



Sveriges lantbruksuniversitet  
Fakulteten för landskapsplanering, trädgårds- och jordbruksvetenskap  
Område Hortikultur

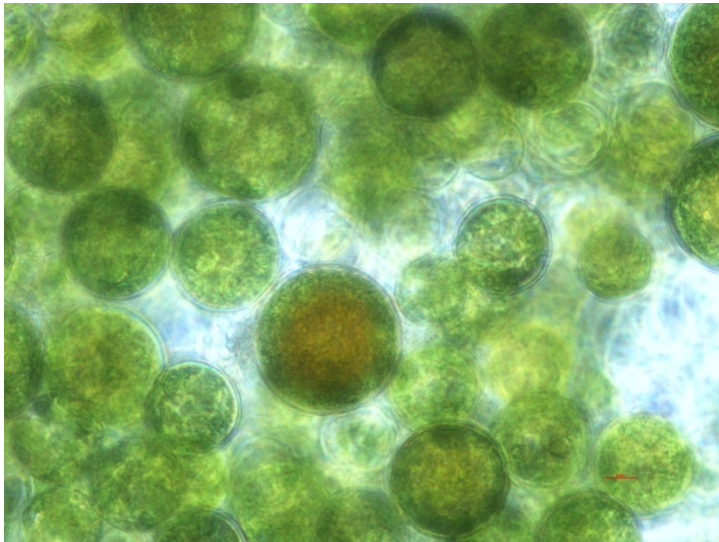
## **Odling av mikroalger inom trädgårdsnäringen**

**- Kan mikroalger som producerar kommersiellt intressanta ämnen tillväxa i använd näringslösning från växthusodling?**

Cultivation of microalgae in the horticulture industry

- is it possible to grow microalgae that produce valuable metabolites in nutrient solution from greenhouse horticulture?

*Embla Ardal*



Kandidatarbete i biologi 15 hp

Hortonomprogrammet

Självständigt arbete vid LTJ-fakulteten, SLU

Alnarp 2012

## **Odling av mikroalger inom trädgårdsnäringen**

**- Kan mikroalger som producerar kommersiellt intressanta ämnen tillväxa i använd näringslösning från växthusodling?**

Cultivation of microalgae in the horticulture industry

- is it possible to grow microalgae that produce valuable metabolites in nutrient solution from greenhouse horticulture?

*Embla Ardal*

**Handledare:** Malin Hultberg, SLU, Hortikultur

**Examinator:** Helena Karlén, SLU, Hortikultur

**Omfattning:** 15 hp

**Nivå och fördjupning:** G2E

**Kurstitel:** Kandidatarbete i biologi

**Kurskod:** EX 0493

**Program/utbildning:** Hortonomprogrammet

**Utgivningsort:** Alnarp

**Utgivningsår:** 2012

**Omslagsbild:** Embla Ardal

**Serienamn:** Självständigt arbete vid LTJ-fakulteten, SLU

**Elektronisk publicering:** <http://stud.epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** mikroalger, minskat näringsläckage, recirkulering, dräneringsvatten, växthus, metaboliter, *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis*

# Förord

Detta är ett kandidatarbete på 15 högskolepoäng inom Hortonomprogrammet vid Sveriges lantbruksuniversitet i Alnarp. Jag vill tacka min handledare Malin Hultberg för all hjälp, uppmuntran och inspiration under arbetets gång. Tack Carin Emanuelsson på Jordbruksverket och Torbjörn Hansson på Grön kompetens för era svar på frågor om växthusodling i Sverige.

Alnarp, Mars 2012

Embla Ardal

# Sammanfattning

Mikroalger har en förmåga att reducera näringsämnen i näringsberikat vatten samtidigt som de kan producera kommersiellt intressanta ämnen. Att odla mikroalger i dräneringsvatten från växthusodling skulle kunna vara ett sätt för odlare, som inte använder recirkulerande odlingsystem, att återvinna näringsberikat vatten. Om mikroalgerna producerar värdefulla metaboliter så kunde detta vara ett sätt för odlare att vinna ekonomiskt samtidigt som näringsläckaget reduceras.

I detta arbete undersöks möjligheten att odla mikroalgerna *Chlorella vulgaris* och *Haematococcus pluvialis* i en näringslösning med ett näringsinnehåll som motsvarar det i returvatten från växthusodling av tomat. *C. vulgaris* har en hög proteinhalt och innehåller även fleromättade fettsyror och karotenoider. *H. pluvialis* kan producera den ekonomiskt värdefulla karotenoiden astaxanthin. Arbetet handlar om att belysa möjligheter och svårigheter i odling av mikroalgerna i returvatten och vilka åtgärder som kan behövas för att få en så bra tillväxt som möjligt. Resultatet visade att *C. vulgaris* tillväxte bra i näringslösningen medan *H. pluvialis* tillväxte dåligt under samma förutsättningar.

# Abstract

Microalgae have an ability to reduce nutrients in nutrient enriched water while at the same time being able to produce valuable metabolites. The cultivation of microalgae in drainage water from greenhouse cultivation could be a method for growers, who do not use recirculating culture systems, to recycle nutrient enriched water. If the microalgae produce valuable metabolites, it could be of economical gain for growers while nutrients are reduced.

In the present study I have examined whether it is possible to cultivate the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* in a nutrient solution with a content that corresponds to the drainage water from a greenhouse cultivation of tomato. *C. vulgaris* has got a high protein content and also contains polyunsaturated fatty acids and carotenoids. *H. pluvialis* is able to produce the economically valuable carotenoid astaxanthin. My study is about how to elucidate opportunities and constraints in the cultivation of microalgae in drainage water and what actions may be needed to get as.

# Innehållsförteckning

<b>1</b>	<b>Introduktion</b>	<b>7</b>
1.1	Problembeskrivning och syfte	7
1.2	Frågeställning	8
1.3	Metod	8
1.4	Växthusodling i Sverige - odlingsystem och näringsläckage	8
1.5	Vad är mikroalger?	10
1.6	Mikroalgers användningsområden	10
1.7	Mikroalger som potentiella reningsverk inom trädgårdsnäringen	11
1.8	Hälsöfrämjande metaboliter	11
1.9	Mikroalger som kost	12
1.10	Odlingsystem och skördemetoder för mikroalger	12
1.11	<i>Chlorella</i> och <i>Haematococcus</i> – tillväxtfaktorer och metaboliter	13
1.11.1	<i>Chlorella</i> spp.	14
1.11.2	<i>Haematococcus pluvialis</i>	15
<b>2</b>	<b>Material och metod</b>	<b>18</b>
2.1	Mikroorganismer	18
2.2	Tillväxtförhållanden	18
2.3	Försöksupplägg	19
2.4	Analys av tillväxt	20
<b>3</b>	<b>Resultat</b>	<b>21</b>
3.1	<i>Chlorella vulgaris</i>	22
3.2	<i>Haematococcus pluvialis</i>	23
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>25</b>
<b>5</b>	<b>Slutsats</b>	<b>28</b>
<b>6</b>	<b>Litteraturlista</b>	<b>29</b>

# 1 Introduktion

## 1.1 Problembeskrivning och syfte

Det förekommer fortfarande läckage av näringsberikat vatten från växthusodlingar i Sverige vilket är ett miljöproblem. I öppna odlingsystem försvinner näringsberikat vatten ner i dräneringar och förs ofta vidare till vattendrag (Christensen m.fl. 2010) vilket kan leda till övergödning framförallt av ämnena kväve och fosfor. I recirkulerande odlingsystem återanvänds returvattnet vilket reducerar risken för näringsläckage och enligt Löfkvist m.fl. (2009) har utvecklingen sedan 2006 gått åt ett ökat användande av recirkulerande system, sett till odlingsytan. År 2008 stod recirkulerande system för 34 % av den totala odlingsytan vilket innebär att det fortfarande är 66 % som inte har detta (Jordbruksverket 2008). Det är ofta mindre företag som inte använder recirkulerande odlingsystem (Löfkvist m.fl. 2009) och företag som odlar kulturer med kortare odlingssäsong (Hansson 2012).

Det här arbetet är en mindre del av ett större forskningsförsök som genomförs på området för Hortikultur, SLU, Alnarp där möjligheten att odla mikroalger i returvattnet från växthusodling av tomat undersöks. Detta för att tomat är en av de vanligaste växthuskulturerna i Sverige. Försöket fokuserar på möjligheten att kunna ta tillvara på använd näringslösning från växthusodling och samtidigt producera mikroalger som innehåller kommersiellt värdefulla metaboliter. Tanken är att motivera växthusodlare, som inte återvinner sitt dräneringsvatten, att se möjligheten i att använda detta för att odla mikroalger. Försöket görs i växthus utan avancerad teknik för att passa växthusodlares förutsättningar.

## 1.2 Frågeställning

Kan man odla mikroalgerna *Chlorella vulgaris* och *Haematococcus pluvialis* i dräneringsvatten från växthusodling av tomat? Kan detta göras i växthus under enklare förhållanden? Vilka svårigheter och möjligheter finns och hur kan odlaren styra detta?

## 1.3 Metod

Undersökningen bestod av två delar; dels genom ett praktiskt odlingsförsök där mikroalgerna *Chlorella vulgaris* och *Haematococcus pluvialis* odlades i växthus under två veckor. Analysen bestod i att celldensiteten och den optiska densiteten mättes dagligen och därefter gjordes beräkningar som sammanställdes till diagram. Den andra delen av undersökningen bestod av en litteraturstudie där bland annat information om odlingsystem för växthuskulturer, odlingsbetingelser för mikroalger och metaboliter av kommersiella intressen eftersöktes och sammanställdes. I sökandet av vetenskapliga artiklar användes främst databaserna Web of Knowledge och Google Scholar.

## 1.4 Växthusodling i Sverige, recirkulering och näringsläckage

Svensk trädgårdsproduktion i växthus inriktar sig främst på grönsaker, prydnadsväxter eller bär och de vanligaste grönsakskulturerna är gurka, tomat och sallat. Växthusodlingar förekommer över hela landet och av den totala ytan så finns ungefär hälften i Skåne. Plantornas tillförsel av vatten och gödselmedel styrs av kulturens aktuella behov beroende på ålder, ljusintensitet mm. Mängden som tillsätts överskrider växternas upptag vilket leder till att en viss mängd näringsberikat vatten dräneras bort (Löfkvist m.fl. 2009). Enligt Christensen m.fl. (2010) går 20-25 % av bevattningsmängden förlorad i en växthusodling med gurka eller tomat och tittar man enbart på näringsämnen så försvinner 30-40 % av det tillsatta kvävet och 25-30 % av kaliumet. Fosfor som dräneras bort är svårare att mäta då detta kan fällas ut som kalciumfosfat vid ett pH över 6,3 (Hansson 2003).



Uppsamlingen av överskottsvattnet görs i 2/3 av företagen medan 1/3 inte gör detta. Framförallt är det de mindre företagen som saknar uppsamling. Överskottsvattnet kan sen tas omhand på olika sätt. Det kan ske genom att det leds tillbaka till kulturen vilket kallas recirkulering eller slutet odlingssystem (Löfkvist m.fl. 2009). Genom att använda slutna bevattningssystem besparas mycket av växtnäringen vilket är positivt ur en miljösynpunkt. Dock ställs det vissa krav på råvattnets kvalitet vid recirkulering, framför allt vad gäller halten av oönskade ämnen som natrium och klorid, då ämnen lätt ackumuleras i dessa system (Christensen m.fl. 2010).

I öppna odlingssystem så försvinner det näringsberikade vattnet ner i dräneringar i marken och hamnar därefter vanligen i vattendrag och grundvatten (Christensen m.fl. 2010) vilket är ett miljöproblem. Vad som händer med det bortdränerade vattnet är ofta oklart bland odlare men vanligen leds det vidare till dagvatten eller större dräneringssystem. Enligt statistiska meddelanden från Jordbruksverket (2008) som avser företag med minst 200 m<sup>2</sup> växthusyta, så har ytan för recirkulerande odlingssystem ökat från 27 % år 2005 till 34 % år 2008. Utvecklingen sedan 2006 visar på en ökning i odlingsyta för recirkulerande system främst gällande grönsaksodling (Löfkvist m.fl. 2009) De som fortfarande har öppna odlingssystem är ofta odlare med kortare säsong, exempelvis vissa gurkodlare (Hansson 2012).

Återanvändning av dräneringsvatten kräver en viss kontroll av dess kvalitet bland annat vad gäller näringsinnehåll och pH. Exempelvis så måste man vara medveten om att näringsinnehållet varierar under odlingssäsongen och är i kulturer med gurka och tomat som högst under våren (Hansson 2003). Om pH-värdet i näringslösningen är högre än önskat tillsätter man ofta en syra. De man brukar använda är fosforsyra, salpetersyra eller magnesiumfosfat. Fosforsyra är dessutom ett utmärkt fosforgödselmedel och salpetersyran kan fungera som kvävegödsel. Mängden tillsatt syra beror på vattnets alkalitet och mäts i milligram vätekarbonat HCO<sub>3</sub> per liter vatten. Denna kan variera mycket mellan olika platser i landet. Returvatten har ofta en låg alkalitet och därför är behovet av att sänka pH inte lika stort vid blandning av råvatten med returvatten. I slutna odlingssystem kan man inte heller utesluta förekomst av patogener från odlingssubstratet och plantans rötter (Christensen m.fl. 2010).

## 1.5 Vad är mikroalger?

Alger är samlingsnamnet för primitiva, oftast akvatiska, organismer och innefattar över 30 000 arter från olika phylum. Det är en grupp organismer med stor variation vad gäller levnadssätt, utseende och storlek och kan vara mikroskopiska encelliga mikroalger till tiotals meter långa multicellulära makroalger (Hogg 2005).

Mikroalger är beteckningen på alger som är så små att de bara kan ses i mikroskop och innefattar både eukaryota organismer och prokaryota cyanobakterier, även kallade blågröna alger. Dessa delar förmågan att genom fotosyntes kunna omvandla CO<sub>2</sub> och solenergi till organiska sockerföreningar (Larsdotter 2006). Fotosyntesen sker på ett sätt som liknar de landlevande växternas, dock är mikroalger mer effektiva på att bilda biomassa än dessa. Det beror sannolikt på dess enkla cellstruktur och att de lätt kan ta upp vatten och näring då de konstant är omgivna av vätska (Chacoón-Lee & González-Mariño 2010).

## 1.6 Mikroalgers användningsområden

Mikroalger kan reducera mängden av vissa skadliga ämnen och samtidigt producera intressanta metaboliter. De har en förmåga att minska mängden näringsämnen i avloppsvatten, ta upp tungmetaller och ta upp CO<sub>2</sub> vid förbränning exempelvis i kolkraftverk för att på så sätt minska utsläpp till atmosfären (Zeiler 1995). Många mikroalger producerar kommersiellt intressanta metaboliter och det finns en stor marknad för dessa bland annat i livsmedels- och hälsokostbranschen (Guil-Guerro and Reboloso-Fuentes 2008). Mikroalger används även i djurfoder och som gödslingsmedel. I akvakulturer kan mikroalger användas som levande föda åt juvenilstadier av musslor, kräftdjur och vissa fiskar i akvakulturer (Carlsson m.fl. 2007). Mikroalger är rika på lipider vilket gör att de kan odlas för framställning av råolja som man i sin tur kan använda för tillverkning av biodiesel. Man kan dessutom framställa bio-metangas genom fermentering av biomassan. Restprodukten är CO<sub>2</sub> som i sin tur går att använda i odling av nya alger (Barfod m.fl. 2008).

## 1.7 Mikroalger som potentiella reningsverk inom trädgårdsnäringen

Att reducera näringsämnen i avloppsvatten med mikroalger är en väletablerad teknik och det finns ett flertal studier som visar att detta är genomförbart (Larsdotter 2006). Enligt Pufelski m.fl. (2010) kan man näringsmässigt jämföra avloppsvatten med använd växtnäringslösning då båda är rika på kväve och fosfor vilket öppnar för möjligheten att börja odla alger inom trädgårdsnäringen. Detta gäller odlare som inte har möjlighet att sluta sina odlingssystem och recirkulera exempelvis på grund av hög förekomst av natriumklorid i sitt råvatten. Omvandling och reduktion av näringsämnen sker under algens tillväxt när exempelvis fosfor och kväve används för att bygga upp nya celler (Larsdotter 2006).

## 1.8 Hälsosfrämjande metaboliter

Mikroalger ses som en nästan obegränsad källa till nya funktionella bioaktiva föreningar varav många inte går att finna i andra organismer (Plaza m.fl. 2009). Två av de hälsomässigt viktigaste grupperna av ämnen är fleromättade fettsyror ( däribland Omega-3-fettsyror) och karotenoider. Dessa är essentiella för människors och djurs hälsa men då vi saknar förmågan att syntetisera dessa får vi i oss dem genom födan (Cardozo m.fl. 2006). En av fördelarna med mikroalger är att deras fettsyrehalt är något högre än i fiskolja och dessutom innehåller de mindre föroreningar än lipider från skaldjur (Chacoón-Lee & González-Mariño 2010). Omega-3 är idag ett vanligt kosttillskott och vanligen produceras detta från fisk. Uthålligheten i denna produktion har ifrågasatts (Cannon 2009) och produktion via mikroalger kan vara ett sätt att ta fram fettsyror på ett mer miljövänligt sätt.

Karotenoider produceras av mikroalgerna som en skyddsmekanism för att motverka olika typer av stress. Det kan exempelvis ske vid hög ljusintensitet eller hög salthalt vilka de antioxiderande karotenoiderna skyddar mot genom att oskadliggöra fria radikaler (Chacoón-Lee & González-Mariño 2010). Några av de hälsomässigt och kommersiellt viktigaste karotenoiderna är astaxanthin, lutein,  $\beta$ -karoten, zeaxanthin. Flera undersökningar visar på att en hög konsumtion av karotenoider motverkar

riskerna att drabbas av flera sjukdomar (Bendich & Olson 1989). Karotenoiden astaxanthin är ett rött färgpigment som är vanligt i många akvatiska organismer och används bland annat som foder i laxodling för att ge laxen dess röda färg. Det är kraftigt antioxiderande och studier på råttor och möss visar på att ämnet är cancerpreventivt (Cardozo m.fl. 2006).

## 1.9 Mikroalger som kost

Idag finns det ett stort kommersiellt intresse för många av de metaboliter mikroalger producerar bland annat i hälso- och livsmedelsbranschen och också för att direkt använda mikroalgen som ett livsmedel (Carlsson m.fl. 2007). Trots att mikroalger är en relativt ny föda i västvärlden så har de ätits under flera århundraden i många andra delar av världen. Det var först i slutet av 1950-talet som man i västvärlden började intressera sig för mikroalger på grund av dess höga proteinhalt, vilken kunde utgöra en god näringskälla då befolkningen ökade i snabb takt. En av algerna som föreslogs som en god proteinkälla var *Chlorella* spp. (Chacoón-Lee & González-Mariño 2010). Ett sätt att använda mikroalger i kosten är att torka biomassan och använda den direkt, nermalad till pulver eller i kapslar. Om mikroalger marknadsförs som en ingrediens i vanliga livsmedel brukar det gå in under beteckningen Functional Food. Ett annat sätt att få i sig nyttiga ämnen från alger är att extrahera utvalda metaboliter som därefter säljs i kosttillskott eller som ingredienser i livsmedel (Chacoón-Lee & González-Mariño 2010). Ytterligare ett sätt att få i sig hälsofrämjande metaboliter från mikroalger är att använda dem som djurfoder, ofta i akvakulturer, vilket kan leda till att fettsammansättningen hos djuret blir bättre (Bourre 2005).

## 1.10 Odlingssystem och skördemetoder för mikroalger

Odlingssystem för mikroalger brukar delas in i huvudgrupperna öppna och stängda system. I stängda odlingssystem kontrolleras tillväxtfaktorerna medan öppna odlingssystem, som har kontakt med utomhusluften, påverkas av externa miljöfaktorer. Öppna system är lättare att konstruera och underhålla vilket också gör

dem billigare än slutna system (Larsdotter 2006). De öppna systemen är ofta dammar som kan vara utformade på olika sätt. Ljuset är den begränsande faktorn i öppna system och då solljuset inte når längre ner än 10 cm brukar dessa ha ett djup på ca 0,2-0,5 m. Mikroalger behöver kol och för att de ska kunna tillväxa bra bör man tillsätta CO<sub>2</sub> då halten i atmosfären är lägre än vad som är optimalt för algerna. Ett annat sätt för algerna att få i sig kol är genom att tillsätta en organisk kolkälla i lösningen. En nackdel med öppna system är att det finns en risk för kontaminering av andra mikroorganismer.

I slutna odlingsystem, eller fotobioreaktorer, måste allt som algekulturen behöver för att växa tillföras och kontrolleras. Det innefattar pH, temperatur, ljusintensitet, dagslängd och utbyte av O<sub>2</sub> och CO<sub>2</sub>. Systemen är byggda av genomskinliga material som glas eller plast och kan vara utformade på olika sätt. Dock är alla konstruerade för att ge algerna en så hög ljusinstrålning som möjligt. Fotobioreaktorer gör det möjligt att producera stora mängder biomassa och då de är slutna så odlas alger som är känsliga för kontaminering med fördel i dessa (Jansson 2011). Fotobioreaktorer medför dock högre produktionskostnader än öppna system (Carlsson 2007).

De tre vanligaste sätten att skörda mikroalger på är sedimentering, filtrering och centrifugering. Vid sedimentering ansamlas biomassan på botten av kulturen och metoden lämpar sig bara på alger större än 70 µm. Centrifugering fungerar även bra för mindre alger och i processen separeras algerna från mediet och lägger sig på botten. Filtrering lämpar sig bäst för alger som är större än 70 µm och är därför inte en bra metod för små alger som exempelvis *Chlorella*. I processen filtreras algerna, under tryck eller sug från en pump, genom ett membran av modifierad cellulosa. Filtrering är ett billigare sätt att skörda mikroalger på än centrifugering (Jansson 2011).

### 1.11 *Chlorella* och *Haematococcus* – tillväxtfaktorer och metaboliter

Att *Chlorella vulgaris* valdes till försöket beror bland annat på att den är lättodlad (Vaikosen m.fl. 2007) och tål höga näringshalter och har en förmåga att ta upp höga halter kväve och fosfor (Jansson 2011). Dessutom innehåller den flera intressanta

metaboliter. *Haematococcus pluvialis* valdes framförallt för sin förmåga att ackumulera karotenoiden astaxanthin. Dessutom kan det tillväxa under varierande odlingsbetingelser (Dore & Cysewski 2003). På båda algerna har det tidigare gjorts många studier runt om i världen.

**1.11.1 *Chlorella* spp.** tillhör fylum Chlorophyta (grönalger) och är mellan 2 – 10  $\mu\text{m}$  i diameter och saknar flagell (Plaza m.fl. 2009). *Chlorella* är både lätt och billigt att odla (Vaikosen m.fl. 2007) och har länge setts som en tänkbar källa till livsmedel. (Chacoón-Lee & González-Mariño 2010).

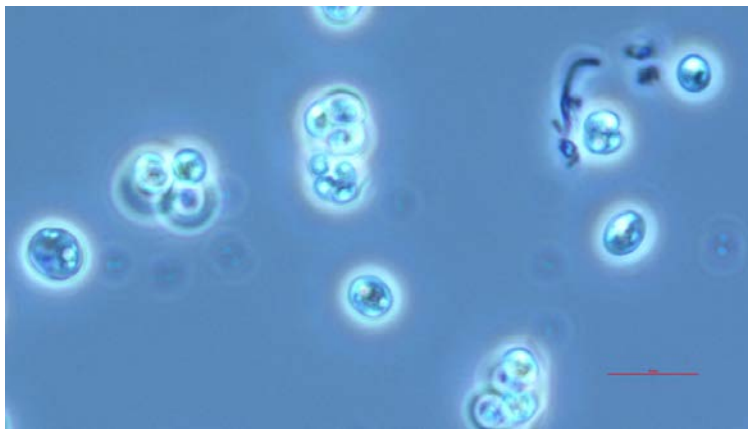


Fig. 1. *Chlorella vulgaris* sett i ljusmikroskop. Röd markering visar 10  $\mu\text{m}$ . Foto: Stina Månsson.

För att få en optimal tillväxt vid odling av *Chlorella* bör man styra faktorer som temperatur, näringshalt, pH och ljusintensitet. Kulturtiden för *Chlorella* ligger kring 10 dagar (Chinnasamy 2009), (Jansson 2011) men varierar beroende på olika miljöfaktorer. Temperaturen ska ligga mellan 20-30° C för att vara optimal och dagslängden (dag/natt) bör ligga kring 16/8 timmar. *Chlorella* tål stora variationer av ljus mätt i fotosyntetisk aktiv strålning och kan tillväxa i 20 till 1800  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  (Jansson 2011). Ett problem i algodlingar är när ljusintensiteten är hög samtidigt som temperaturen är låg vilket kan leda till fotoinhibering. Detta kan vara en svårighet i svenska algodlingar (Larsdotter 2006). För höga näringshalter kan ha en hämmande effekt på tillväxten men undersökningar visar samtidigt att *Chlorella* har en förmåga att växa i så höga halter ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) som upp till som 1180 mg/l. *Chlorella* är dessutom mycket effektiv i sitt näringsupptag och kan ta upp mellan 173-10900  $\text{mg}/\text{m}^2/\text{d}$  kväve och 75 - 1290 ( $\text{mg}/\text{m}^2/\text{d}$ ) fosfor. Den optimala startdensiteten för kulturer med *Chlorella* har visat sig vara  $1 \times 10^7$  (celler/ml). Ingen självskuggning förekom vid den densiteten vilket kan vara ett problem i odlingar i

stor skala (Jansson 2011). Mikroalger har i allmänhet ett pH-optimum, för tillväxt och fotosyntes, i det neutrala till alkaliska området (Gehl & Colman 1984).

De dominerande näringssubstanserna i *Chlorella* är protein och kolhydrater men det finns även ett innehåll av många andra hälsomässigt och ekonomiskt viktiga ämnen. De olika ämnena varierar i mängd under olika stadier under tillväxten (Guil-Guerreo & Reboloso-Fuentes 2008). De fleromättade fettsyrorerna är några av de kommersiellt och hälsomässigt viktigaste komponenterna i *Chlorella* och den vanligast förekommande fettsyran i algen är linolsyra (18:2 n-6) (Guil-Guerreo & Reboloso-Fuentes 2008). *Chlorella* innehåller höga halter karotenoider och är framförallt en god källa till den kraftigt antioxiderande karotenoiden lutein (Guil-Guerreo & Reboloso-Fuentes 2008) som enligt Plaza m.fl. (2009) kan vara 2-4 mg/g av biomassans torrsvikt. Lutein är dessutom den vanligaste karotenoiden i *Chlorella vulgaris* (Guil-Guerreo & Reboloso-Fuentes 2008)

**1.11.2 *Haematococcus pluvialis*** är en encellig grönalg och förekommer i tempererade områden över hela världen och hittas ofta i tillfälliga sötvattensamlingar. *H. pluvialis* är framförallt känd för sin att syntetisera den starkt antioxiderande och kommersiellt värdefulla karotenoiden astaxanthin (Plaza m.fl. 2009).

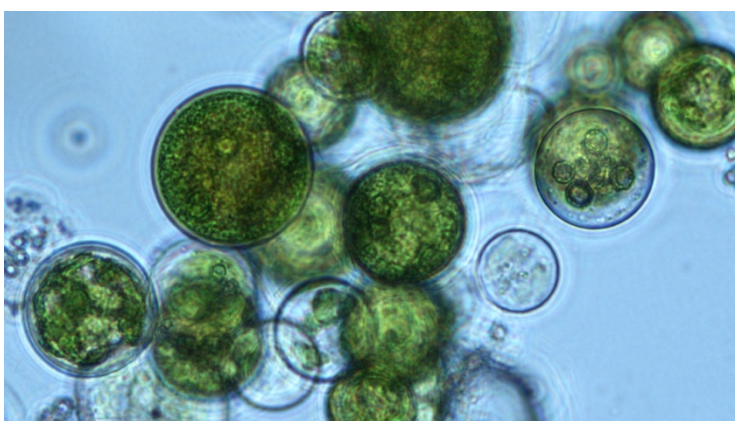


Fig. 2. *Haematococcus pluvialis* i cyststadiet, sett i ljusmikroskop. Egen bild.

*H. pluvialis* är större än *Chlorella* men varierar i

storlek under tillväxten. Under sin livscykel genomgår *H. pluvialis* stora morfologiska förändringar och går från att vara *vegetativ cell* till *aplanospor* (vilket är algens vilstadie). Den vegetativa cellen kan simma med två flageller medan aplanosporen saknar simförmåga. Under utvecklingen ökar algen mycket i storlek

och cellväggen blir kraftigare. Det är i detta skede som algen kan ackumulera stora mängder astaxanthin (Kobayashi m.fl. 1997). Aplanosporerna kan anhopas till en klibbig massa och bilda en hinna på klippor och vass. Detta är en anpassning till habitat som utsätts för hög strålning och torka. När levnadsvillkoren förändras, exempelvis vid regn, kan sporererna gro och bilda nya vegetativa celler (Dahlerus Lehman 2005).

*H. pluvialis* har förmågan att ackumulera astaxanthin då den utsätts för yttre stressfaktorer, så som hög salthalt, låg näringshalt eller stark ljusintensitet (Plaza m.fl. 2009) Halten astaxanthin kan bli upp till 4 % av torrvikten och 95 % av algens totala karotenoidhalt, vilket är det högsta värdet man sett hos samtliga undersökta mikroorganismer och gör *H. pluvialis* till den bäst kända källan för naturligt astaxanthin (He m.fl. 2007).

För astaxanthinproduktion odlas *Haematococcus* i ett tvåstegssystem. Först får algerna tillväxa under odlingsförhållanden nära optimum med noggrann kontroll av näring, pH och temperatur. I nästa steg utsätts algerna som bildat aplanosporer för stress (Lorenz & Cysewski 2000). Ett sätt för *Haematococcus* att börja ackumulera astaxanthin är att under tillväxtfasen belysa kulturen med en lägre ljusintensitet, ca  $30\text{-}40 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , (Kim m.fl 2009) för att i nästa steg öka denna till ca  $100\text{-}140 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (He m.fl. 2007). *Haematococcus* odlas med framgång för astaxanthinproduktion i öppna dammar och i slutna fotobioreaktorer (Dore & Cysewski 2003). I större odlingsystem, som exempelvis öppna dammar, finns en risk för kontaminering av andra mikroorganismer och för att ha kontroll över detta krävs avancerad teknik. Protozoer och amöbor kan vara ett stort problem då dessa äter alger. Vid skörd av *Haematococcus* brukar först algerna avlägsnas från mediet genom sedimentering för att därefter centrifugeras. Därefter centrifugeras cellerna vilket gör dem torra och öppna så att astaxanthinet blir tillgängligt. Man kan även mala aplanosporerna (Lorenz & Cysewski 2000).

*Haematococcus* tål varierande odlingsbetingelser och kan tillväxa i mycket enkla näringsmedium (Dore & Cysewski 2003). Tillväxthastigheten hos algen är mycket låg och många forskningsinsatser har handlat om att försöka öka denna. Även den maximala celldensiteten för algen är låg och stannar vid  $1.5 - 2.5 \times 10^5$  cell/ml



(Cifuentes 2003). *Haematococcus* kan leva under både fototrofa och mixotrofa förhållanden och övergången från vegetativ cell till aplanospor tar flera veckor under autotrofa förhållanden tillsammans med kväve-brist och fosfor-brist i ett medium med acetat som kolkälla. Dock induceras övergången till aplanospor flera dagar tidigare med en högre halt acetat i mediet (Kobayashi 1997). Den optimala temperaturen är mellan 25-30 °C där fotosyntesens maximum är vid 25 °C (Ming m.fl. 2009). I kulturer med *Haematococcus* brukar pH-värdet ligga mellan ca 7,0 – 8,0. Dock verkar det inte finnas siffror på vad som är optimalt för tillväxten (Ming m.fl. 2009), (Cifuentes 2003), (Kobayashi 1997). Det kan bero på att det är många andra faktorer som också spelar in. Yngre kulturer med *H. pluvialis* (4-8 dagar) är känsliga för inblandning av NaCl och dödligheten bland dessa är hög. Äldre kulturer (12-16 dagar) är mer tåliga och ackumulerar mer astaxanthin vid tillsatt NaCl (Cifuentes 2003).

## 2 Material och metod

### 2.1 Mikroorganismer

Försöket genomfördes med *Chlorella vulgaris* CCAP211/11 och *Haematococcus pluvialis* CCAP34/7 som beställdes från CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa) som ligger under SAMS (The Scottish Association for Marine Science) i Skottland (CCAP - SAMS a 2007), (CCAP - SAMS b 2007).

### 2.2 Tillväxtförhållanden

Försöket utfördes i Alnarp som ligger i Skåne, under februari månad, i ett växthus. Dagslängden var 16 h ljus och 8 h natt och juset kom både som solinstrålning och som tillskottsljus från 400 W HPS-lampor. Det tillsatta ljuset mätt i fotosyntetisk aktiv strålning var  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  för *C. pluvialis* och  $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  för *H. pluvialis* där ljuset reducerades av en skuggväv (AB Ludvig Svensson, Kinna, Sweden) Detta var tänkt att vara *H. pluvialis* tillväxtfas som är första steget i ackumuleringsprocessen av astaxanthin. Detta försök begränsar sig till det tillväxtfasen. Solinstrålningen, varav ca 60 % nådde in till odlingskammaren, var under försöksperioden  $553 \pm 83 \text{ Wh/m}^2$  och dygn. Temperaturen i växthuset sattes på  $20^\circ\text{C}$  men kunde variera något under dygnet och på grund av olika väderlek.

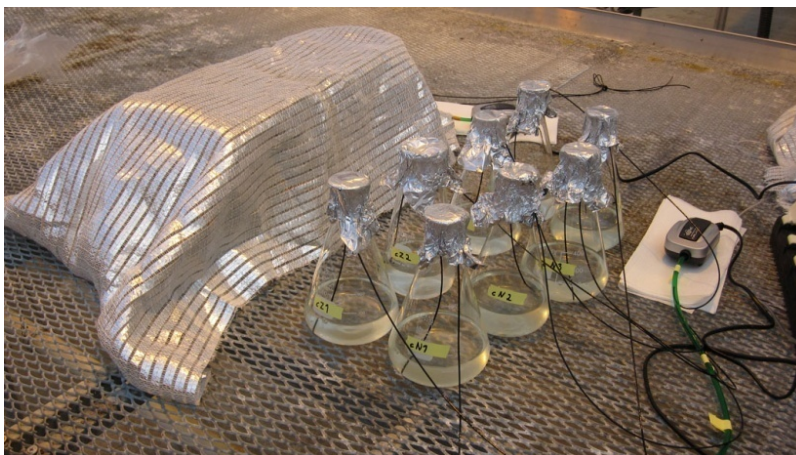


Fig. 3. Uppställning av försöket. *H. pluvialis* under skuggväv och *C. vulgaris* utan väv. Egen bild.

## 2.3 Försöksupplägg

I försöket odlades algerna *H. pluvialis* och *C. vulgaris*, i två näringslösningar. Tillväxten i ett standardmedium för mikroalger; Z8 (Niva 1976) jämfördes med tillväxten i en egenblandad näringslösning som skulle efterlikna näringsberikat överskottsvatten från en växthuskultur med tomat (Hansson 2003). Kvävekällan i näringslösningen var nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) och pH-värdet i båda behandlingarna låg på 6.4 vid start. Z8 näringsinnehåll har ett ca tio gånger så lågt näringsinnehåll som näringslösningen och dessutom är förhållandet mellan de olika ämnena annorlunda (Niva 1976).

Tabell 1. Makronäringsämnen i näringslösningen (inklusive Na) (mg/l).

N	P	K	Mg	S	Ca	Na
520	63.6	442	44.7	88.2	499	99

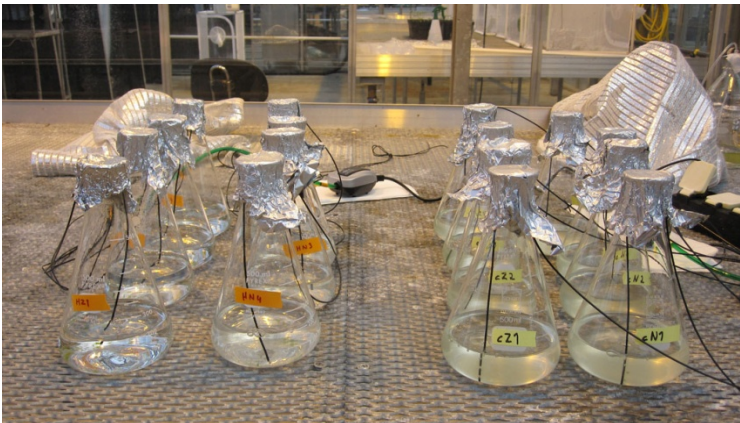
Tabell 2. Mikronäringsämnen i näringslösningen (mg/l).

Cl	Fe	Mn	B	Zn	Cu	Mo
9.23	4.1	1.1	0.1	0.8	0.1	0.1

För varje behandling användes 4 stycken 500 ml E-kolvar med 200 ml lösning i varje. Vid start var densiteten alger i kolvarna  $2,2 \cdot 10^5$  cell/ml för *C. vulgaris* och  $1,4 \cdot 10^3$  cell/ml för *H. pluvialis*. Kolvarna luftades kontinuerligt för omrörning och till detta användes slangar nedsänkta i samtliga prover kopplade till en luftpump. Kulturtiden för *C. vulgaris* antogs vara cirka 7 dygn och för *H. pluvialis* ca 14 dygn. Detta lämnades öppet för förändringar under försökets gång.

## 2.4 Analys av tillväxt

Mikroalgernas tillväxt mättes var 24:e timme genom cellräkning i en haemocytometer i ett ljusmikroskop. Dessutom mättes den optiska densiteten (OD) vid våglängden 405 nm i en spektrofotometer. Mikroalgernas tillstånd undersöktes dagligen genom mikroskopering och genom visuell bedömning av kulturernas färgutveckling.



*Fig. 4. Uppställning av försöket innan väv lades på *H. pluvialis*. Egen bild.*

### 3 Resultat

Resultaten för odling av *Chlorella vulgaris* och *Haematococcus pluvialis* skilde sig mycket från varandra, både i tillväxtfrekvens och i växtsätt. *C. vulgaris* visade på en mycket bättre tillväxt i båda näringslösningarna än *H. pluvialis*.

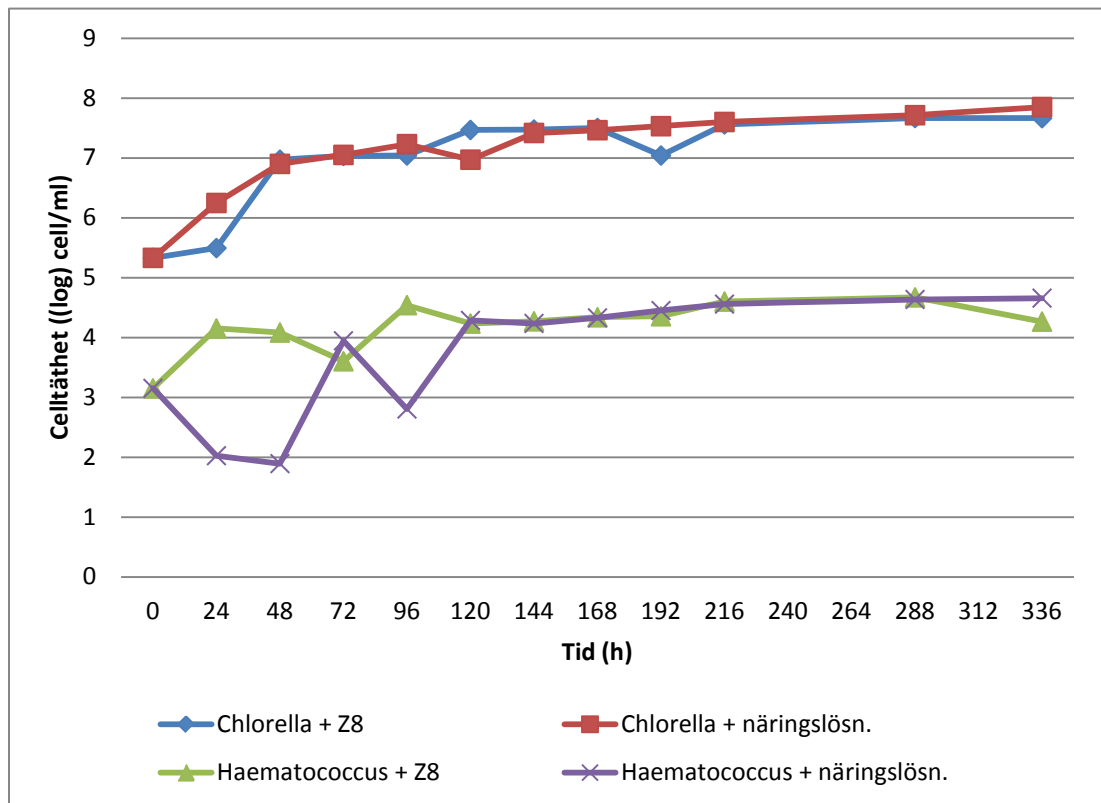


Fig. 6. Tillväxtkurvor för celltäthet mätt i celler/ml (logaritmerade värden) för de olika behandlingarna.

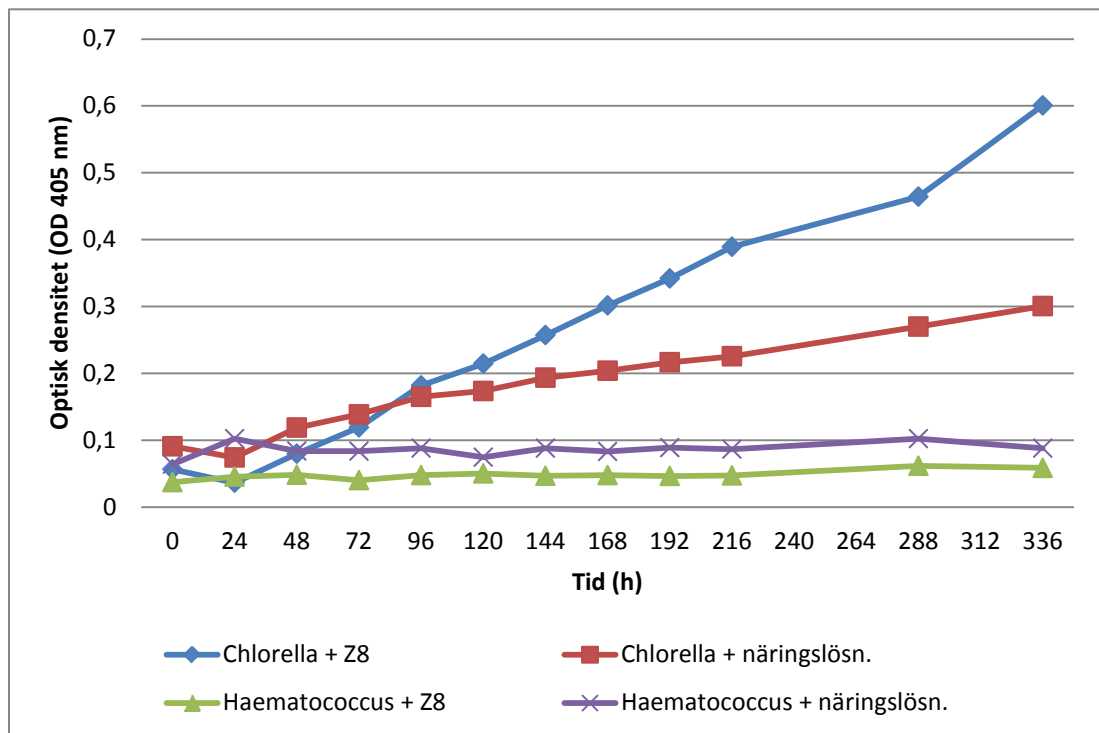


Fig. 7. Tillväxtkurvor mätt i optisk densitet vid 405 nm, för de olika behandlingarna.

### 3.1 *Chlorella vulgaris*

Försöket visar att det går att odla *Chlorella vulgaris* i växthus i de båda näringslösningarna. Kulturerna växte snabbt och redan efter 4 dygn syntes en tydligt tilltagande grön färg i kolvarna med Z8. Den gröna färgen ökade under försökets gång i båda näringslösningarna (fig. 5.).



Fig. 5. Synlig färgskillnad mellan näringslösning och Z8 i kulturer med *C. vulgaris* efter 9 dygn.  
Egen bild.

Celltätheten i de båda behandlingarna ökade under försökets gång för att efter 10 dygn öka något mer i näringslösningen (fig. 6). I tillväxtkurvan för optisk densitet så ökar båda behandlingarna under hela perioden (fig. 7). Dock är ökningen mycket högre i Z8 än i näringslösningen vilket inte stämmer överrens med siffrorna för celldensitet.

Efter 12 dygn kunde man i mikroskop observera att det fanns stora skillnader mellan algernas levnadsstadier i Z8 respektive i näringslösningen. I Z8 var algerna stora, kantiga, stilla och såg ut att ha börjat ackumulera karotenoider vilket är ett tecken på att algerna var i slutet av sin livscykel. Det visade sig att pH-värdet i kolvarna med Z8 efter 12 dygn hade stigit kraftigt och hade ett medelvärde på 9,8. I näringslösningen däremot hade pH-värdet ökat mycket lite och hade ett medelvärde på 6,7. I dessa prover var i stort sett alla alger små och utan antydning till karotenoidackumulering. Även celltätheten visar på en fortsatt tillväxt i näringslösningen. Trots det visar kurvan för optisk densitet (405 nm) i Z8 en märkbart kraftigare ökning än kurvan för näringslösning (fig. 7).

Algerna löste sig bra i båda lösningarna. Däremot löste sig salterna i näringslösningen något sämre och gav lösningen en något ljusare färg än Z8 (fig. 5). Dock lade sig inga salter på botten av kolvarna. I ett av proven med Z8 växte algerna på ett annat sätt än i övriga prover då de istället för att vara jämnt lösta lade sig på botten där de bildade en biofilm. Man kunde även i mikroskop se att cellerna hade klumpat ihop sig. Provet fick ett markant lägre värde, än de övriga i Z8, både i OD och i cell/ml. Detta gjorde att provet inte var representativt för det sammanställda medelvärdet och plockades därför bort.

### 3.2 *Haematococcus pluvialis*

*Haematococcus pluvialis* tillväxte sämre och på ett annat sätt än *Chlorella vulgaris*. I både näringslösningen och i Z8 visade celltätheten på en mycket liten ökning (fig. 6) och i mätningen av optisk densitet (fig. 7) sker ingen ökning alls. Detta trots att man i Z8-kulturerna kunde observera en viss tilltagande grön färg efter 9 dygn (fig. 8) samt

att man i dessa med blotta ögat kunde se att mängden alger i kolvarna ökade under försöksperioden. Dock kunde man aldrig observera någon grön färg i kulturerna med näringslösningen (fig. 8) trots att dessa hade värden som låg strax över Z8 i OD (fig. 7) och följde samma nivå i celltäthet som i Z8 (fig. 6).



Fig. 8. En viss ökning i grön färg efter 9 dygn i Z8 med *H. pluvialis*. Egen bild.

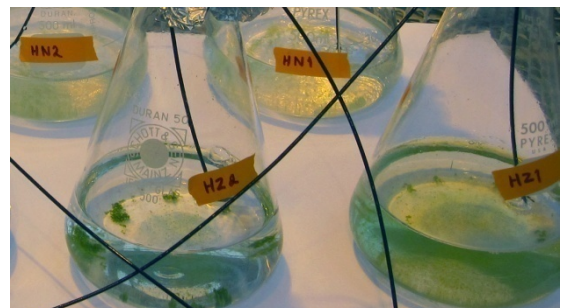


Fig. 9. *H. pluvialis* efter 9 dygn i Z8 och i näringslösning. Egen bild.

*H. pluvialis* löste sig aldrig riktigt i vätskan utan de flesta cellerna låg på botten av kolvarna (fig. 9). I mikroskop kunde man uppskatta att cellerna som löste sig framförallt var alger i det frisimmande vegetativa stadiet medan aplanosporerna, som är stilla och större, främst lade sig på botten. I näringslösningen med *H. pluvialis* löste sig aldrig riktigt salterna och det skedde en utfällning av saltkristaller som kunde observeras i mikroskop. Salterna la sig på botten av kolvarna och gav dessutom lösningen en viss vitaktig ton. Efter 9 dygn såg många av cellerna i näringslösningen kantiga och trasiga ut och endast ett fåtal var i det vegetativa simmande cellstadiet. Samtidigt i Z8 kunde man finna en stor andel av algerna som var i det vegetativa stadiet.

Liksom i kulturerna med *C. vulgaris* hade pH-värdet i Z8 stigit mycket och hade ett medelvärde på 8,4 efter 12 dagar och många av algerna i Z8 fått en rödaktig ton. Samtidigt i näringslösningen låg pH-värdet stabilt med ett medelvärde på 6,3.



## 4 Diskussion

Från detta försök så kan man dra slutsatsen att mikroalgen *Chlorella vulgaris* har potential att tillväxa bra i returvatten från växthusodling, under enkla odlingsförhållanden i växthus. *C. vulgaris* visade sig tåla de höga näringshalterna från näringslösningen vilken hade koncentrationerna (mg/l) 520 nitrat, 63,6 fosfor, 442 kalium och 499 kalcium (tabell 1). För att få en bra näringsreduktion så måste tillväxten vara god (Jansson 2011) och då tillväxten för *C. vulgaris* fortlöpte under hela försöket visar att mikroalgen med fördel går att odla för det ändamålet. *Chlorella* antas vara känslig för ett alltför högt pH då tillväxten i Z8 avstannade efter 12 dygn vid pH 9,8. Reuturvatten har ofta en låg alkalitet (Christensen m.fl. 2010) men eftersom pH-värdet ökar under algens tillväxt, vid upptag av CO<sub>2</sub> och nitratjoner (Larsdotter 2006), så kan man behöva åtgärda detta genom att tillsätta en pH-sänkande syra (Christensen m.fl. 2010). Eftersom kulturtiden för *C. vulgaris* är relativt kort, ca 10 dagar (Chinnasamy 2009), (Jansson 2011), så kanske man bara behöver tillsätta syra vid några få gånger. Eftersom det gick bra att odla *C. vulgaris* i liten skala skulle det vara intressant att odla algen i större system på ett sätt som växthusodlaren kunde använda sig av. Detta skulle kunna ske i större behållare eller i hängande plastfickor (Willemse 2009). Den skördemetod som lämpar sig bäst för *C. vulgaris* är centrifugering, då algerna inte kan vara för mindre än 70 µm vid filtrering och sedimentering (Jansson 2011).

*Haematococcus pluvialis* tillväxte mycket sämre än *C. vulgaris*, framförallt i näringslösningen där man inte kunde se någon ökning i grön färg och där cellerna dessutom såg skadade ut i mikroskop. Det kan bero på utfällningen av salter som skedde i behandlingen och eftersom både algerna och saltet lade sig på botten så kan man inte bortse från att cellerna kan ha saltskadats. Utfällningar av salter är däremot inget vanligt problem som uppstår i riktigt dräneringsvatten förutsatt att inte pH-värdet blir för högt så att fosfor fälls ut som kalciumfosfat (Larsdotter 2006). Det vore därför intressant att göra ett försök där man odlade *H. pluvialis* i ”äkta” dräneringsvatten för att se om algerna tillväxer bättre då det inte förekommer någon saltutfällning.

Att värdet för optisk densitet i *H. pluvialis* konstant var något högre i näringslösningen än i Z8 (fig. 7), trots att de två behandlingarna hade mycket lika värden i kurvan för celltäthet (fig. 8), beror sannolikt på att de utfällda salterna i näringslösningen påverkade den optiska densiteten till att ge ett högre värde. I *C. vulgaris* visar kurvan för optisk densitet i Z8 en kraftigare ökning än kurvan för näringslösning (fig. 7). Detta kan bero på att cellerna i Z8 var större än i näringslösningen trots att de var ungefär lika många, vilket därför gav ett högre värde för optisk densitet.

Det höga pH-värdet som efter 12 dygn uppmättes i kulturer med *C. vulgaris* (pH 9,8) i Z8 antas vara stressfaktorn som ledde till att de stannade upp i sin tillväxt och började ackumulera karotenoider. Eftersom stress ökar karotenoidsyntesen i alger (Chacoón-Lee & González-Mariño 2010) är detta något man skulle kunna styra över för att producera de metaboliterna man vill ha. Stress som till exempel hög ljusintensitet och hög salthalt ökar även lipidsyntesen i *C. vulgaris*. En kombination av fleromättade fettsyror och karotenoider kunde vara intressant i kosttillskott eller i som ingrediens i livsmedel.

Det fanns komplikationer i mätningen av *H. pluvialis* då algen inte löste sig riktigt och koagulerade till klumpar (fig. 9). Enligt observationer var detta något som kunde ske när algen var i aplanosporstadiet vilket syntes tydligt efter ca 14 dagar. Detta gjorde att det var svårt att få upp större klumpar genom den smala pipettspetsen vilket gjorde att mätningarna inte gav representativa värden, varken för optisk densitet eller celldensitet. Trots en synlig ökning i grön färg i Z8 efter 9 dagar (fig. 8), så ökade knappt värdena för celldensitet eller optisk densitet i kulturen. Ett bättre sätt att mäta tillväxten för *H. pluvialis* skulle vara att med jämna mellanrum ta prover, med en grövre pipett, som torkades och där sen torrvikten vägdes.

Vad man hade kunnat förbättra i försöket är dels en bättre omrörning än den luftning med luftpump som användes i försöket. Detta kunde motverka självskuggning av celler i *H. pluvialis* som la sig på botten. En bättre omrörning skulle kunna öka algernas ljusupptag och på så vis påskynda produktionen. Detta är dock en

ekonomisk fråga och i det här försöket var målet att producera alger under enkla odlingsförhållanden som stämmer överens med växthusodlars förutsättningar. En annan förbättring av algodlingarna skulle vara att lösa CO<sub>2</sub> i kulturen vilket dels skulle öka produktiviteten då fotosyntesen gynnas samt sänka pH då löst CO<sub>2</sub> bildar kolsyra. Att tillsätta CO<sub>2</sub> skulle öka produktionskostnaden (Larsdotter 2006) vilket skulle göra det svårare att motivera växthusodlare att odla alger. Ett annat sätt att öka halten kol är att tillsätta en organisk kolkälla i lösningen.

Återanvändning av dräneringsvatten från växthusodling kan kräva en viss kontroll och bearbetning. Exempelvis så måste man vara medveten om att näringsinnehållet varierar under säsongen och kanske måste spädas ut när det är som högs. Då det kan förekomma patogener i dräneringsvatten bör man låta vattnet genomgå en reningsprocess innan man tillsätter algerna. Detta kan exempelvis vara filtrering för att få bort stora protozoer och behandling med UV-ljus som tar död på bakterier. Bearbetning av algbiomassan kräver avancerad teknik. Därför bör mikroalgerna som skördats säljas till ett företag som bearbetar algbiomassa. Beroende på kvalitet och innehåll av metaboliter så kan de säljas olika dyrt och för olika ändamål.

Det har varit svårt att hitta fakta om optimala odlingsbetingelser för mikroalger. Det beror sannolikt på att olika mikroalger kan ha väldigt olika optimala miljöfaktorer och många kan dessutom tåla stora variationer. Detta kan också variera mycket mellan olika stammar inom samma art. Nästa steg i detta projekt, som inte ligger inom ramen för just detta arbete, är att separera biomassan och utreda om det har bildats några värdefulla metaboliter i denna. I *H. pluvialis* kommer möjligheten att producera astaxanthin att undersökas och i *C. vulgaris* kommer fettsyrsammansättningen utredas. Kan produktion av intressant metaboliter konfirmeras kommer odling av dessa alger i större skala i växthus att genomföras.

## 5 Slutsats

I det här försöket undersöktes möjligheten odla mikroalger för att reducera näringshalten i dräneringsvatten. En god näringsreduktion förutsätter en bra biomassaproduktion vilket stämde bäst överens med resultatet för *Chlorella vulgaris*. Det här försöket visar att *Haematococcus pluvialis* kan vara för komplicerad för odling i enklare system. Framtida arbete för att optimera odlingssystemet för mikroalger, inom ramen för växthusodling, bör därför fokusera på *C. vulgaris*. Att odla *C. vulgaris* kan vara ett sätt för växthusodlare som inte har recirkulerande odlingssystem, att ta vara på näringsämnen och samtidigt vinna ekonomiskt genom att sälja vidare biomassan

## 6 Litteraturlista

Axelsson, L, Frick, B, Neselius, T (2010) *Konstruktion av en fotobioreaktor för odling av alger– ett småskaligt försök*. 15 hp, Grund C, Agronom Mark/Växt, SLU – Uppsala.

Barfod E, Fleischer T, Kaspersen S.J., Sandanger Ø, Wennberg A.C. (2008) *Alger på tanken*. Klima 3, 18-19.

Bendich A, Olson J.A. (1989) *Biological actions of carotenoids*. FASEB J 3: 1927-1932.

Bourre J.M. (2005) *Where to find omega-3 fatty acids and how feeding animals with diet enriched in omega-3 fatty acids to increase nutritional value of derived products for humans: what is actually useful?* J Nutr Health Aging 9: 232-242.

Cannon D (2009) *From fish oil to microalgae oil. A win-win shift for humans and our habitat*. Explore 5(5): 299-303.

Cardozo K.H.M., Guaratini T, Barros M.P., Falcão V.R., Tonon A.P., Lopes N.P., Campos S, Torres M.A., Souza A.O., Colepicolo P, Pinto E (2006) *Metabolites from algae with economical impact*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 146 (2007) 60-78.

Carlsson A.S., van Beilen J.B., Möller R, Clayton D (2007) *Micro- and macro-algae utility for industrial applications*. EPOBIO. CNAP, University of York. ISBN 13: 978-1-872691-29-9.

CCAP - SAMS a (2007) Culture Collection of Algae and Protozoa, Strain

Information: 211/11B. Elektroniskt dokument. Tillgänglig:

[http://www.ccap.ac.uk/strain\\_info.php?Strain\\_No=211/11B](http://www.ccap.ac.uk/strain_info.php?Strain_No=211/11B)

Besöktes: 12-03-20

CCAP - SAMS b (2007) Culture Collection of Algae and Protozoa. The Scottish Association for Marine Science. Strain Information: 34/7. Elektroniskt dokument. Tillgänglig: [http://www.ccap.ac.uk/strain\\_info.php?Strain\\_No=34/7](http://www.ccap.ac.uk/strain_info.php?Strain_No=34/7)  
Besöktes 12-03-20.

Chacoón-Lee T.L., González-Mariño G.E. (2010) *Microalgae for “Healthy” Foods—Possibilities and Challenges*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 9: 655-675.

Chinnasamy S, Ramakrishnan B, Bhatnagar A & Das K.C. (2009) *Biomass Production Potential of a Wastewater Alga Chlorella vulgaris ARC 1 under Elevated Levels of CO<sub>2</sub> and Temperature*. International Journal of Molecular Sciences. 2009, 10, 518-532.

Christensen I, Hansson T, Svensson SE (2010) *Gödsling i slutet system i växthus – underlag till utbildningsmodul*. Landskap Trädgård Jordbruk. Rapport 2010:15. ISBN 978-91-86373-22-1. SLU Alnarp.

Cifuentes A.S., González M.A., Vargas S, Hoeneisen M & González N (2003) Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. Biol Res 36: 343-357, 2003.

Dahlerus Lehman G (2005) *Haematococcus pluvialis - en liten men nyttig alg. Månadens kryptogam*. Naturhistoriska riksmuseet. Elektroniskt dokument. Tillgänglig: <http://www.nrm.se/sv/meny/faktaomnaturen/vaxter/kryptogamer/manadenskryptogam/alger/haematococcuspluvialisenlitenmennyttigalg.1474.html>  
Besöktes: 12-03-21.

Gehl K.A. & Colman B (1984) *Effect of External pH on the Internal pH of Chlorella saccharophila*. Plant Physiol. (1985) 77, 917-921.

Guil-Guerreo J.L. & Reboloso-Fuentes M.M. (2008) Nutrient Comosition of *Chlorella* spp. And *Monodus subterraneus* Cultured in a Bubble Column Bioreactor. Food Biotechnology, 22:3, 218-233. <http://dx.doi.org/10.1080/08905430802262541>

Filen hämtades 11-12-21.

Hansson T (2003) *Dräneringsvatten i växthus – uppsamling och användning minskar miljöbelastningen*. GRO konsult AB, Jordbruksverket. Jordbruksinformation 16 – 2003.

Hansson T (2012) Grön kompetens AB <http://www.gronkompetens.se/gem/>  
Personligt meddelande. Framfört: 12-03-19.

He P, Duncan J, Barber J (2007) *Astaxanthin Accumulation in the Green Alga Haematococcus pluvialis: Effects of Cultivation Parameters*. Journal of Plant Biology 2007, 49 (4): 447-451.

Hogg, S (2005) *Essential Microbiology*. John Wiley & Sons, The University of Glamorgan, UK.

Jansson N (2011) *Biologiska behandlingsmetoder för rening av rejektvatten från biogasproduktion*. Linköpings universitet Institutionen för fysik, kemi och biologi. Examensarbetet utfört vid IFM Biologi 2011-06-17.

Jordbruksverket (2008) *Trädgårdsproduktion 2008, The 2008 Horticultural Census* Sveriges officiella statistik, statistiska meddelanden JO 33 SM 0901 korrigerad version 2010-06-01.

Kim Z.H., Lee H.S., Lee C.G. (2009) *Red and Blue photons can enhance the production of astaxanthin from Haematococcus pluvialis*. Algae 24(2): 121-127.

Kobayashi M, Kurimura Y, Kakizono T, Nishio N, Tsuji Y (1997) *Morphological Changes in Life Cycle of the Green Alga Haematococcus pluvialis*. Journal of Fermentation and Bioengineering. Vol. 84, No. 1, 94-97, 1997.

Larsdotter K (2006) *Wastewater treatment with microalgae – a literature review*. Environmental Microbiology, School of Biotechnology, KTH. Vatten 62:31 – 38.

Lorenz R.T. & Cysewski G.R. (2000) *Commercial potential for Haematococcus microalgae as a natural source of astaxanthin*. Tibtech April 2000 (Vol. 18).

Löfkvist K, Hansson T, Svensson S.A. (2009) *Förluster av växtskyddsmedel till omgivande mark och vatten vid användning i svenska växthus – en genomgång av möjliga riskmoment, Losses of pesticides to soil and water from greenhouse uses – an overview of possible risk factors* SLU, LTJ, ISBN 978-91-86197-15-5, rapport 2009:6

Ming W, Tao L, Ai-Fen L, Ning X & Cheng-Wu Z (2009) *Effect of lighting, temperature and pH on photosynthetic characters of Haematococcus pluvialis* CG-11. *Acta Hydrobiologica Sinica* 2009-03

Niva (1976) *Estimation of algal growth potential*. Norwegian Inst for Water Research Publ. D2-25.

Plaza M, Herrero M, Cifuentes A, Ibáñez (2009) *Innovative Natural Functional Ingredients from Microalgae*. *J. Agric. Food Chem.* 57, 7159-7170.

Pufelski N, Aravinthan V, Yusaf T (2010) *How effective is microalgae treatment of nursery wastewater for nutrient removal?* Southern Region Engineering Conference, 11-12 Nov, Toowoomba, Australia. SREC2010-T1-4.

Pulz O, Gross W (2004) *Valuable products from Biotechnology of microalgae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65: 635-648.

Vaikosen S.E., Nwokoro S.O., Orheruata A.M. (2007) *Yield and Chemical Composition of Chlorella Species Cultivated in Pig, Poultry and Cow Dungs in Southern Nigeria*. *ASSET Series A* (2007) 7 (1): 229-235.

Willemsse N (2009) *Marine algae biofuel pilot project launched in the Eastern Cape*. *Engineering News*. 20th March 2009



Zeiler K.G., Heacox D.A., Toon S.T., Kadam K.L., Brown L.M. (1995) *The use of microalgae for assimilation and utilization of carbon dioxide from fossil fuel-fired power plant flue gas*. Energy Convers. Mgmt Vol.36, No. 6-9, pp 707-712.