., PŘIBYL, P., ZACHLEDER, V. & VÍTOVÁ, M. 2013. Relationship between starch and lipid accumulation induced by nutrient depletion and replenishment in the microalga *Parachlorella kessleri*. *Bioresource technology*, 144, 268-274.
- FINKEL, Z. V. 2016. Silicification in the Microalgae. In: BOROWITZKA, M. A., BEARDALL, J. & RAVEN, J. A. (eds.) *The physiology of microalgae*. 1st ed. 2016. ed. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg.
- FOGG, G. E. 1975. *Algal cultures and phytoplankton ecology*, Madison, Wis, The University of Wisconsin Press.
- FORJÁN, E., NAVARRO, F., CUARESMA, M., VAQUERO, I., RUÍZ-DOMÍNGUEZ, M. C., GOJKOVIC, Ž., VÁZQUEZ, M., MÁRQUEZ, M., MOGEDAS, B. & BERMEJO, E. 2015. Microalgae: fast-growth sustainable green factories. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45, 1705-1755.
- FRANCIS, G., MAKKAR, H. P. S. & BECKER, K. 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*, 199, 197-227.
- FRØYLAND, L., ARUKWE, A., BENTSEN, H., BERNHOFT, A., FRØLICH, W., GRAFF, I. E., HALVORSEN, R., HEMRE, G. I., HAUGEN, M. & IVERSEN, P. O. 2011. Evaluation of negative and positive health effects of n-3 fatty acids as constituents of food supplements and fortified Foods. Opinion of the Steering Committee of the Norwegian Scientific Committee for Food Safety. *VKM Report*.
- FURUHJELM, C., WARSTEDT, K., LARSSON, J., FREDRIKSSON, M., BÖTTCHER, M. F., FÄLTH-MAGNUSSON, K. & DUCHÉN, K. 2009. Fish oil supplementation in pregnancy and lactation may decrease the risk of infant allergy. *Acta paediatrica*, 98, 1461-1467.
- GATTUSO, J.-P. & HANSSON, L. 2011. Ocean acidification: background and history. *Ocean acidification*, 1-20.
- GLASS, A. D. 1983. Regulation of ion transport. *Annual Review of Plant Physiology*, 34, 311-326.
- GO, S., LEE, S.-J., JEONG, G.-T. & KIM, S.-K. 2012. Factors affecting the growth and the oil accumulation of marine microalgae, *Tetraselmis suecica*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35, 145-150.
- GONG, Q., FENG, Y., KANG, L., LUO, M. & YANG, J. 2014. Effects of Light and pH on Cell Density of *Chlorella Vulgaris*. *Energy Procedia*, 61, 2012-2015.
- GRADY, C. P. L., DAIGGER, G. T. & LIM, H. C. 1999. Classification of Biochemical Operations
Biological wastewater treatment
Place of publication not identified: Marcel Dekker.

- GRIFFITHS, M. 2013. Microalgal Cultivation Reactor Systems. In: BUX, F. (ed.) *Biotechnological applications of microalgae: biodiesel and value-added products*
- CRC Press.
- GROBBELAAR, J., U. 2013. Inorganic Algal Nutrition. In: AMOS., R. & QIANG., H. (eds.) *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*. Second edition. ed.: United Kingdom: Wiley-Blackwell
- GROBBELAAR, J. U. 2008. Algal Nutrient - Mineral Nutrition. In: RICHMOND, A. (ed.) *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. John Wiley & Sons.
- GROSS, M. 2010. Fears over phosphorus supplies. *Current Biology*, 20, R386-R387.
- GUEDES, A., AMARO, H. M. & MALCATA, F. X. 2011. Microalgae as sources of high added-value compounds—a brief review of recent work. *Biotechnology progress*, 27, 597-613.
- GUIRY, M. D. & GUIRY, G. M. 2020. *Tetraselmis suecica (Kylin) Butcher 1959* [Online]. AlgaeBase. [Accessed 5.5 2020].
- GUSCHINA, I. A. & HARWOOD, J. L. 2006. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research*, 45, 160.
- GUSCHINA, I. A. & HARWOOD, J. L. 2013. Algal Lipids and Their Metabolism. In: BOROWITZKA, M. A. & MOHEIMANI, N. R. (eds.) *Algae for biofuels and energy*. New York: Springer.
- GUZMÁN, H., JARA VALIDO, A., DUARTE, L. & PRESMANES, K. 2010. Estimate by means of flow cytometry of variation in composition of fatty acids from *Tetraselmis suecica* in response to culture conditions. *Journal of the European Aquaculture Society*, 18, 189-199.
- HAARSTAD, H. & RUSTEN, G. 2016. The challenges of greening energy: policy/industry dissonance at the Mongstad refinery, Norway. *Environment and Planning C: Government and Policy*, 34, 340-355.
- HANSA BORG BRYGGERI. 2009. *Historie* [Online]. Hansa Borg Bryggeri. Available: <http://hansaborg.no/omoss/historie/> [Accessed 09.03 2018].
- HANSA BORG BRYGGERI. 2010. *Bryggerier* [Online]. Hansa Borg Bryggeri. Available: <http://www.hansaborg.no/bryggerier/> [Accessed 09.03 2018].
- HEMAISWARYA, S., RAJA, R., RAVI KUMAR, R., GANESAN, V. & ANBAZHAGAN, C. 2011. Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 1737-1746.
- HERFINDAL, L., DØSKELAND, S., OVE. , NYGAARD, G., KNUTSEN, G., SKJÆRVEN, K., HELVIK., COYNE, R., THERESA., OFTEDAL, L. & PRESTEGARD, S., KRISTIN. 2009. Marine Benthic Diatoms Contain Compounds Able to Induce Leukemia Cell Death and Modulate Blood Platelet Activity. *Marine Drugs*, 7, 605-623.
- HODAIFA, G., MARTÍNEZ, M. E., ÓRPEZ, R. & SÁNCHEZ, S. 2012. Inhibitory effects of industrial olive-oil mill wastewater on biomass production of *Scenedesmus obliquus*. *Ecological Engineering*, 42, 30-34.

- HOFSTAD, K. 2018. *termisk hydrolyse* [Online]. Available: https://snl.no/termisk_hydrolyse [Accessed 04.04.2020].
- 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.(Report). *Plant Journal*, 54, 621.
- INVERTAPRO. u. å. *What we do* [Online]. Invertapro. Available: <http://mdanderson.libanswers.com/faq/26219> [Accessed 04.16 2018].
- JAKOBSEN, A., AASEN, I., JOSEFSEN, K. & STRØM, A. 2008. Accumulation of docosahexaenoic acid-rich lipid in thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. strain T66: effects of N and P starvation and O₂ limitation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80, 297-306.
- JERNEY, J. & SPILLING, K. 2018. Large scale cultivation of microalgae: open and closed systems. In: SPILLING, K. (ed.) *Biofuels from Algae*. Humana, New York, NY.
- 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.
- JINKERSON, R. E., RADA KOVITS, R. & POSEWITZ, M. C. 2013. Genomic insights from the oleaginous model alga *Nannochloropsis gaditana*. *Bioengineered*, 4, 37-43.
- JOHNSON, M., D. 2012. Acidophilic algae isolated from mine-impacted environments and their roles in sustaining heterotrophic acidophiles. *Frontiers in Microbiology*, 3.
- JORQUERA, O., KIPERSTOK, A., SALES, E. A., EMBIRUCU, M. & GHIRARDI, M. L. 2010. Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresource technology*, 101, 1406-1413.
- KÄLLQVIST, T. 1999. Algekulturteknologi – naturgitte forutsetninger og praktiske løsninger. *VANN*, 34, 20.
- KIRCHMAN, D., L. 2012. Microbial primary production and phototrophy. In: KIRCHMAN, D., L. (ed.) *Processes in Microbial Ecology*. Oxford: Oxford University Press.
- KUMAR, S., BAWEJA, P. & SAHOO, D. 2015. Diatoms: Yellow or Golden Brown Algae. In: SECKBACH, J. & SAHOO, D. (eds.) *The Algae World*. Dordrecht: Springer Netherlands, Dordrecht.
- KVAMME, H. M. 2017. *Screening av flerumettede fettsyrer i nordlige og spanske marine mikroalger, med hovedvekt på EPA og DHA innhold ved 10 grader C og 15 grader C*. Masteroppgave Masteroppgave, Universitetet i Bergen.
- LANDE, B. 2018. *Fettsyrer* [Online]. Store medisinske leksikon. Available: <https://sml.snl.no/fettsyrer> [Accessed 2.3 2018].
- LARSDOTTER, K. 2006. Wastewater treatment with microalgae-a literature review. *Vatten*, 62, 31.
- LARVERIET. 2020. *Bløme* [Online]. Available: <https://www.larveriet.no/blome> [Accessed 04.04 2020].

- LERØY. 2017a. *Om oss* [Online]. Lerøy. Available: <https://www.leroyseafood.com/no/om-leroy/om-oss/> [Accessed 02.03 2018].
- LERØY. 2017b. *Preline* [Online]. Lerøy. Available: <https://www.leroyseafood.com/no/barekraft/innovasjon/preline/> [Accessed 02.03 2018].
- LI, W. K. 1980. Temperature adaptation in phytoplankton: cellular and photosynthetic characteristics. *Primary productivity in the sea*. Springer.
- LI, Y., CHEN, Y.-F., CHEN, P., MIN, M., ZHOU, W., MARTINEZ, B., ZHU, J. & RUAN, R. 2011. Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. *Bioresource Technology*, 102, 5138-5144.
- LI, Y., ZHOU, W., HU, B., MIN, M., CHEN, P. & RUAN, R. R. 2012. Effect of light intensity on algal biomass accumulation and biodiesel production for mixotrophic strains *Chlorella kessleri* and *Chlorella protothecoide* cultivated in highly concentrated municipal wastewater. *Biotechnology and bioengineering*, 109, 2222-2229.
- LIANG, Y., SUN, M., TIAN, C., CAO, C. & LI, Z. 2014. Effects of salinity stress on the growth and chlorophyll fluorescence of *Phaeodactylum tricornutum* and *Chaetoceros gracilis* (Bacillariophyceae). *Botanica Marina*, 57, 469.
- LUBIÁN L, M., FAWLEY M, W., I., J. & FAWLEY K, P. u.å. *CCMP526* [Online]. Available: <https://ncma.bigelow.org/ccmp526#.XkUXJ2hKhPZ> [Accessed 1/2/2020].
- LUBIÁN, L., MONTERO, O., MORENO-GARRIDO, I., HUERTAS, I., SOBRINO, C., GONZÁLEZ-DEL VALLE, M. & PARÉS, G. 2000. Nannochloropsis (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments. *Journal of Applied Phycology*, 12, 249-255.
- MA, X.-N., CHEN, T.-P., YANG, B., LIU, J. & CHEN, F. 2016. Lipid Production from Nannochloropsis. *Marine Drugs*, 14, 61.
- MA, Y., WANG, Z., YU, C., YIN, Y. & ZHOU, G. 2014. Evaluation of the potential of 9 Nannochloropsis strains for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 167, 503-509.
- MANSOUR, M. P., FRAMPTON, D. M., NICHOLS, P. D., VOLKMAN, J. K. & BLACKBURN, S. I. 2005. Lipid and fatty acid yield of nine stationary-phase microalgae: applications and unusual C24–C28 polyunsaturated fatty acids. *Journal of Applied Phycology*, 17, 287-300.
- MARTINO, A. D., MEICHENIN, A., SHI, J., PAN, K. & BOWLER, C. 2007. Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) accessions 1. *Journal of Phycology*, 43, 992-1009.
- MARTINS, D. A., CUSTÓDIO, L., BARREIRA, L., PEREIRA, H., BEN-HAMADOU, R., VARELA, J. & ABU-SALAH, K. M. 2013. Alternative sources of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in marine microalgae. *Marine drugs*, 11, 2259-2281.
- MOBIN, S. & ALAM, F. Biofuel production from algae utilizing wastewater. 19th Australasian Fluid Mech Conf, 2014. 8-11.

- MOHEIMANI, N. R. 2005. *The culture of coccolithophorid algae for carbon dioxide bioremediation*. Murdoch University.
- MOLINA GRIMA, E., BELARBI, E. H., ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G., ROBLES MEDINA, A. & CHISTI, Y. 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances*, 20, 491-515.
- NASOPOULOU, C. & ZABETAKIS, I. 2012. Benefits of fish oil replacement by plant originated oils in compounded fish feeds. A review. *LWT - Food Science and Technology*, 47, 217-224.
- NISHIDA, I. & MURATA, N. 1996. CHILLING SENSITIVITY IN PLANTS AND CYANOBACTERIA: The Crucial Contribution of Membrane Lipids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47, 541-568.
- NOT, F., LATASA, M., MARIE, D., CARIOU, T., VAULOT, D. & SIMON, N. 2004. A single species, *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae), dominates the eukaryotic picoplankton in the Western English Channel. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 4064-4072.
- OHSE, S., BIANCHINI DERNER, R., ÁVILA OZÓRIO, R., GORDO CORRÊA, R., BADIALE FURLONG, E. & ROBERTO CUNHA, P. C. 2015. Lipid content and fatty acid profiles in ten species of microalgae. *Idesia (Arica)*, 33, 93-101.
- OKAUCHI, M. & FUKUSHO, K. 1984. Environmental conditions and medium required for mass culture of a minute alga, *Tetraselmis tetraele* (Prasinophyceae)[for the rotifer culture]. *Bulletin of National Research Institute of Aquaculture (Japan)*.
- OLERUD, K. 2015. *forurensningsloven* [Online]. Available: <https://snl.no/forurensningsloven> [Accessed 03.04 2018].
- OLGUÍN, E. J. & SÁNCHEZ-GALVÁN, G. 2012. Heavy metal removal in phytofiltration and phycoremediation: the need to differentiate between bioadsorption and bioaccumulation. *New BIOTECHNOLOGY*, 30, 3-8.
- ONAY, M. 2018. Bioethanol production from *Nannochloropsis gaditana* in municipal wastewater. *Energy Procedia*, 153, 253-257.
- OTERO, A. & FÁBREGAS, J. 1997. Changes in the nutrient composition of *Tetraselmis suecica* cultured semicontinuously with different nutrient concentrations and renewal rates. *Aquaculture*, 159, 111-123.
- ØYSTÅ, Ø. 2009. *Malt* [Online]. Store norske leksikon. Available: <https://snl.no/malt> [Accessed 17.03 2018].
- ØYSTÅ, Ø. 2017. *Mask* [Online]. Store norske leksikon. Available: <https://snl.no/mask> [Accessed 17.03 2018].
- ØYSTÅ, Ø. 2018. *Øl* [Online]. Store norske leksikon. Available: <https://snl.no/%C3%B8l> [Accessed 17.03 2018].
- PAL, D., KHOZIN-GOLDBERG, I., COHEN, Z. & BOUSSIBA, S. 2011. The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90, 1429-1441.

- PALENIK, B., GRIMWOOD, J., AERTS, A., ROUZÉ, P., SALAMOV, A., PUTNAM, N., DUPONT, C., JORGENSEN, R., DERELLE, E. & ROMBAUTS, S. 2007. The tiny eukaryote *Ostreococcus* provides genomic insights into the paradox of plankton speciation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 7705-7710.
- PANCHA, I., CHOKSHI, K., GEORGE, B., GHOSH, T., PALIWAL, C., MAURYA, R. & MISHRA, S. 2014. Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource Technology*, 156, 146-154.
- PAPAPOLYMEROU, G., KARAYANNIS, V., BESIOS, A., RIGA, A., GOUGOULIAS, N. & SPILIOTIS, X. 2019. Scaling-up sustainable *Chlorella vulgaris* microalgal biomass cultivation from laboratory to pilot-plant photobioreactor, towards biofuel. *Glob. Nest J*, 21, 37-42.
- PARK, J., HAN, T., YARISH, C. & KIM, J. K. 2018. Microalgae and Alcohol. *Microalgae in Health and Disease Prevention*. Elsevier.
- PARK, J. B. K., CRAGGS, R. J. & SHILTON, A. N. 2011. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology*, 102, 35-42.
- PATIL, V., KÄLLQVIST, T., OLSEN, E., VOGT, G. & GISLERØD, H. 2007. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Journal of the European Aquaculture Society*, 15, 1-9.
- PEDERSEN, R., V. 2012. *Store muligheter i grønt havbruk* [Online]. Forskning.no. Available: <https://forskning.no/partner-bioforsk-oppdrett/store-muligheter-i-gront-havbruk/670347> [Accessed 1.3 2018].
- PELTOMAA, E., JOHNSON, M., D. & TAIPALE, S., J. 2017. Marine Cryptophytes Are Great Sources of EPA and DHA. *Marine Drugs*, 16, 3.
- PITTMAN, J. K., DEAN, A. P. & OSUNDEKO, O. 2011. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*, 102, 17-25.
- PRESTEGARD, S., ERGA, S., STEINRÜCKEN, P., MJØS, S., KNUITSEN, G. & ROHLOFF, J. 2016. Specific Metabolites in a *Phaeodactylum tricornutum* Strain Isolated from Western Norwegian Fjord Water. *Marine Drugs*, 14, 9.
- PRESTEGARD, S. K., KNUITSEN, G. & HERFINDAL, L. 2014. Adenosine content and growth in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae): effect of salinity, light, temperature and nitrate. *Diatom Research*, 29, 361-369.
- PRIYADARSHANI, I. & RATH, B. 2012. Commercial and industrial applications of micro algae—A review. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 3, 89-100.
- PROTEINSECT. 2016. *Insect as sustainable sources of protein* [Online]. Available: http://www.proteinsect.eu/fileadmin/user_upload/press/final-conf/Book_of_Proceedingsv1.pdf [Accessed 4.4.2020].
- PUDNEY, A., GANDINI, C., ECONOMOU, C. K., SMITH, R., GODDARD, P., NAPIER, J. A., SPICER, A. & SAYANOVA, O. 2019. Multifunctionalizing the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* for sustainable co-production of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids and recombinant phytase. *Scientific reports*, 9, 11444.

- PUGKAEW, W., MEETAM, M., YOKTHONGWATTANA, K., LEERATSUWAN, N. & POKETHITIYOOK, P. 2019. Effects of salinity changes on growth, photosynthetic activity, biochemical composition, and lipid productivity of marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Journal of Applied Phycology*, 31, 969-979.
- QIAO, H., CONG, C., SUN, C., LI, B., WANG, J. & ZHANG, L. 2016. Effect of culture conditions on growth, fatty acid composition and DHA/EPA ratio of *Phaeodactylum tricornutum*. *Aquaculture*, 452, 311-317.
- RAS, M., STEYER, J.-P. & BERNARD, O. 2013. Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 12, 153-164.
- RASTOGI, R. P., MADAMWAR, D. & PANDEY, A. 2017. Nutrition. In: RASTOGI, R. P., MADAMWAR, D. & PANDEY, A. (eds.) *Algal Green Chemistry: Recent Progress in Biotechnology*. Elsevier.
- REDFIELD, A. C. 1958. The Biological Control of Chemical Factors in the Environment. *American Scientist*, 46, 230A-221.
- REECE, J. B. & CAMPBELL, N. A. 2011. The structure and function of large biological molecules. In: REECE, J. B. & CAMPBELL, N. A. (eds.) *Campbell biology*. 9th ed. ed. Boston, Mass: Pearson.
- 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.
- SANSONE, C., GALASSO, C., OREFICE, I., NUZZO, G., LUONGO, L., CUTIGNANO, A., ROMANO, G., BRUNET, C., FONTANA, A., ESPOSITO, A. & IANORA, A. 2017. The green microalga *Tetraselmis suecica* reduces oxidative stress and induces repairing mechanisms in human cells. *Scientific Reports*, 7.
- SARGENT, J. R., TOCHER, D. R. & BELL, G. 2002. The lipids. In: HALVER, J. E. & HARDY, R. W. (eds.) *Fish nutrition*. 3rd ed. ed. Amsterdam: Academic Press.
- SEKKINGSTAD. u. å. *Sekkingstad AS - lang historie og sterke røtter* [Online]. Sekkingstad. Available: <http://www.sekkingstad.no/nor/om-sekkingstad> [Accessed 07.03 2018].
- SEPÚLVEDA, C., ACIÉN, F. G., GÓMEZ, C., JIMÉNEZ-RUIZ, N., RIQUELME, C. & MOLINA-GRIMA, E. 2015. Utilization of centrate for the production of the marine microalgae *Nannochloropsis gaditana*. *Algal Research*, 9, 107-116.
- SERDAR, S., LÖK, A., ACARLI, S. & KÖSE, A. 2007. The effect of two different culture media and five different salinities on growth of *Tetraselmis suecica*. *Rapp. Comm. int. Mer Médit*, 38, 394.
- SHAH, M., LUTZU, G., ALAM, A., SARKER, P., KABIR CHOWDHURY, M., PARSAEIMEHR, A., LIANG, Y. & DAROCH, M. 2018. Microalgae in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry. *Journal of Applied Phycology*, 30, 197-213.
- SHEN, P.-L., WANG, H.-T., PAN, Y.-F., MENG, Y.-Y., WU, P.-C. & XUE, S. 2016. Identification of Characteristic Fatty Acids to Quantify Triacylglycerols in Microalgae. *Frontiers in plant science*, 7, 162.

- SIMIONATO, D., BLOCK, M. A., LA ROCCA, N., JOUHET, J., MARÉCHAL, E., FINAZZI, G. & MOROSINOTTO, T. 2013. The response of *Nannochloropsis gaditana* to nitrogen starvation includes de novo biosynthesis of triacylglycerols, a decrease of chloroplast galactolipids, and reorganization of the photosynthetic apparatus. *Eukaryotic cell*, 12, 665-676.
- SINGH, G. & PATIDAR, S. 2018. Microalgae harvesting techniques: A review. *Journal of environmental management*, 217, 499-508.
- SINGH, S. & SINGH, P. 2015. Effect of temperature and light on the growth of algae species: a review. *renewable and sustainable energy reviews*, 50, 431-444.
- ŞIRIN, S. & SILLANPÄÄ, M. 2015. Cultivating and harvesting of marine alga *Nannochloropsis oculata* in local municipal wastewater for biodiesel. *Bioresource technology*, 191, 79-87.
- SPOLAORE, P., JOANNIS-CASSAN, C., DURAN, E. & ISAMBERT, A. 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101, 87-96.
- STANFORD UNIVERSITY. 2009. *Half Of Fish Consumed Globally Is Now Raised On Farms, Study Finds* [Online]. Scienc Daily,. Available: <https://www.sciencedaily.com/releases/2009/09/090907162320.htm> [Accessed January 5, 2019].
- STEINRUCKEN, P., ERGA, S. R., MJOS, S. A., KLEIVDAL, H. & PRESTEGARD, S. K. 2017. Bioprospecting North Atlantic microalgae with fast growth and high polyunsaturated fatty acid (PUFA) content for microalgae-based technologies. *Algal Res*, 26, 392-401.
- STEINRÜCKEN, P., PRESTEGARD, S. K., DE VREE, J. H., STORESUND, J. E., PREE, B., MJØS, S. A. & ERGA, S. R. 2018a. Comparing EPA production and fatty acid profiles of three *Phaeodactylum tricornutum* strains under western Norwegian climate conditions. *Algal Research*, 30, 11-22.
- STEINRÜCKEN, P., UNIVERSITETET I, B. & UNIVERSITETET I BERGEN INSTITUTT FOR, B. 2018b. *High-value fatty acids from microalgae : bioprospecting and outdoor cultivation at northern latitudes*. University of Bergen.
- SUDESHNA, R. & RUMA, P. 2015. Microalgae in Aquaculture: A Review with Special References to Nutritional Value and Fish Dietetics. *Proceedings of the Zoological Society*, 68, 1-8.
- SUNDA, W. G., PRICE, N. M. & MOREL, F. M. 2005. Trace metal ion buffers and their use in culture studies. In: ANDERSON, R. A. (ed.) *Algal culturing techniques*.
- SVIHUS, B. 2020. *essensielle fettsyrer* [Online]. Store norske leksikon: Store norske leksikon. Available: https://snl.no/essensielle_fettsyrer [Accessed 6.1 2020].
- SWANSON, D., BLOCK, R. & MOUSA, S. A. 2012. Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, 3, 1.
- TEBBANI, S., FILALI, R., LOPES, F., DUMUR, D. & PAREAU, D. 2014. Microalgae. *CO2 Biofixation by Microalgae: Modeling, estimation and control*

John Wiley & Sons.

- THOMAS INDUSTRY. 2020. *Wastewater Chemical Treatment Processes* [Online]. Thomas Publishing Company. Available: <https://www.thomasnet.com/articles/chemicals/wastewater-chemical-treatment/>
- [Accessed].
- TINE. u.å.-a. *TINE Meieriet Bergen* [Online]. TINE. Available: <https://www.tine.no/om-tine/meieriene/flytende-produkter/tine-meieriet-bergen> [Accessed 05.03 2018].
- TINE. u.å.-b. *TINEs historikk* [Online]. TINE. Available: <https://www.tine.no/om-tine/organisasjonen/tines-historikk> [Accessed 05.03 2018].
- TONON, T., HARVEY, D., LARSON, T. R. & GRAHAM, I. A. 2002. Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. *Phytochemistry*, 61, 15-24.
- TORSTENSEN, B. E., BELL, J. G., ROSENLUND, G., HENDERSON, R. J., GRAFF, I. E., TOCHER, D. R., LIE, Ø. & SARGENT, J. R. 2005. Tailoring of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) flesh lipid composition and sensory quality by replacing fish oil with a vegetable oil blend. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53, 10166-10178.
- TOSSAVAINEN, M., KATYAL CHOPRA, N., KOSTIA, S., VALKONEN, K., SHARMA, A. K., SHARMA, S., OJALA, A. & ROMANTSCHUK, M. 2018a. Conversion of biowaste leachate to valuable biomass and lipids in mixed cultures of *Euglena gracilis* and chlorophytes. *Algal Research*, 35, 76-84.
- TOSSAVAINEN, M., LAHTI, K., EDELMANN, M., ESKOLA, R., LAMPI, A.-M., PIIRONEN, V., KORVONEN, P., OJALA, A. & ROMANTSCHUK, M. 2018b. Integrated utilization of microalgae cultured in aquaculture wastewater: wastewater treatment and production of valuable fatty acids and tocopherols. *Journal of Applied Phycology*.
- TREDICI, M. R., RODOLFI, L., BIONDI, N., BASSI, N. & SAMPIETRO, G. 2016. Techno-economic analysis of microalgal biomass production in a 1-ha Green Wall Panel (GWP®) plant. *Algal Research*, 19, 253-263.
- UNIVERSITETET I OSLO. 2011. *Fykobiliner* [Online]. Available: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/f/fykobiliner.html> [Accessed 5.5 2020].
- VAAJE-KOLSTAD, G. 2014. *linolensyre* [Online]. Store norske leksikon. Available: <https://snl.no/linolensyre> [Accessed 1.3 2020].
- VADSTEIN, O. & OLSEN, Y. 2003. *Sustainable Increase of Marine Harvesting: Fundamental Mechanisms and New Concepts*, Springer Science & Business Media.
- VEGA, J. M., MENACHO, A. & LEÓN, J. 1991. Nitrate assimilation by microalgae. *Trends Photochem. Photobiol*, 2, 69-111.
- VOLKMAN, J., JEFFREY, S., NICHOLS, P., ROGERS, G. & GARLAND, C. 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 128, 219-240.

- WANG, X., FOSSE, H. K., LI, K., CHAUTON, M. S., VADSTEIN, O. & REITAN, K. I. 2019. Influence of Nitrogen Limitation on Lipid Accumulation and EPA and DHA Content in Four Marine Microalgae for Possible Use in Aquafeed.(Report). *Frontiers in Marine Science*, 6.
- WEISS, V., GROMET-ELHANAN, Z. & HALMANN, M. 1985. Batch and continuous culture experiments on nutrient limitations and temperature effects in the marine alga *Tetraselmis suecica*. *Water Research*, 19, 185-190.
- XIN, L., HONG-YING, H. & JIA, Y. 2010a. Lipid accumulation and nutrient removal properties of a newly isolated freshwater microalga, *Scenedesmus* sp. LX1, growing in secondary effluent. *New BIOTECHNOLOGY*, 27, 59-63.
- XIN, L., HONG-YING, H., KE, G. & YING-XUE, S. 2010b. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource technology*, 101, 5494-5500.
- XIN, L., HONG-YING, H. & YU-PING, Z. 2011. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. *Bioresource Technology*, 102, 3098-3102.
- YEN, H.-W., HU, I. C., CHEN, C.-Y. & CHANG, J.-S. 2014. Design of Photobioreactors for Algal Cultivation-Chapter 2. In: PANDEY, A., CHISTI, Y., LEE, D. J. & SOCCOL, C. R. (eds.) *Biofuels from Algae*. Elsevier B.V.
- YONGMANITCHAI, W. & WARD, O. P. 1991. Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 419-425.
- ZHANG, X. 2015. Microalgae removal of CO₂ from flue gas. *IEA Clean Coal Centre, UK*.
- ZHOU, W., CHEN, P., MIN, M., MA, X., WANG, J., GRIFFITH, R., HUSSAIN, F., PENG, P., XIE, Q., LI, Y., SHI, J., MENG, J. & RUAN, R. 2014. Environment-enhancing algal biofuel production using wastewaters. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 36, 256-269.
- ZHOU, W., HU, B., LI, Y., MIN, M., MOHR, M., DU, Z., CHEN, P. & RUAN, R. 2012. Mass Cultivation of Microalgae on Animal Wastewater: a Sequential Two-Stage Cultivation Process for Energy Crop and Omega-3-Rich Animal Feed Production. *Part A: Enzyme Engineering and Biotechnology*, 168, 348-363.
- ZINICOVSCAIA, I. 2016. Conventional Methods of Wastewater Treatment
In: ZINICOVSCAIA, I. & CEPOI, L. (eds.) *Cyanobacteria for Bioremediation of Wastewaters*. 1st ed. 2016 ed. Cham: Cham: Springer International Publishing.
- ZIVKOVIC, A. M., TELIS, N., GERMAN, J. B. & HAMMOCK, B. D. 2011. Dietary omega-3 fatty acids aid in the modulation of inflammation and metabolic health. *California agriculture*, 65, 106.

Appendiks 1:

WUR medium

Tabell A1: Oversikt over innholdet i WUR mediet som ble benyttet under eksperimentet.

WUR medium	
<u>Nitrate-substrate</u>	Per liter substrate
• NaNO ₃ (B350)	106 g
• KH ₂ PO ₄ (Biobank lab)	11.5 g
• Na ₂ EDTA (104)	3 g
• Trace mineral stock	50 mL
Dissolve in demi water and make total volume 1000 mL.	1000 mL
<u>Trace mineral stock</u>	Per liter stock solution
• Na ₂ EDTA*H ₂ O (104)	45 g
• FeSO ₄ , 7 H ₂ O (Biobank lab)	30 g
• MnCl ₂ , 2 H ₂ O	1.71 g
• ZnSO ₄ , 7 H ₂ O (G202)	0.66 g
• Co(NO ₃) ₂ , 6 H ₂ O (G90)	70 g
• CuSO ₄ , 5 H ₂ O (100)	24 g
• NaMoO ₄ , 2 H ₂ O (342)	242 g
Dissolve in demi water and make total volume 1.0 L	
If solution is not clear, adjust pH to 4 with NaOH to dissolve everything.	

OD 750

Tabell A2: Oversikt over OD 750 for *P. tricornutum* og *T. suecica* i de ulike kulturene, som ble målt med spektrofotometer hver dag gjennom eksperimentet. For hver art, avfallskilde og konsentrasjon (høy eller lav) ble det benyttet parallelle dyrkningsrør (nummerert som 1 og 2). De oransje markeringene viser når de ulike kulturene ble høstet i eksponentiell og stasjonær fase.

Dag		<i>P. tricornutum</i>							
		Kontroll (WUR), 55 ml		Kontroll (WUR), 110 ml		Fiskeblod, 55 mL		Fiskeblod, 110 mL	
		OD 750	OD750	OD 750	OD 750	OD 750	OD 750	OD 750	OD750
		1	2	1	2	1	2	1	2
0	0.0025	0	0.0035	0	0.0035	0	0	0.02	
1	0.0175	0.0125	0.0165	0.0025	0.0195	0.0335	0	0	
2	0.0395	0.0415	0.0265	0.0275	0.0485	0.0315	0	0	
3	0.0765	0.0865	0.0565	0.0655	0.0855	0.0755	0.004	0.019	
4	0.1745	0.1905	0.1445	0.1535	0.1395	0.1035	0.05	0.046	
5	0.3365	0.3615	0.2885	0.2965	0.1965	0.1765	0.034	0.093	
6	0.9085	0.9325	0.8225	0.8665	0.2225	0.2135	0.049	0.133	
7	1.4885	1.5445	1.4065	1.4425	0.2685	0.2495	0.098	0.179	
8	1.8165	1.8005	1.7385	1.9665	0.2705	0.2555	0.123	0.207	
9	2.4965	2.1765	2.1905	2.3145	0.3025	0.2995	0.162	0.234	
10	3.1845	2.8405	3.0625	3.0385	0.3065	0.2705	0.259	0.331	
11	3.8085	3.5525	3.1825	3.3345	0.3235	0.2955	0.263	0.367	
12	3.9525	3.7765	3.5745	3.9345			0.277	0.349	
13	4.2805	3.9925	3.9185	4.3665					
14	4.7765	4.6365	4.4785	4.9085					
15	5.0665	4.8665	4.9485	5.5785					
16	5.1265	4.8365	5.1585	5.7685					
17	5.5165	5.4165	5.9085	6.0385					
18	5.5865	5.6165	5.9585	6.2985					
19	5.8065	5.6565	6.2985	6.5685					
20	5.6065	5.5565	6.2285	6.6585					

Dag		<i>P. tricornutum</i>							
		Fiskeslam, 55 mL		Fiskeslam, 110 mL		Kloakk, 55 mL		Kloakk, 110 mL	
		OD 750	OD750	OD 750	OD750	OD 750	OD750	OD 750	OD750
		1	2	1	2	1	2	1	2
0	0	0.0015	0.002	0.000	0	0.005	0.0065	0	
1	0.0315	0.0245	0.015	0.039	0.003	0.003	0	0.0065	
2	0.0645	0.0405	0.067	0.088	0.03	0.028	0.0055	0.0275	
3	0.0905	0.0715	0.084	0.079	0.083	0.074	0.0575	0.0755	
4	0.1485	0.1465	0.137	0.056	0.139	0.137	0.1415	0.1655	
5	0.2285	0.2365	0.188	0.187	0.236	0.235	0.2095	0.2235	
6	0.2895	0.2995	0.214	0.271	0.207	0.205	0.2435	0.2755	

7	0.3495	0.3645	0.250	0.327	0.242	0.242	0.2875	0.3055
8	0.3745	0.4065	0.369	0.375	0.25	0.25	0.3065	0.3325
9	0.5615	0.6295	0.616	0.644	0.275	0.27	0.3445	0.3785
10	0.5895	0.6295	0.652	0.686	0.282	0.286	0.4325	0.4645
11	0.5995	0.6495	0.718	0.736	0.296	0.296	0.4525	0.4825
12	0.5935	0.6975	0.7	0.724	0.289	0.307	0.4405	0.4785

<i>P. tricornutum</i>									
Dag	Bløme, 41 ml		Bløme, 82 ml		Mask, 55 ml		Mask, 110 ml		
	OD 750	OD750	OD 750	OD750	OD 750	OD750	OD 750	OD750	
	1	2	1	2	1	2	1	2	
0	0	0.031	0	0.004	0	0.013	0	0.004	
1	0	0.028	0	0.002	0.009	0.023	0	0.027	
2	0	0.025	0.011	0	0.056	0.047	0	0.046	
3	0.015	0.03	0.051	0	0.098	0.103	0.139	0.137	
4	0.08	0.02	0.088	0	0.15	0.214	0.607	0.481	
5	0.17	0.151	0.101	0.073	0.356	0.303	0.621	0.627	
6	0.572	0.594	0.366	0.286	0.707	0.649	1.063	1.083	
7	0.75	0.722	0.312	0.19	0.649	0.633	0.775	0.803	
8	0.92	0.798	0.45	0.36	0.669	0.593	0.743	0.787	
9	1.278	1.522	0.96	0.892	0.741	0.689	0.791	0.843	
10	1.258	1.69	1.576	1.536	0.765	0.705	0.807	0.827	
11	1.454	2.238	2.684	2.54					
12	1.998	3.022	3.204	3.492					
13	2.478	3.518	3.756	4.028					
14	2.604	3.644	4.33	4.37					
15	3.004	3.854	4.69	4.82					
16	3.144	4.454	4.76	4.63					
17	3.374	4.574	4.32	4.22					
18	0.358	5.294							
19	3.974	5.394							
20	4.194	5.564							

<i>T. suecica</i>									
Dag	Kontroll (WUR), 55 ml		Kontroll (WUR), 110 ml		Fiskeblod, 55 mL		Fiskeblod, 110 mL		
	OD 750	OD750	OD 750	OD 750	OD 750	OD 750	OD 750	OD750	
	1	2	1	2	1	2	1	2	
0	0.003	0.000	0.003	0.007	0.000	0.004	0.005	0.000	
1	0.010	0.015	0.007	0.011	0.019	0.017	0.012	0.030	
2	0.000	0.004	0.002	0.006	0.033	0.025	0.047	0.043	
3	0.022	0.013	0.008	0.021	0.036	0.038	0.061	0.064	
4	0.020	0.034	0.036	0.043	0.067	0.076	0.102	0.091	

5	0.045	0.070	0.103	0.121	0.127	0.128	0.190	0.168
6	0.158	0.214	0.266	0.295	0.177	0.173	0.230	0.163
7	0.573	0.633	0.757	0.825	0.218	0.161	0.252	0.204
8	0.823	0.861	0.999	1.191	0.223	0.161	0.238	0.161
9	1.641	1.601	1.941	2.065	0.238	0.189	0.263	0.168
10	2.145	2.065	2.109	2.393	0.211	0.170	0.277	0.137
11	3.533	3.085	3.277	3.373	0.230	0.171	0.297	0.137
12								
13	4.533	4.261	2.797	4.109				
14	5.725	5.261	4.077	4.397				
15	6.381	5.981	4.485	4.917				
16	6.189	6.157	5.549	5.997				
17	7.437	6.701	6.029	6.909				
18	7.613	7.373	6.189	7.229				
19	7.981	8.013	6.285	7.357				
20	8.173	7.901	6.125	7.661				

		<i>T. suecica</i>							
		Fiskeslam, 55 mL		Fiskeslam, 110 mL		Kloakk, 55 mL		Kloakk, 110 mL	
		OD 750	OD750	OD 750	OD750	OD 750	OD750	OD 750	OD750
Dag		1	2	1	2	1	2	1	2
0		0.000	0.009	0.008	0.000	0.000	0.001	0.002	0.000
1		0.068	0.054	0.043	0.061	0.025	0.003	0.000	0.000
2		0.093	0.097	0.095	0.157	0.031	0.005	0.000	0.004
3		0.113	0.126	0.167	0.179	0.031	0.023	0.000	0.005
4		0.106	0.129	0.177	0.186	0.061	0.053	0.031	0.041
5		0.153	0.156	0.225	0.209	0.149	0.126	0.097	0.069
6		0.177	0.194	0.258	0.226	0.238	0.183	0.150	0.160
7		0.240	0.268	0.306	0.287	0.290	0.236	0.178	0.175
8		0.263	0.295	0.339	0.339	0.203	0.216	0.270	0.274
9		0.216	0.278	0.488	0.544	0.231	0.227	0.302	0.299
10		0.364	0.484	0.538	0.618	0.226	0.224	0.271	0.266
11		0.398	0.588	0.652	0.744	0.242	0.229	0.293	0.283
12		0.430	0.716	0.750	0.824				
13		0.492	0.704	1.040	1.024				
14		0.500	0.744	1.268	1.136				
15		0.554	0.770	1.308	1.208				
16		0.586	0.796	1.416	1.344				
17		0.616	0.786	1.468	1.424				
18				1.460	1.448				

		<i>T. suecica</i>							
		Bløme, 41 ml		Bløme, 82 ml		Mask, 55 ml		Mask, 110 ml	
		OD 750	OD750	OD 750	OD750	OD 750	OD750	OD 750	OD750
Dag		1	2	1	2	1	2	1	2
0		0.009	0.000	0.000	0.026	0.006	0.000	0.000	0.001
1		0.023	0.036	0.155	0.102	0.154	0.165	0.137	0.167
2		0.032	0.029	0.047	0.058	0.202	0.186	0.288	0.304
3		0.051	0.033	0.036	0.041	0.217	0.210	0.285	0.263
4		0.064	0.052	0.070	0.040	0.248	0.243	0.327	0.292
5		0.102	0.081	0.024	0.002	0.280	0.265	0.394	0.364
6		0.190	0.144	0.049	0.053	0.305	0.285	0.472	0.451
7		0.538	0.440	0.046	-0.006	0.308	0.288	0.749	0.813
8		1.000	0.898	0.087	0.031	0.303	0.308	0.769	0.775
9		1.752	1.776	0.816	0.346	0.289	0.297	0.787	0.785
10		2.076	1.396	0.856	0.344	0.299	0.184	0.763	0.819
11		3.040	2.424	0.974	0.646	0.333	0.189	0.869	0.937
12									
13		3.920	3.224	1.810	1.298	0.376	0.197	1.061	1.137
14		4.184	2.920	1.750	1.366	0.367	0.131	1.049	1.157
15		5.112	3.768	2.142	1.750	0.426	0.354	1.213	1.309
16		5.096	4.088	2.510	2.294	0.398	0.385	1.161	1.317
17		5.592	4.744	3.462	3.246	0.444	0.427	1.261	1.373
18		5.480	4.856	3.902	3.726	0.460	0.419	1.345	1.413
19		5.672	4.120	4.486	4.206	0.499	0.428	1.401	1.549
20		5.624	4.680	4.582	4.486	0.503	0.422	1.385	1.509

Tørrvekt

Tabell A3: Tabellene viser oversikt over de målte tørrvektverdiene som ble målt for *P. tricornutum* og *T. suecica* under både eksponentiell og stasjonær fase. Tabellen viser to parallelle dyrkningsrør per art, avfallskilde og mengde tilsatt avfallsvann.

Tabellen viser også tre parallelle filtreringer per dyrkningsrør. Dette er de tørrvektprøvene som ikke ble brukt videre i eksperimenter, da fremgangsmåten i senere tid har vist seg å gi unøyaktige målinger.

<i>P. tricornutum</i>							
Eksp.	Kultur No.	Nr.	blank (mg)	BM (mg)	tørrvekt (mg)	Vol (ml)	tørrvekt mg ml ⁻¹
1	Kontroll (WUR), 55 mL	a	123.903	129.376	5.5	3	1.82
		b	125.585	131.481	5.9	3	1.97
		c	127.93	133.168	5.2	3	1.75
2	Kontroll (WUR), 55 mL	a	125.613	131.751	6.1	3	2.05
		b	124.412	130.334	5.9	3	1.97
		c	125.708	132.539	6.8	3	2.28
1	Kontroll (WUR), 110 mL	a	126.258	130.698	4.4	3	1.48
		b	126.368	131.964	5.6	3	1.87
		c	126.98	132.302	5.3	3	1.77
2	Kontroll (WUR), 110 mL	a	126.797	131.789	5.0	3	1.66
		b	127.496	133.905	6.4	3	2.14
		c	127.591	134.069	6.5	3	2.16
1	Fiskeblod, 55 mL	a	127.12	129.011	1.9	3	0.63
		b	126.505	128.812	2.3	3	0.77
		c	128.647	130.686	2.0	3	0.68
2	Fiskeblod, 55 mL	a	129.15	131.047	1.9	3	0.63
		b	126.079	129.496	3.4	3	1.14
		c	127.903	129.992	2.1	3	0.70
1	Fiskeblod, 110 mL	a	126.819	129.089	2.3	3	0.76
		b	128.553	131.123	2.6	3	0.86
		c	128.415	130.540	2.1	3	0.71
2	Fiskeblod, 110 mL	a	130.057	133.342	3.3	3	1.10
		b	128.634	132.403	3.8	3	1.26
		c	126.66	129.946	3.3	3	1.10
1	Fiskeslam, 55 mL	a	128.696	131.010	2.3	3	0.77
		b	128.875	131.363	2.5	3	0.83
		c	128.611	131.507	2.9	3	0.97
2	Fiskeslam, 55 mL	a	126.399	129.776	3.4	3	1.13
		b	128.769	131.134	2.4	3	0.79
		c	125.728	127.861	2.1	3	0.71
1	Fiskeslam, 110 mL	a	128.627	131.682	3.1	3	1.02
		b	124.625	128.453	3.8	3	1.28
		c	130.551	133.763	3.2	3	1.07
2	Fiskeslam, 110 mL	a	127.167	130.181	3.0	3	1.00
		b	124.838	127.786	2.9	3	0.98
		c	126.5	129.279	2.8	3	0.93
1	Kloakk, 55 mL	a	125.383	127.211	1.8	3	0.61
		b	126.885	128.967	2.1	3	0.69
		c	126.635	128.723	2.1	3	0.70
2	Kloakk, 55ml	a	127.532	130.050	2.5	3	0.84
		b	124.923	127.240	2.3	3	0.77
		c	127.851	129.984	2.1	3	0.71
1	Kloakk, 110 mL	a	128.442	130.590	2.1	3	0.72
		b	126.175	128.375	2.2	3	0.73
		c	128.659	130.620	2.0	3	0.65
2	Kloakk, 110ml	a	128.732	130.710	2.0	3	0.66
		b	128.033	130.291	2.3	3	0.75
		c	126.63	128.766	2.1	3	0.71
1	Bløme, 82 mL	a	126.668	130.976	4.3	3	1.44
		b	126.668	130.87	4.2	3	1.40
		c	125.755	129.117	3.4	3	1.12
2	Bløme, 82 mL	a	128.448	132.501	4.1	3	1.35
		b	127.5	131.518	4.0	3	1.34
		c	127.02	131.06	4.0	3	1.35

1	Bløme, 41 mL	a	125.063	129.213	4.1	3	1.38
		b	124.079	127.698	3.6	3	1.21
		c	125.852	129.733	3.9	3	1.29
2	Bløme, 41 mL	a	125.07	131.446	6.4	3	2.13
		b	124.83	128.879	4.0	3	1.35
		c	126.735	132.013	5.3	3	1.76
1	Mask, 55 mL	a	126.579	132.891	6.3	3	2.10
		b	126.965	130.603	3.6	3	1.21
		c	124.521	127.859	3.3	3	1.11
2	Mask, 55 mL	a	127.451	130.796	3.3	3	1.12
		b	125.92	129.28	3.4	3	1.12
		c	128.17	131.528	3.4	3	1.12
1	Mask, 110 mL	a	126.539	130.606	4.1	3	1.36
		b	124.968	129.34	4.4	3	1.46
		c	125.47	129.464	4.0	3	1.33
2	Mask, 110 mL	a	124.728	128.373	3.6	3	1.22
		b	124.195	127.714	3.5	3	1.17
		c	125.295	128.711	3.4	3	1.14

<i>P. tricornutum</i>							
Stasj.	Kultur No.	Nr.	blank (mg)	BM (mg)	tørrvekt (mg)	Vol (ml)	tørrvekt mg ml ⁻¹
1	Kontroll (WUR), 55 mL	a	125.284	138.329	13.0	3	4.35
		b	128.174	141.87	13.7	3	4.57
		c	125.626	139.847	14.2	3	4.74
2	Kontroll (WUR), 55 mL	a	128.853	143.188	14.3	3	4.78
		b	125.575	139.15	13.6	3	4.53
		c	125.87	139.877	14.0	3	4.67
1	Kontroll (WUR), 110 mL	a	125.631	141.756	16.1	3	5.38
		b	127.92	144.37	16.5	3	5.48
		c	128.304	148.211	19.9	3	6.64
2	Kontroll (WUR), 110 mL	a	128.915	147.292	18.4	3	6.13
		b	126.452	146.207	19.8	3	6.59
		c	126.461	146.43	20.0	3	6.66
1	Fiskeblod, 55 mL	a	126.086	129.358	3.3	3	1.09
		b	126.745	129.109	2.4	3	0.79
		c	126.784	129.830	3.0	3	1.02
2	Fiskeblod, 55 mL	a	127.826	129.948	2.1	3	0.71
		b	127.528	129.914	2.4	3	0.80
		c	126.907	128.564	1.7	3	0.55
1	Fiskeblod, 110 mL	a	127.455	129.982	2.5	3	0.84
		b	127.612	129.125	1.5	3	0.50
		c	128.879	130.852	2.0	3	0.66
2	Fiskeblod, 110 mL	a	128.987	131.384	2.4	3	0.80
		b	127.316	130.477	3.2	3	1.05
		c	128.63	131.221	2.6	3	0.86
1	Fiskeslam, 55 mL	a	129.953	132.384	2.4	3	0.81
		b	126.523	132.813	6.3	3	2.10
		c	127.353	129.880	2.5	3	0.84
2	Fiskeslam, 55 mL	a	127.477	129.538	2.1	3	0.69
		b	127.168	129.558	2.4	3	0.80
		c	126.537	129.275	2.7	3	0.91
1	Fiskeslam, 110 mL	a	127.03	130.491	3.5	3	1.15
		b	126.211	129.900	3.7	3	1.23
		c	126.017	129.482	3.5	3	1.16
2	Fiskeslam, 110 mL	a	130.008	132.681	2.7	3.0	0.89
		b	128.136	131.199	3.1	3.0	1.02
		c	126.488	129.739	3.3	3.0	1.08
1	Kloakk, 55 mL	a	128.456	130.925	2.5	3	0.82
		b	128.658	130.471	1.8	3	0.60
		c	126.409	128.215	1.8	3	0.60
2	Kloakk, 55 mL	a	126.832	128.807	2.0	3	0.66
		b	127.602	129.013	1.4	3	0.47
		c	128.31	130.214	1.9	3	0.63

1	Kloakk, 110 mL	a	129.597	131.021	1.4	3	0.47
		b	126.552	128.368	1.8	3	0.61
		c	126.353	128.162	1.8	3	0.60
2	Kloakk, 110 mL	a	126.821	128.647	1.8	3	0.61
		b	127.185	129.089	1.9	3	0.63
		c	128.982	131.219	2.2	3	0.75
1	Bløme, 82 mL	a	128.22	139.69	11.5	2	5.74
		b	127.258	138.224	11.0	2	5.48
		c	127.368	138.403	11.0	2	5.52
2	Bløme, 82 mL	a	126.742	138.043	11.3	2	5.65
		b	127.108	137.648	10.5	2	5.27
		c	126.891	137.368	10.5	2	5.24
1	Bløme, 41 mL	a	127.304	139.387	12.1	3	4.03
		b	126.769	136.297	9.5	2	4.76
		c	125.895	135.19	9.3	2	4.65
2	Bløme, 41 mL	a	126.057	138.075	12.0	2	6.01
		b	127.414	139.802	12.4	2	6.19
		c	129.775	141.797	12.0	2	6.01
1	Mask, 55 mL	a	125.913	132.633	6.7	3	2.24
		b	128.004	131.629	3.6	3	1.21
		c	125.683	128.497	2.8	3	0.94
2	Mask, 55 mL	a	128.666	131.998	3.3	3	1.11
		b	129.58	132.723	3.1	3	1.05
		c	125.858	129.161	3.3	3	1.10
1	Mask, 110 mL	a	129.154	132.9	3.7	3	1.25
		b	127.295	131.518	4.2	3	1.41
		c	125.766	129.737	4.0	3	1.32
2	Mask, 110 mL	a	128.774	132.827	4.1	3	1.35
		b	125.758	129.944	4.2	3	1.40
		c	126.68	130.376	3.7	3	1.23

Eksp.	Kultur No.	Nr.	<i>T. suecica</i>				Vol (ml)	tørrvekt mg ml ⁻¹
			blank (mg)	BM (mg)	tørrvekt (mg)			
1	Kontroll (WUR) 55mL	a	127.635	130.558	2.9	1	2.92	
		b	127.121	131.606	4.5	1	4.49	
		c	125.958	128.888	2.9	1	2.93	
2	Kontroll (WUR) 55mL	a	125.757	129.143	3.4	1	3.39	
		b	126.573	129.527	3.0	1	2.95	
		c	126.844	129.327	2.5	1	2.48	
1	Kontroll (WUR) 110 mL	a	127.333	130.224	2.9	1	2.89	
		b	126.029	129.684	3.7	1	3.66	
		c	125.952	129.053	3.1	1	3.10	
2	Kontroll (WUR) 110 mL	a	125.593	128.614	3.0	1	3.02	
		b	127.26	131.354	4.1	1	4.09	
		c	126.442	130.966	4.5	1	4.52	
1	Fiskeblod 55 mL	a	127.283	129.394	2.1	3	0.70	
		b	127.47	130.244	2.8	3	0.92	
		c	127.662	129.173	1.5	3	0.50	
2	Fiskeblod, 55 mL	a	127.151	128.710	1.6	3	0.52	
		b	129.144	130.973	1.8	3	0.61	
		c	128.627	130.564	1.9	3	0.65	
1	Fiskeblod, 110 mL	a	126.33	128.597	2.3	3	0.76	
		b	128.52	131.354	2.8	3	0.94	
		c	126.303	129.036	2.7	3	0.91	
2	Fiskeblod, 110 mL	a	127.757	129.288	1.5	3	0.51	
		b	126.298	128.312	2.0	3	0.67	
		c	126.962	129.067	2.1	3	0.70	
1	Fiskeslam, 55 mL	a	127.609	129.943	2.3	3	0.78	
		b	129.988	131.765	1.8	3	0.59	
		c	130.868	133.669	2.8	3	0.93	
2	Fiskeslam, 55 mL	a	126.447	128.937	2.5	3	0.83	
		b	125.517	128.471	3.0	3	0.98	
		c	127.127	130.021	2.9	3	0.96	

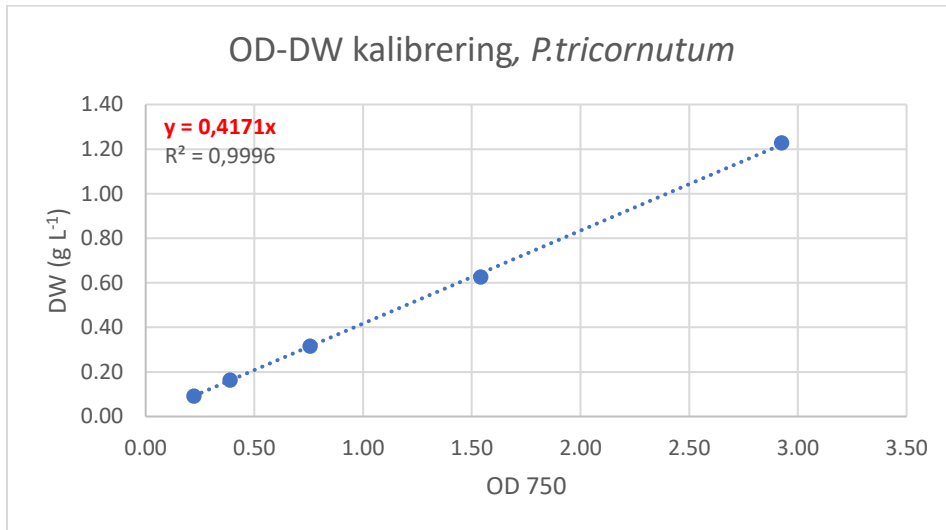
1	Fiskeslam, 110 mL	a	130.944	134.324	3.4	3	1.13
		b	123.477	126.403	2.9	3	0.98
		c	128.427	131.543	3.1	3	1.04
2	Fiskeslam, 110 mL	a	127.358	129.921	2.6	3	0.85
		b	130.019	133.157	3.1	3	1.05
		c	129.205	132.215	3.0	3	1.00
1	Kloakk, 55 mL	a	128.833	130.730	1.9	3	0.63
		b	128.625	129.940	1.3	3	0.44
		c	126.218	128.310	2.1	3	0.70
2	Kloakk, 55 mL	a	129.519	131.041	1.5	3	0.51
		b	127.851	130.138	2.3	3	0.76
		c	126.959	128.569	1.6	3	0.54
1	Kloakk, 110 mL	a	130.215	131.702	1.5	3	0.50
		b	128.803	130.703	1.9	3	0.63
		c	126.805	128.624	1.8	3	0.61
2	Kloakk, 110 mL	a	129.654	131.756	2.1	3	0.70
		b	124.654	127.841	3.2	3	1.06
		c	127.524	130.000	2.5	3	0.83
1	Bløme 82 mL	a	125.964	128.806	2.8	3	0.95
		b	126.907	130.085	3.2	3	1.06
		c	126.238	129.785	3.5	3	1.18
2	Bløme 82mL	a	127.352	129.954	2.6	3	0.87
		b	127.408	130.451	3.0	3	1.01
		c	126.535	129.291	2.8	3	0.92
1	Bløme 41 mL	a	126.162	129.21	3.0	1	3.05
		b	124.949	128.29	3.3	1	3.34
		c	126.487	129.148	2.7	1	2.66
2	Bløme 41 mL	a	127.571	131.774	4.2	1	4.20
		b	128.71	131.918	3.2	1	3.21
		c	127.534	130.774	3.2	1	3.24
1	Mask 55mL	a	127.118	134.321	7.2	3	2.40
		b	125.483	128.127	2.6	3	0.88
		c	125.228	128.775	3.5	3	1.18
2	Mask 55mL	a	127.776	130.895	3.1	3	1.04
		b	124.813	129.128	4.3	3	1.44
		c	126.224	128.635	2.4	3	0.80
1	Mask 110 mL	a	127.121	131.159	4.0	3	1.35
		b	125.861	130.595	4.7	3	1.58
		c	125.996	130.564	4.6	3	1.52
2	Mask 110 mL	a	126.34	131.255	4.9	3	1.64
		b	125.206	130.534	5.3	3	1.78
		c	123.243	127.831	4.6	3	1.53

<i>T. suecica</i>							
Stasj.	Kultur No.	Nr.	blank (mg)	BM (mg)	tørrvekt (mg)	Vol (ml)	tørrvekt mg ml ⁻¹
1	Kontroll (WUR) 55mL	a	124.74	133.794	9.1	1	9.05
		b	126.911	136.771	9.9	1	9.86
		c	126.643	136.61	10.0	1	9.97
2	Kontroll (WUR) 55mL	a	125.798	136.271	10.5	1	10.47
		b	126.226	134.92	8.7	1	8.69
		c	127.098	137.511	10.4	1	10.41
1	Kontroll (WUR) 110 mL	a	126.487	133.858	7.4	1	7.37
		b	126.14	132.684	6.5	1	6.54
		c	126.582	133.034	6.5	1	6.45
2	Kontroll (WUR) 110 mL	a	124.305	131.863	7.6	1	7.56
		b	125.421	134.99	9.6	1	9.57
		c	126.622	135.651	9.0	1	9.03
1	Fiskeblod 55 mL	a	129.638	133.561	3.9	3	1.31
		b	127.894	130.055	2.2	3	0.72
		c	131.155	132.809	1.7	3	0.55
2	Fiskeblod, 55 mL	a	126.02	127.840	1.8	3	0.61
		b	129.372	129.886	0.5	3	0.17
		c	128.906	130.763	1.9	3	0.62

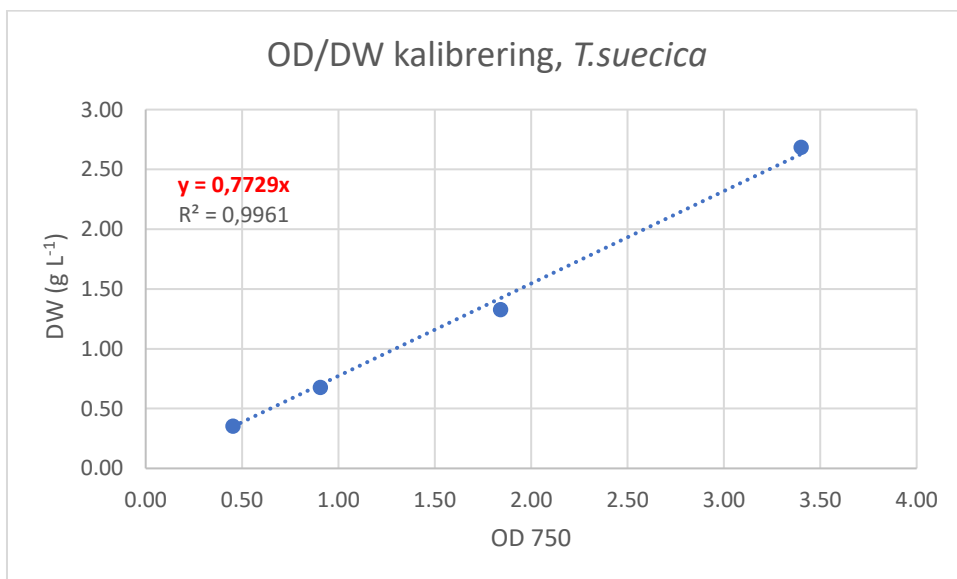
1	Fiskeblod, 110 mL	a	130.323	132.718	2.4	3	0.80
		b	130.199	132.466	2.3	3	0.76
		c	125.631	128.254	2.6	3	0.87
2	Fiskeblod, 110 mL	a	130.633	133.560	2.9	3	0.98
		b	128.071	130.687	2.6	3	0.87
		c	129.137	131.509	2.4	3	0.79
1	Fiskeslam, 55 mL	a	130.372	134.083	3.7	3	1.24
		b	129.504	132.971	3.5	3	1.16
		c	128.26	133.297	5.0	3	1.68
2	Fiskeslam, 55 mL	a	127.904	133.124	5.2	3	1.74
		b	128.508	134.121	5.6	3	1.87
		c	127.099	132.501	5.4	3	1.80
1	Fiskeslam, 110 mL	a	127.679	133.687	6.0	3	2.00
		b	126.042	133.79	7.7	3	2.58
		c	128.909	137.866	9.0	3	2.99
2	Fiskeslam, 110 mL	a	128.648	135.302	6.7	3	2.22
		b	125.607	132.546	6.9	3	2.31
		c	125.823	133.028	7.2	3	2.40
1	Kloakk, 55 mL	a	129.618	130.685	1.1	3	0.36
		b	128.085	129.943	1.9	3	0.62
		c	127.82	129.661	1.8	3	0.61
2	Kloakk, 55 mL	a	131.455	133.185	1.7	3	0.58
		b	126.322	127.865	1.5	3	0.51
		c	126.059	127.289	1.2	3	0.41
1	Kloakk, 110 mL	a	128.144	129.943	1.8	3	0.60
		b	126.072	128.300	2.2	3	0.74
		c	126.789	128.486	1.7	3	0.57
2	Kloakk, 110 mL	a	131.06	133.117	2.1	3	0.69
		b	128.142	129.883	1.7	3	0.58
		c	130.628	132.651	2.0	3	0.67
1	Bløme 82 mL	a	122.442	127.477	5.0	1	5.04
		b	128.088	134.369	6.3	1	6.28
		c	126.427	131.909	5.5	1	5.48
2	Bløme 82mL	a	125.628	131.324	5.7	1	5.70
		b	125.884	131.234	5.4	1	5.35
		c	122.606	128.204	5.6	1	5.60
1	Bløme 41 mL	a	124.112	130.346	6.2	1	6.23
		b	125.659	133.076	7.4	1	7.42
		c	128.269	135.112	6.8	1	6.84
2	Bløme 41 mL	a	127.094	133.537	6.4	1	6.44
		b	126.037	132.715	6.7	1	6.68
		c	124.548	130.505	6.0	1	5.96
1	Mask 55mL	a	124.698	131.204	6.5	3	2.17
		b	127.436	130.679	3.2	3	1.08
		c	128.145	131.197	3.1	3	1.02
2	Mask 55mL	a	125.444	128.35	2.9	3	0.97
		b	126.381	128.334	2.0	3	0.65
		c	126.46	129.108	2.6	3	0.88
1	Mask 110 mL	a	127.405	132.82	5.4	3	1.81
		b	127.178	133.281	6.1	3	2.03
		c	127.733	133.636	5.9	3	1.97
2	Mask 110 mL	a	126.557	133.274	6.7	3	2.24
		b	127.206	133.184	6.0	3	1.99
		c	127.434	134.014	6.6	3	2.19

Tørrvektestimater

Figur A1: Viser OD-tørrvektkalibreringen for *P. tricornutum*. Grafen viser OD verdiene på x-aksen (g L^{-1}) og tørrvektverdiene på y-aksen (OD750). Y-verdien ble ganget opp med OD 750 i eksponentiell og stasjonær fase for å gi et tørrvektestimater.



Figur A2: Viser OD-tørrvektkalibreringen for *T. suecica*. Grafen viser OD verdiene på x-aksen (g L^{-1}) og tørrvektverdiene på y-aksen (OD750). Y-verdien ble ganget opp med OD 750 i eksponentiell og stasjonær fase for å gi et tørrvektestimater.



Appendiks 2:

Statistikk:

Eksempel på hvordan den statistiske t-testen ble utført i RStudio. Den samme metoden ble gjennomført på samme måte som beskrevet under for begge algeartene under de ulike kultiveringsforholdene.

Eksemplene under viser t-testen som ble utført i RStudio for å undersøke om det var en signifikant forskjell i relativet EPA-innhold mellom eksponentiell og stasjonær fase ved kultivering med de ulike avfallskildene, og om det var signifikant forskjell i oppnådd celletetthet i stasjonær fase (OD750) mellom de ulike mengdene tilsatt avfallsvann.

Tabell A4: Oversikt over EPA i % av TFA for *T. suecica* kultivert med Kontroll (WUR) 55 mL i eksponentiell og stasjonær fase.

<i>T. suecica</i>	
TFA	EPA (%)
Eksp.	3.90474420
Eksp.	3.94786577
Eksp.	3.72383686
Eksp.	3.69741184
Stasj	3.43402219
Stasj	3.53908212
Stasj	3.94824377
Stasj	3.98153238

R-Syntax:

```
SUE_WUR55_df <- read_excel("excelark 2020/t.test/Sue/SUE.WUR55.df.xlsx")
attach(SUE_WUR55_df)
t.test(EPA~TFA)
```

Resultat: $t = 0.60428$, $df = 4.1724$, $p\text{-value} = 0.577$

Tabell A5: Oversikt over målte OD750 målinger i stasjonær fase for *T. suecica* kultivert med Kontroll (WUR) 55 mL og 110 mL.

<i>T. suecica</i>	
Kons.	OD750
55 mL	8.173
55 mL	7.901
110 mL	6.125
110 mL	7.661

R-Syntax:

```
SUE_WURSTAT_df <- read_excel("excelark 2020/t.test/Sue/SUE.WURSTAT.df.xlsx")
```

```
> attach(SUE_WURSTAT_df)
```

```
> t.test(OD750~Kons)
```

Resultat: $t = 1.4668$, $df = 1.0627$, $p\text{-value} = 0.3706$

Ammoniumkonsentrasjon i forsøkskulturene

Eksempel på omregning fra nitrat til ammonium for kontroll (WUR):

$1546 \text{ mg/L nitrat} \times \text{atomvekten, ammonium} (18.039 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}) / \text{atomvekt, nitrat} (62,0049 \text{ g/mol}^{-1})$

Tabell. A6: Oversikt over mengden ammonium i de ulike forsøkskulturene. *For kontrollene er nitrat regnet om til tilsvarende mengde ammonium.

Avfallskilde	N-konsentrasjon (ammonium) mg/L
*Kontroll (WUR), 55 mL	82.21
*Kontroll (WUR), 110 mL	164.78
Fiskeblod, 55 mL	2.75
Fiskeblod, 110 mL	5.51
Fiskeslam, 55 mL	7.89
Fiskeslam, 110 mL	15.78
Kloakk, 55 mL	1.38
Kloakk, 110 mL	2.75
Bløme, 41 mL	21
Bløme, 82 mL	41
Mask, 55 mL	2.75
Mask, 110 mL	5.51