

Kvanteutbytte og lipidproduksjon i totrinns kjemostat med lys- og CO₂-begrensning

Kjetil Størset



Masteroppgave

Program for marinbiologi og limnologi
Biologisk Institutt
Universitetet i Oslo

1. juni 2011

© Kjetil Størset

2011

Kvanteutbytte og lipidproduksjon
i totrinns kjemostat med
lys- og CO₂-begrensning

Kjetil Størset

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

II

Takk!

til alle dere som har hjulpet meg og støttet meg gjennom alt det harde arbeidet.

Dere er

Tom Andersen for stor tålmodighet, god veiledning og høyt faglig nivå,

Per-Johan Færøvig for oppfølging og støtte på laben og imponerende ingeniørkunst,

Berit Kaasa for hjelp på laben og gode svar på dumme spørsmål,

Dag Klaveness for eminent algekunnskap og reserveveiledning,

Elisabet Størset for inspirasjon, essensielle tilbakemeldinger og unormalt bra skrivehjelp,

Pål Størset for innspill ingen andre kom med og mental støtte,

Lars Nersveen for bra svar og kaffepauser og fjerning av rammer,

Lars Ragnar Skutlaberg for hjelp i grevens tid,

Bustø for at jeg fikk drømme om deg mens det stod på som verst

og alle dere andre som indirekte har fått meg helskinnet gjennom skriveprosessen.

Sammendrag

Globalt er det en stadig økende etterspørsel etter energi. Mest ønskelig er det med bærekraftig og fornybar energi, men lang tid vil sannsynligvis ennå gå før fossile kilder til energi, og da særlig drivstoff, kan erstattes i betydelig grad av mer miljøvennlige kilder.

Mikroalger regnes av flere for å være den eneste kilden til fornybar energi som alene har potensial til å dekke hele verdens etterspørsel etter drivstoff. Likevel er det mange hindringer på veien før kommersiell massedyrking av mikroalger for biodieselproduksjon i stor skala kan starte opp, de fleste økonomisk relaterte. Mange produksjonsledd kan effektiviseres, og et av dem er å oppnå økt utbytte av lipider, som er hovedbestanddelen i biodiesel.

Når mikroalger dyrkes ved vekstvilkår forbundet med stress, som for eksempel mangel på nitrogen, forbindes dette med nedsatt vekstrate. Samtidig forbindes det med økt lipidutbytte. Dette er fordi algene, når de på grunn av substratmangel ikke kan vokse, lagrer overskuddsenergien fra fotosynteseapparatet i form av lipider. En lignende mekanisme ble forsøkt funnet ved å dyrke mikroalger ved CO₂-begrensende vekstvilkår.

Det ble konstruert en totrinns kjemostat for dyrking av mikroalger. I første trinn var forholdene lysbegrensende for vekst, mens CO₂ var begrensende faktor for vekst i andre trinn. Alger ble kontinuerlig pumpet fra første til andre trinn, slik at de først en periode fikk vokse ubegrenset, før de ble utsatt for akutt mangel på CO₂.

Algene ble kontinuerlig overvåket med et system for automatisk logging av lysabsorpsjon, pH og temperatur, og prøver til lipid- og pigmentanalyser ble tatt daglig. For lipidanalyse ble algeprøvene farget med Nile Red, som gir fluorescensrespons ved farging av lipider. Slik kunne utviklingen i de to trinnene sammenlignes.

Det ble ikke funnet noe mønster for økt lipidproduktivitet som følge av behandlingen i kjemostaten. Det ble imidlertid observert andre fenomener, som økt cellemasse, lavere klorofyll a-konsentrasjon og større optisk tverrsnitt.

Innholdsfortegnelse

1	INNLEDNING	1
1.1	Behovet for fornybare energiresurser	1
1.2	Potensialet for akvatisk bioenergiproduksjon.....	2
1.3	Utfordringer for akvatisk bioenergiproduksjon	4
1.4	Maksimal fotosyntetisk utnyttelse av solenergi.....	5
1.5	Maksimalt lipidutbytte.....	6
1.6	Problemstilling og hypotese	7
2	MATERIALER OG METODER	9
2.1	System for dyrking og overvåking av mikroalger	9
2.1.1	Kabinett og reaktorer.....	9
2.1.2	Gjennomstrømningssystem for medium og kultur.....	10
2.1.3	Gjennomstrømningssystem for gass.....	13
2.1.4	Automatisk logging av lysabsorpsjon, pH og temperatur	15
2.1.5	Tidsserier.....	15
2.2	Prøvetakinger underveis	18
2.2.1	Pigmentanalyse i plateleser	18
2.2.2	Celletelling i flowcytometer.....	19
2.2.3	Bestemmelse av lipidinnhold	19
2.3	Prøvetakinger ved avslutning	21
2.3.1	Lysintensitet	21
2.3.2	CO ₂ -flyt.....	21
2.3.3	Kalibrering av pH-elektroder	21
2.3.4	Tørrvekt og CHN-analyse	21
2.3.5	Måling av alkalinitet.....	22
2.4	Statistisk bearbeiding.....	22
2.4.1	Transmisjon.....	22
2.4.2	Absorbans.....	23
2.4.3	Beregnet biomasse underveis	23
2.4.4	Optisk tverrsnitt.....	23
2.4.5	Kvanteeffektivitet.....	24
2.4.6	Konsentrasjon av løst uorganisk karbon	25

3	RESULTATER	26
3.1	Utvikling over tid.....	27
3.1.1	Transmittans	27
3.1.2	pH.....	28
3.1.3	Klorofyll a	29
3.1.4	Cellekonsentrasjon	30
3.1.5	Nile Red som lipidindikator	31
3.1.6	Biomasse	32
3.1.7	Elementsammensetning.....	33
3.1.8	Kvanteeffektivitet.....	34
3.1.9	CO ₂ -flyt, lysintensitet, alkalinitet og løst uorganisk karbon	35
3.2	Relasjoner	36
3.2.1	Respons fra Nile Red relatert til cellekonsentrasjon	36
3.2.2	Respons fra Nile Red relatert til biomasse	37
3.2.3	Spesifikk absorbans relatert til cellekonsentrasjon	38
3.2.4	Spesifikk absorbans relatert til klorofyllkonsentrasjon.....	39
3.2.5	Klorofyll relatert til biomasse	40
3.2.6	Biomasse relatert til cellekonsentrasjon	41
4	DISKUSJON	42
4.1	Likheter og ulikheter mellom nivå 1 og nivå 2	42
4.1.1	Biomasseøkning	42
4.1.2	pH.....	44
4.2	Svakheter ved forsøket	46
4.2.1	Nile Red som lipidindikator	46
4.2.2	Automatisk logging av lysabsorpsjon, pH og temperatur	47
4.2.3	Prøvetakinger underveis	47
4.2.4	Prøvetakinger ved avslutning	48
4.3	Konklusjon.....	48
4.4	Forslag til forsøk.....	48
	Litteraturliste	50
	Appendiks A: Oppskrift på medium	58
	Appendiks B: Java-kode.....	59
	Appendiks C: Protokoll flowcytometer.....	61
	Appendiks D: CHN-analyse.....	62
	Appendiks E: Resultater i tabell.....	63

1 INNLEDNING

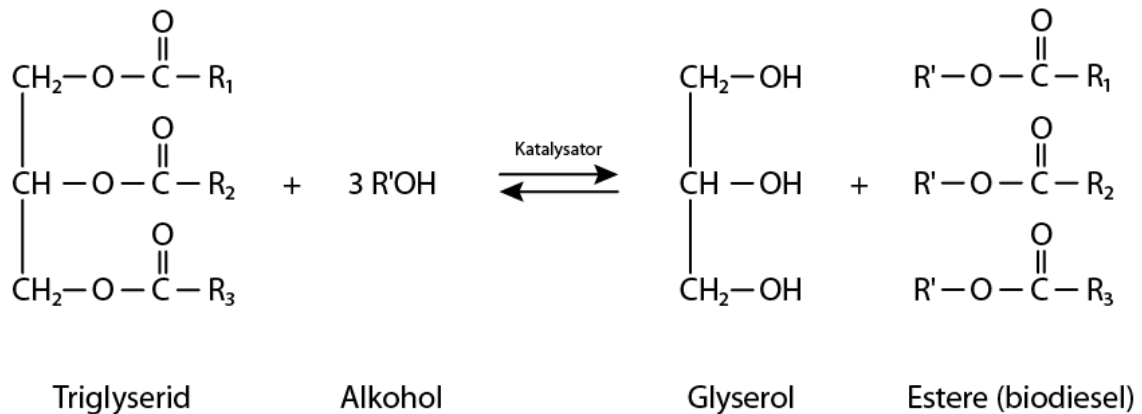
1.1 Behovet for fornybare energiresurser

En av utfordringene verdenssamfunnet står overfor er å kutte ned på og erstatte bruken av fossil energi med bærekraftig, fornybar energi. Dette er ønskelig og/eller nødvendig av flere årsaker: (1) forbrenning av fossile energikilder, som råolje, naturgass og naturlig kull, frigjør tidligere bundet karbon og øker dermed den atmosfæriske konsentrasjonen av CO₂, en viktig bidragsyter til global oppvarming (Hoffert et al., 1993; Kondili og Kaldellis, 2007; Roman-Leshkov et al., 2007), (2) fossile energikilder trenger millioner av år for å bli dannet, og de eksisterende reservoarene vil nødvendigvis tømmes på et tidspunkt ved fortsatt utvinning i samme tempo som nå (Scott et al., 2010), (3) forbrenning av fossile energikilder reduserer luftkvaliteten ettersom partikler og forurensende gasser, som NO_x, SO_x, CO, slippes ut i forbrenningsprosessen (Klass, 1998), (4) det totale globale behovet for energi øker kontinuerlig med befolkningsvekst og økende grad av industrialisering (Hossain et al., 2008), og (5) energisikkerheten vil øke både lokalt og globalt, ettersom tilgangen til energi vil bli mer stabil og forutsigbar ved bruk av ressurser som ofte er lokalt tilgjengelige (Hoogwijk et al., 2003; Yang et al., 2011).

Vann- og vindenergi er eksempler på fornybar energi som i dag utnyttes i stort omfang ved omdanning til elektrisk energi. Elektrisk energi er den dominerende formen for energi på samtlige områder bortsett fra innen transportsektoren (Store Norske Leksikon, 2011), hvor det i all hovedsak forbrennes drivstoff basert på petroleumskilder (Posten og Schaub, 2009).

Biologisk produsert drivstoff (biodrivstoff) har mottatt økende oppmerksomhet og fokus som en bærekraftig, fornybar og miljøvennlig alternativ energikilde (Griffiths og Harrison, 2009; Hu et al., 2008; Posten og Schaub, 2009). Goldemberg (2000) omtaler biodrivstoff som en av de beste kildene til erstatning av petroleumbasert drivstoff. Ved produksjon av biodrivstoff fikseres CO₂ fra atmosfæren gjennom fotosyntese og utligner slik den mengden CO₂ som slippes ut ved forbrenning (Hossain et al., 2008). Gjennom produksjon tillates dessuten lagring av strålingsenergi fra sola, og det ferdige produktet kan benyttes umodifisert i eksisterende motorer (Scott et al., 2010).

Biodiesel er en type biodrivstoff som produseres ved transesterifisering av triglyserid, primært fra raps, kokospalme, soya og solsikke (Ma og Hanna, 1999; Miao og Wu, 2006; Scott et al., 2010), samt fra alger (Spolaore et al.). Ved transesterifisering tilsetter man alkohol til triglyserid og får dannet glyserol og estere (biodiesel), som vist i figur 1.1. Hossain et al. (2008) påpeker at biodiesel er både ikke-toksisk og biologisk nedbrytbart.



Figur 1.1: Ved transesterifisering reagerer triglyserid med alkohol og danner glyserol og biodiesel.

Produksjon av biodiesel fra konvensjonelle landbaserte avlinger er imidlertid forbundet med et behov for store landarealer, som dessuten må være av høy kvalitet. Dette vil ved økt produksjon føre til økt konkurranse om jordbruksarealer og dermed høyere matpriser (Chisti, 2008; Hill et al., 2006; Sims et al., 2010). Dermed reises en etisk problemstilling i en verden hvor FAO i 2010 estimerte antall underernærte mennesker til 925 millioner (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2010).

1.2 Potensialet for akvatisk bioenergiproduksjon

Produksjon av biodiesel basert på mikroalger blir av Zhang et al. (2010) sett på som et bedre alternativ enn produksjon basert på landplanter. Mikroalger har blitt pekt ut som en av de viktigste kildene til biodiesel i framtida (Chisti, 2007; Huntley og Redalje, 2006) og den eneste fornybare oljekilden som har potensial til å dekke den globale etterspørselen av transportdrivstoff (Schenk et al., 2008).

Mikroalger er encellede, eukaryote organismer som driver fotosyntese (Hossain et al., 2008), utbredt i både salt- og ferskvann, individuelt eller i kolonier (Madigan et al., 2000).

Arealbehovet er langt mindre ved dyrking av mikroalger enn landbaserte planter (Scott et al., 2010). Xin et al. (2010) har estimert produksjonspotensialet til å være 15-300 ganger høyere per arealenhet enn for konvensjonelle avlinger, mens Chisti (2008) mener at mikroalgeavlinger kan oppnå inntil 20 ganger høyere produksjon per arealenhet enn den beste oljefrøavling kan. Mikroalger stiller dessuten ingen krav til kvaliteten på landområdene hvor dyrkingssystemer plasseres (Chisti, 2007) og kan i prinsippet utnytte både salt-, brakk- og utløpsvann (Groom et al., 2008; Tsukahara og Sawayama, 2005). En slik industri vil dermed i liten grad verken konkurrere med matindustrien om landarealer eller kreve tilgang på verdifullt ferskvann.

Mikroalger er karakterisert ved vanligvis å kunne drive en mer effektiv fotosyntese enn typiske landbaserte planter (Scott et al., 2010; Shay, 1993). Dermed har de en høyere karbonfikseringsrate og høyere biomasseproduktivitet (Becker, 1994; Gordon og Polle, 2007). Dette er en konsekvens av en relativt lav grad av strukturkompleksitet og et minimalt antall internt konkurrerende fysiologiske funksjoner (Gordon og Polle, 2007; Scott et al., 2010). Mikroalger vokser dessuten i løsningslik slik at både vann og næring er lettere tilgjengelig for dem (Sheehan et al., 1998). Enkelte arter viser en doblingsrate på kun få timer og de fleste på mindre enn et døgn (Chisti, 2007; Scott et al., 2010). Flere arter kan dessuten kultiveres kontinuerlig året rundt (Dismukes et al., 2008; Li et al., 2008; Raja et al., 2008; Williams et al., 2009) fordi de er tilpasset variasjoner i temperatur og lysmengde (Gordon og Polle, 2007).

I tillegg til en høy potensiell vekstrate har mikroalger vist en evne til å syntetisere og akkumulere store mengder lipider (Metting, 1996; Scott et al., 2010). Flere arter har oppnådd en lipidandel av tørrvekt på 50 % til 60 % (Hu et al., 2008; Sheehan et al., 1998). Chisti (2007) rapporterer om enkelte tilfeller med enda høyere lipidandeler, som eksemplene i tabell 1.1 viser. Lipidene som lagres er i all hovedsak i form av triglyserid (Day et al., 1999; Hu et al., 2008). Fordelene med høye lipidnivåer beskrives i avsnitt 1.5.

Mikroalge	Oljeinnhold (% av tørrvekt)
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Chlorella</i> sp.	28-32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16-37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis</i> sp.	25-33
<i>Monallanthus salina</i>	>20
<i>Nannochloris</i> sp.	20-35
<i>Nannochloropsis</i> sp.	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Nitzschia</i> sp.	45-47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20-30
<i>Schizochytrium</i> sp.	50-77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15-23

Tabell 1.1: Oljeandel av tørrvekt i utvalgte mikroalger (Chisti, 2007).

1.3 utfordringer for akvatisk bioenergiproduksjon

Selv om mikroalgebasert biodieselproduksjon er fullt teknisk gjennomførbart (Chisti, 2008), er det ennå ikke blitt kommersialisert i stor skala (Scott et al., 2010). Dette skyldes først og fremst at lipidproduktiviteten må økes ytterligere for å kompensere for de høye kostnadene knyttet til dyrking og høsting (Borowitzka, 1992; Carvalho et al., 2010). Et estimat fra 2003 indikerer at kostnadene er 2-3 ganger høyere ved produksjon av biodiesel enn ved produksjon av drivstoff fra fossile energikilder (Kondili og Kaldellis, 2007).

Mikroalger kan dyrkes enten i åpne bassenger eller i lukkede bioreaktorer. Fordelene med åpne systemer i forhold til lukkede er i all hovedsak økonomiske, med lavere kostnader knyttet til både konstruksjon og drift. Ulempene med åpne systemer relateres til kontroll av både abiotiske (f.eks. lys, temperatur, pH og næring) og biotiske faktorer (f.eks. konkurranse med andre mikroorganismer og kontaminasjon fra patogener). Dette er fordi et åpent system er i direkte kontakt med, og derfor interagerer med, atmosfæren (Carvalho et al., 2010; Scott et al., 2010). Som en motsetning er lukkede bioreaktorer mer kostbare å produsere og drifte, men de tilbyr god kontroll over de nevnte problemene med åpne systemer (Carvalho et al., 2010; Scott et al., 2010).

For ikke å legge beslag på en verdifull ressurs som ferskvann, som kan utgjøre en begrensende faktor for omfattende produksjon (Gressel, 2008), kan det være hensiktsmessig heller å benytte saltvann til kultivering. Dette vil imidlertid begrense valget av arter/stammer til marine mikroalger, men det behøver ikke innebære noen betydningsfull konsekvens, siden mange marine mikroalger har evnen til å akkumulere en høy andel lipider (se tabell 1.1). I tillegg inneholder sjøvann i utgangspunktet flere av de næringsstoffene som er nødvendige for vekst, og Chisti (2008) påpeker at dette begrenser hva som må tilføres vekstmediet til nitrat, fosfat og enkelte mikronæringsstoffer. Det vil dessuten være relativt enkelt å opprettholde en stabil pH i sjøvann på grunn av den i utgangspunktet gode bufferkapasiteten (Barsanti og Gualtieri, 2006).

Konsentrasjonen av CO₂ i luft ligger på rundt 0,035 %, noe som ikke er høyt nok til å forhindre vekstvilkår begrenset av karbon. Scott (2010) hevder at luft med minst 1 % CO₂ i så måte må benyttes og foreslår å transportere inn CO₂ fra for eksempel gasskraftverk. Dersom CO₂ må transporteres inn bør dyrkingssystemer bygges i nærheten av slike CO₂-kilder (Posten og Schaub, 2009).

Det eksisterer veletablerte metoder for høsting av mikroalgeceller (Scott et al., 2010). Det er imidlertid en prosess som er forbundet med høye kostnader på grunn av at celletettheten i en mikroalgekultur generelt er lav, typisk rundt 0,3 - 0,5 g tørrvekt / L (Wang et al., 2008). Den optimale tettheten før videre prosessering er ifølge Ginzburg (1993) på minst 300-400 g tørrvekt / L. Man må med andre ord forvente en oppkonsentrering opp mot 1000 ganger. Dette vil energimessig være en kostnadskrevende prosess, særlig i forbindelse med store produksjonsvolumer. Siden det er essensielt at energien som brukes i produksjon er lavest mulig vil en optimalisering av denne prosessen være viktig (Molina Grima et al., 2003). Å utvikle metoder for å utnytte den gjenværende biomassen etter transesterifisering kan bidra positivt i energiregnskapet (Benemann et al., 1977). Chisti (2008) foreslår for eksempel at avfallsbiomassen, som inneholder energi og majoriteten av nitrogen fra cellene, konverteres til metan og flytende gjødsel ved anaerob nedbrytning.

1.4 Maksimal fotosyntetisk utnyttelse av solenergi

Av energimessige hensyn må dyrking av mikroalger i stor skala utnytte sola som lyskilde til å drive fotosyntesen. Solarkonstanten (den innkommende strålingsenergien på en flate orientert vinkelrett i forhold til sola per areal og tid) er den ultimate begrensende faktor for vekstutbytte. Dette er fordi lys, i motsetning til andre betingede faktorer for vekst, har en øvre fundamental grense for hvor mye som kan tilbys algene. For å oppnå maksimal vekstrate må lys være den begrensende ressursen for vekst, og alt lys som kommer inn i bioreaktoren må bli absorbert av algene.

I en kultur hvor alle plantenæringsstoffer er i overskudd blir lys mindre tilgjengelig dypere ned i kulturen ettersom biomassen og celletettheten øker (Huisman et al., 2002), fordi mikroalgene absorberer lyset og skygger for hverandre. Det blir dermed en lysgradient i dybden, og denne har vist seg å være bratt (Huisman et al., 2002). Lys er derfor ikke en ressurs som er like tilgjengelig for alle alger til enhver tid, slik situasjonen er med næringsstoffer. Ettersom fotontilgjengeligheten for individuelle celler reduseres, vil cellenes vekstrate samtidig avta (Wang et al., 2008). Med økende cellekonsentrasjon bremses vekstraten dermed ned slik at det til slutt oppstår en likevekt med balanse mellom vekst og tap (Phillips og Myers, 1954). Huisman et al. (2002) sier det så enkelt som at fotonfluksen går tom. På grunn av dette er den optimale dybden for et dyrkingssystem kun én til få centimeter (Chini Zittelli et al., 2006).

Det er imidlertid ikke hensiktsmessig å slippe fullt sollys til kulturen. Årsaken til dette er at den spesifikke vekstraten øker med lysintensitet kun opp til et visst nivå, før den deretter avtar ved ytterligere intensitet. Dette er et fenomen kjent som lysinhibisjon (Chisti, 2007), illustrert i figur 1.2. Årsaken til den avtakende vekstraten er at sterkt lys kan føre til biokjemiske skader på det fotosyntetiske apparatet, noe som igjen fører til en mindre effektiv fotosyntese (Gordon og Polle, 2007).

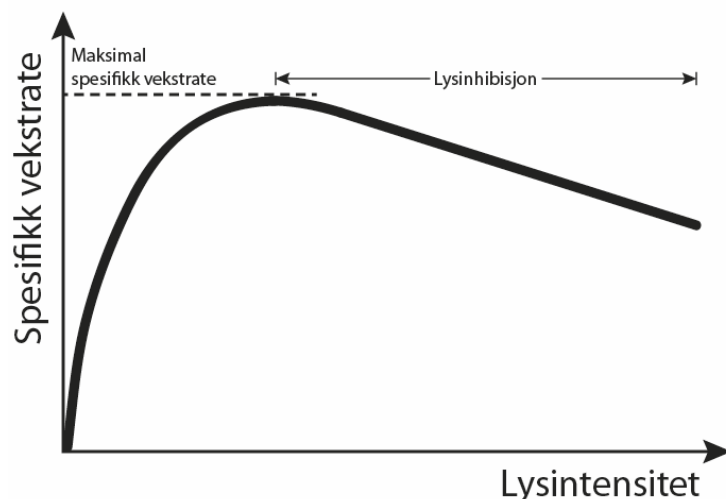
Lysinhibisjon er imidlertid en tidsavhengig prosess som kan motvirkes ved å sørge for at det er turbulens i algekulturen. Da vil algene bli kontinuerlig blandet og fordele mellom seg tiden de tilbringer nær overflaten, hvor eksponeringen for lys er høyest (Scott et al., 2010). Ved å optimalisere denne frekvensen kan mikroalgene jevnlig få korte perioder i mørke områder, så det fotosyntetiske apparatet får tid på seg til å restituere fra eventuell lysinhibisjon (Chisti, 2007).

Algekulturer dyrket under gode lysforhold er for øvrig forbundet med en høyere lipidandel enn kulturer dyrket under dårlige lysforhold (Hu et al., 2008; Liliana Rodolfi et al., 2009).

1.5 Maksimalt lipidutbytte

Hovedkomponentene i mikroalger er karbohydrater, proteiner og lipider, hovedsaklig i form av triglyserid (Day et al., 1999; Hu et al., 2008). Energimessig er lipider den mest ønskede bestanddelen fordi det lagres over dobbelt så mye energi per masseenheter i lipider som i karbohydrater og proteiner (Wang et al., 2008). Derfor vil en maksimering av lipidutbyttet i mikroalger ha stor betydning for lønnsomheten av kommersiell massedyrking.

I fotosyntesens lysreaksjon konverteres innkommende lysenergi til energi i form av



Figur 1.2: Mikroalgers spesifikke vekstrate øker med lysintensitet inntil et visst punkt, som er maksimal spesifikk vekstrate. Lysintensitet over dette medfører lysinhibisjon.

ATP og NADPH. NADPH danner grunnlaget for økning av biomasse ved å tilby reduksjonsenergi for fiksering av CO₂ i Calvin-syklusen, slik at karbohydrat- og proteinsyntese kan finne sted. Denne reduksjonsenergien kan imidlertid også brukes til andre formål, for eksempel til syntese av lipider fra karbohydrater (Gressel, 2008). Mikroalger kan altså bruke reduksjonsenergi både til vekst og lipidsyntese, men det er et dilemma forbundet med at disse prosessene generelt virker antagonistisk på hverandre (Mairet et al., 2010; Scott et al., 2010). Høye lipidnivåer oppnås vanligvis under vekstvilkår forbundet med stress, men samtidig er nettopp stress assosiert med redusert biomasseutbytte (Ratledge, 2002). Det totale lipidutbyttet øker derfor ikke nødvendigvis med økt lipidproduktivitet dersom biomasseproduktiviteten samtidig reduseres tilsvarende.

Det er for eksempel velkjent at mangel på nitrogen, som er nødvendig for proteinsyntese, både reduserer vekstraten og øker lipidproduktiviteten (Khozin-Goldberg og Cohen, 2006; Sobczuk og Chisti, 2010; Pruvost et al., 2009; Liliana Rodolfi et al., 2009). Det underliggende prinsippet er at når proteinsyntese ikke kan finne sted på grunn av nitrogenmangel, vil overflødig karbon fra fotosyntesen i stedet bli kanalisert til lagringsmolekyler, som triglyserid eller stivelse (Scott mfl., 2010). For eksempel dyrket Illman et al. (2000) *Chlorella vulgaris* under forhold med tilstrekkelig næring og fant en lipidandel på mellom 14 % og 30 % av tørrvekten, mens det under forhold med manglende næring ble rapportert av Rodolfi et al. (2009) om en lipidandel på opptil 70 % av tørrvekt. Tilsvarende resultater ble observert av Reitan et al. (1994) i flere andre arter av *Chlorella*.

Det totale utbyttet av lipider avhenger både av konsentrasjonen av biomasse som oppnås og av lipidandelen i de individuelle cellene. En maksimal lipidproduktivitet vil derfor være gitt som et kompromiss mellom disse (Hsieh og Wu, 2009; Lv et al., 2010). Å identifisere balansepunktet dem imellom vil dermed være en nøkkel til å optimalisere produktivitet av triglyserid og dermed av biodiesel (Mairet et al., 2010; Wang et al., 2008).

1.6 Problemstilling og hypotese

Med bakgrunn i at mangel på nitrogen fører til økt lipidsyntese i mikroalger, kan det være naturlig å tenke seg at mangel på CO₂ kan gi en lignende effekt: Dersom det er lite eller ingen CO₂ tilgjengelig for karbonfiksering, vil ikke karbohydrat- og proteinsyntese kunne finne sted i samme grad. Det vil i så fall kunne oppstå et overskudd av reduksjonsenergi fra

fotosyntesens lysreaksjon, som i stedet kan tenkes å bli benyttet til å syntetisere lipider fra karbohydrater. Forfatteren er ikke kjent med noen forsøk med mål å undersøke om det kan eksistere en slik sammenheng. Følgende hypotese framsettes:

Manipulering av CO₂-tilførsel i en algekultur kan øke det totale lipidutbyttet fra mikroalger.

For å undersøke dette nærmere kan mikroalger dyrkes i et gjennomstrømningssystem med to nivåer. Med overskudd av CO₂ og plantenæringsstoffer i første nivå maksimeres vekstraten. Når mikroalgene etter en viss tid føres videre til andre nivå, hvor det er underskudd av CO₂, vil algene bli stilt overfor en akutt mangel på uorganisk karbon. Dersom den overflødige reduksjonsenergien fra fotosyntesen da benyttes til lipidsyntese, kan man se for seg en økning av lipidandelen i mikroalgene.

For gjennomføring av et slikt forsøk må det utformes et system for dyrking av mikroalger i to nivåer slik at man kan sammenligne utviklingen ved stor og liten tilgang på CO₂. Utnyttelsen av lys og CO₂ må overvåkes kontinuerlig, og det må tas kulturprøver underveis for å kunne studere hvordan ulike bestanddeler i cellene utvikler seg over tid. I tillegg bør det av praktiske hensyn benyttes en enkel og samtidig sensitiv metode for lipidanalyse av de to mikroalgekulturene.

2 MATERIALER OG METODER

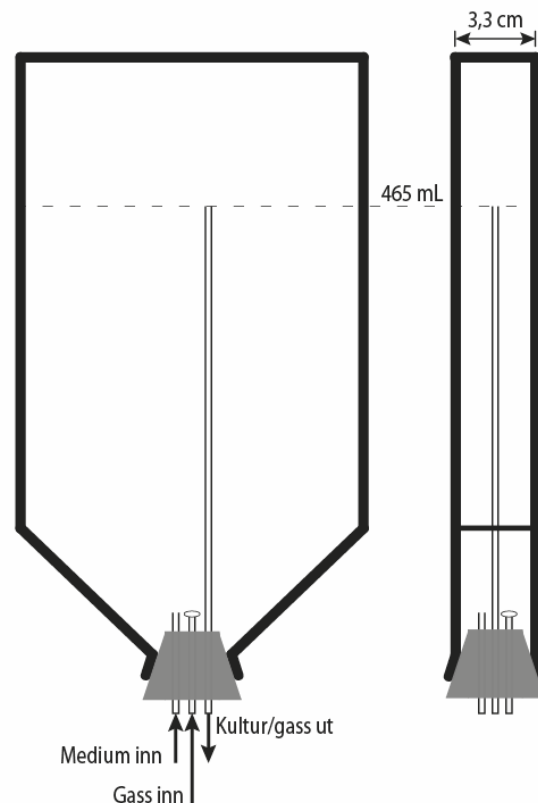
2.1 System for dyrking og overvåking av mikroalger

Det ble konstruert et kjemostatsystem med to nivåer for dyrking av mikroalger. Systemet bestod av et kabinett med to reaktorer for dyrking av mikroalger (se avsnitt 2.1.1), et gjennomstrømningssystem for medium og kultur (se avsnitt 2.1.2), et gjennomstrømningssystem for gass (se avsnitt 2.1.3) og en datamaskin for automatisk logging av transmisjon og pH i de to reaktorene og temperatur i kabinettet (se avsnitt 2.1.4). Hele kjemostatsystemet er skjematisk illustrert i figur 2.5.

2.1.1 Kabinett og reaktorer

To kulturflasker (Nunc 159920 645 mL, non-treated) ble benyttet som reaktorer for dyrking av mikroalger under ulike forhold, hvor første og andre nivå fikk henholdsvis høy og lav tilgang til CO₂ (heretter kalt nivå 1 og nivå 2). Kulturflaskene ble montert med åpningen ned i et stativ, som ble bygget inn i en kommersiell vinkjøler. Vinkjøleren fungerte som et temperaturstabiliserende kabinett og var stilt inn på 18° C. Som lyskilde til å drive fotosyntesen i mikroalgene ble fire lysrør (Osram L 18W/840 Active Daywhite) montert vertikalt og orientert normalt på reaktorene. For å unngå at lysrørene påvirket temperaturen i systemet ble de plassert utenfor glassdøra til kabinettet.

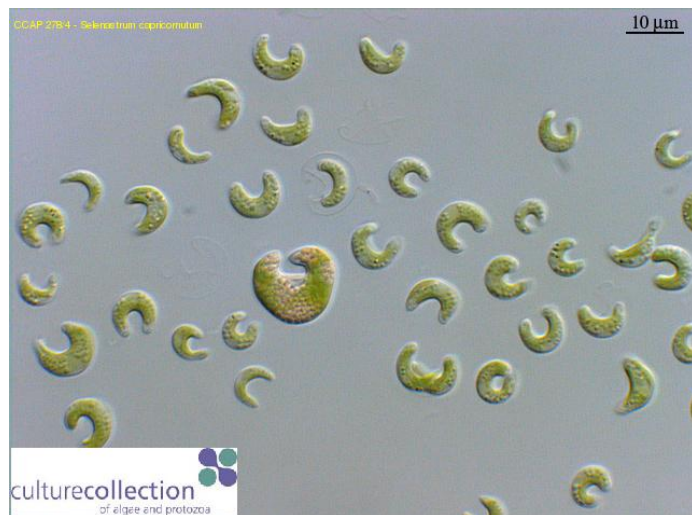
Kulturflaskenes geometri (store og identiske flater foran og bak, se figur 2.1) var ment å forenkle beregningene relatert til mikroalgens absorpsjon av lys.



Figur 2.1: Kulturflaske montert med åpningen ned. Tre glassrør er festet gjennom korken og sørger for tilførsel og utløp for næring og gass. Glassrøret for utløp ble montert i en høyde som tilsvarte det ønskede volumet (465 mL) av algekultur.

All væske og gass som ble forflyttet i systemet gikk gjennom glassrør eller silikonslanger. Pumping av væske og gass ble drevet av peristaltiske pumper av typen Cole-Parmer Masterflex med L/S 13 Precision pump tubing (Cole-Parmer Instrument Company, Vernon Hills, Illinois, USA).

Gjennom korken til hver kulturflaske ble det festet tre glassrør. Glassrørene utgjorde eneste kommunikasjonsveier mellom kulturen og omgivelsene og tjente hvert sitt formål: (1) inngang for næringsmedium, (2) inngang for gass, og (3) utløp for kultur og gass. Ved et kulturvolum på 465 mL fungerte sistnevnte som utløp for gass, mens det ved et høyere væskevolum sørget for at overflødig kultur forlot reaktoren (se figur 2.1). Kulturflaskene ble fylt med 465 mL næringsrikt medium (Huisman et al., 2002), se appendiks A. Deretter ble mediet inokulert med grønnalgen *Selenastrum capricornutum* Printz (se bilde 2.1) fra en NIVA-kultur som opprinnelig ble isolert av Olav Skulberg i 1959 og først beskrevet i Skulberg (1964). Årsaken til at denne algen ble valgt er at den er enkel å dyrke og relativt robust, egenskaper som er attraktive i denne sammenhengen.



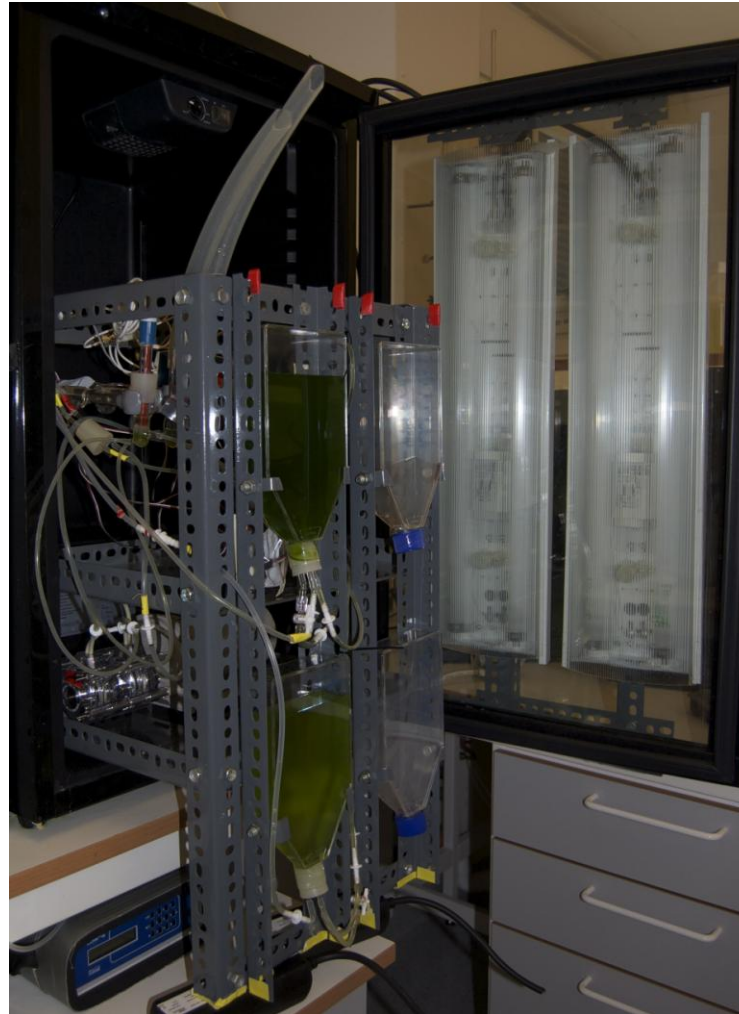
Bilde 2.1: *Selenastrum capricornutum* Printz. Bildet er hentet fra Culture collection of algae and protozoa

2.1.2 Gjennomstrømningssystem for medium og kultur

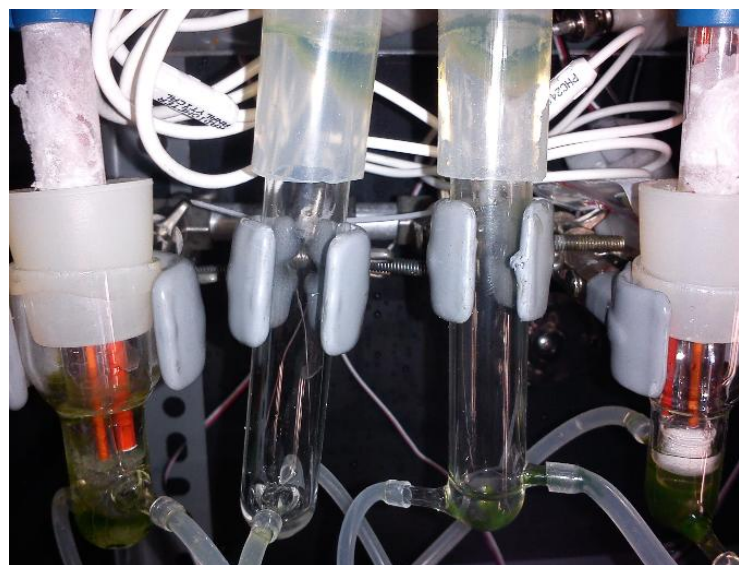
Det ble pumpet 300 mL friskt medium til nivå 1 hvert døgn, fordelt over en kort periode hver tredje time. Til å kontrollere pumpen ble det brukt en elektrisk timer som satte på strøm i jevne intervaller. Friskt medium ble lagret i en 2 L flaske som var koblet til inntaket for medium i nivå 1. Det ble etterfylt medium i flasken ved behov. Etersom tilsvarende væskevolum som ble pumpet inn i kulturen samtidig kontinuerlig ble ført ut, medførte denne metoden en døgnlign utskiftning av ca. 2/3 av kulturen i nivå 1.

Utløpet fra nivå 1 var koblet til en gassfelle for å skille utgående gass fra utgående kultur. Derfra ble kulturen pumpet forbi et punkt for automatisk logging av pH-verdi og videre inn i nivå 2. På den måten ble det hvert døgn overført 300 mL kultur fra nivå 1 til nivå 2. I prosessen endret vekstvilkårene seg plutselig for mikroalgene – fra høy tilgang til CO₂ i nivå 1 til lav tilgang til CO₂ i nivå 2 (se avsnitt 2.1.3). Det var derfor forventet en differanse også i pH i de to nivåene. Andre faktorer med potensiell påvirkning på vekst ble forsøkt holdt likt for de to nivåene.

Kulturvolumet ble holdt konstant i nivå 2 på samme måte som beskrevet for nivå 1. Overflødig kultur ble ført via en gassfelle og forbi et punkt for automatisk logging av pH, før kulturen ble ført ut av systemet til en flaske som samlet opp utløp. Denne flasken ble tømt ved behov og veid daglig for å holde kontroll med hvor mye medium som ble

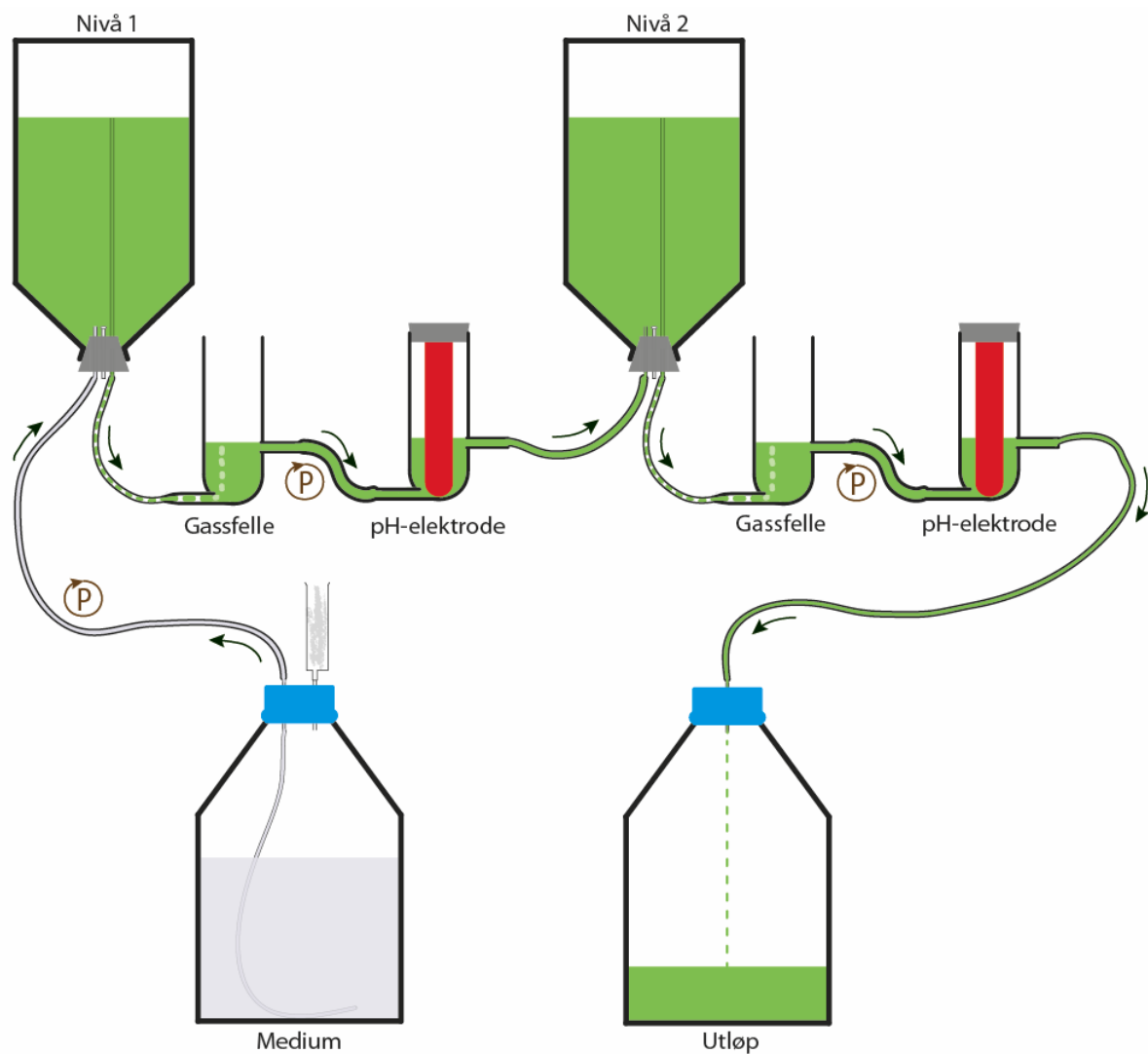


Bilde 2.2: Stativ med kulturflasker trukket ut av kabinettet. Lysrør er montert bak glassdøra til kabinettet.



Bilde 2.3: Gassfeller og pH-elektroder.

ført inn i og gjennom systemet i løpet av hvert døgn. Se figur 2.2 for en skjematisk illustrasjon av systemet for gjennomstrømming av medium og kultur.



Figur 2.2: Gjennomstrømningssystem for medium og kultur. Punkter for pumping er markert med P, pilene markerer retning for gjennomstrømning. Totalt 300 mL medium ble daglig pumpet inn i nivå 1. Herfra ble kultur overskytende 465 mL ført ut via et glassrør og gjennom en gassfelle som skilte gass fra væske. Kulturen ble så pumpet forbi en pH-elektrode for logging og deretter inn i nivå 2. En tilsvarende mekanisme foregikk i og etter nivå 2, før den utgående kulturen fra nivå 2 endte opp i et utløp som ble veid og tømt daglig. Systemene for gjennomstrømning av gass og for automatisk logging er ikke vist (se henholdsvis figur 2.3 og 2.4).

2.1.3 Gjennomstrømningssystem for gass

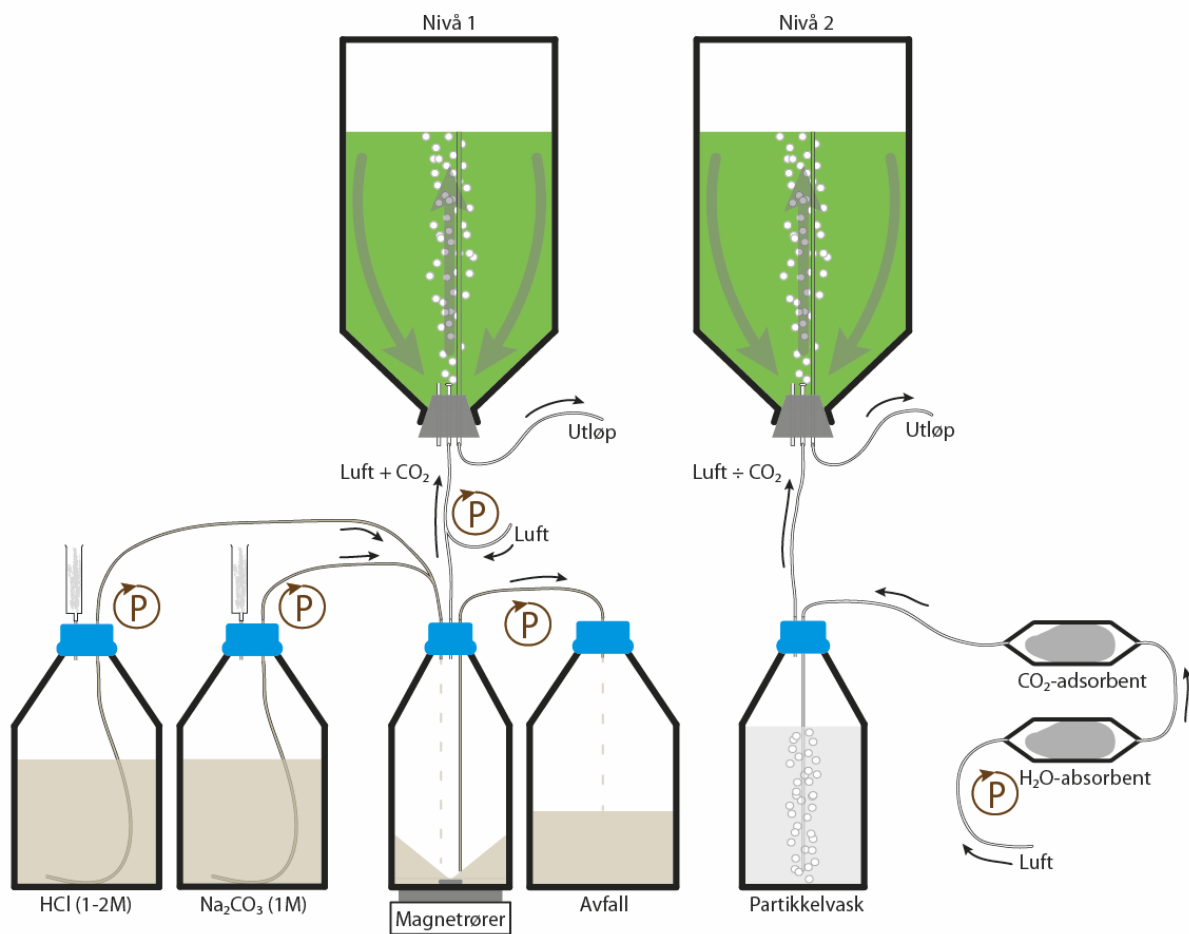
To løsninger med henholdsvis HCl (1-2 M, se tabell 2.1) og Na₂CO₃ (1 M) ble kontinuerlig pumpet over til en felles reaksjonsflaske. Løsningene ble hurtig blandet ved hjelp av en magnetrører, og CO₂ ble dannet etter reaksjonsligning (1).



Natriumklorid og vann fra reaksjonen ble kontinuerlig pumpet ut av flasken som avfall slik at reaksjonsflasken holdt konstant væskevolum. Nydannet CO₂ ble pumpet fra flasken inn i utgående silikonslange, hvor luft fra omgivelsene ble blandet med gassen. Årsaken til dette var å unngå en for høy konsentrasjon av CO₂ for mikroalgene. Gassblandingen ble så pumpet med en hastighet på 1,5 dm³ / min gjennom glassrøret for gasstilførsel i nivå 1 og gjennom en sinter før det boblet gjennom kulturen.

Nivå 2 ble kontinuerlig tilført CO₂-fri luft i samme hastighet som nivå 1 ble tilført CO₂-anrikt luft. Dette ble oppnådd ved å pumpe luft fra omgivelsene gjennom to glassbeholdere fylt med henholdsvis en H₂O-absorbent (magnesiumperklorat, Mg(ClO₄)₂) for å fjerne luftfuktighet og en CO₂-adsorbent (Ascarite II, Sigma-Aldrich, varenr. 223913-100G) for å fjerne CO₂. Den gjenværende gassen ble sendt gjennom en gassvaskeflaske med vann for å fange eventuelle partikler og for å gjenopprette luftfuktigheten. Deretter ble gassen pumpet gjennom glassrøret for gasstilførsel i nivå 2 og gjennom en sinter før det boblet gjennom kulturen.

Tilførselen av gass tjente to hensikter i begge nivåer: (1) å tilføre henholdsvis CO₂-anrikt og CO₂-fri luft, og (2) å skape turbulens i kulturene ved å danne en oppstrøm midt i reaktorene, med en påfølgende nedstrøm langs kantene. På den måten ble kulturene kontinuerlig blandet for å unngå lysinhibisjon og at algene sank og hopet seg opp i bunnen av kulturflaskene. Gjennomstrømningssystemet for gass er illustrert i figur 2.3.

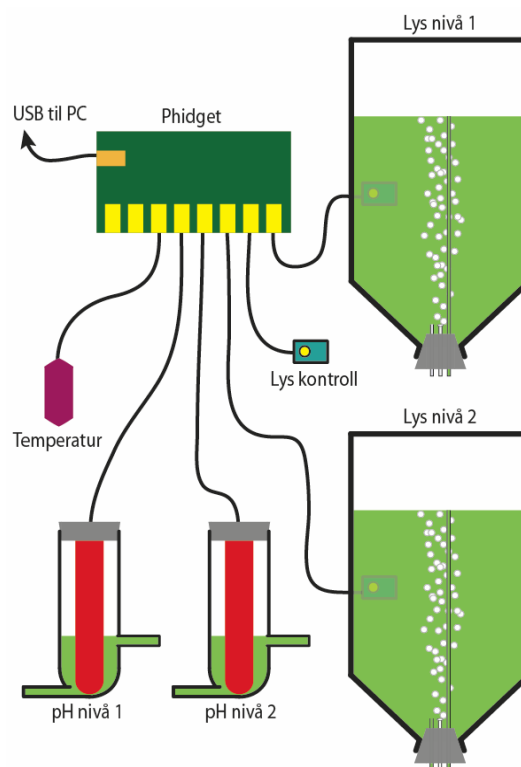


Figur 2.3: Gjennomstrømningssystem for gass. Punkter for pumping er markert med P, pilene markerer retning for gjennomstrømning. HCl (1-2 M) og Na₂CO₃ (1 M) ble pumpet til en flaske og blandet. Nydannet CO₂ ble pumpet ut, blandet med luft og inn i nivå 1, mens vann og salt kontinuerlig ble pumpet ut som avfall. Samtidig ble luft pumpet gjennom to kamre med henholdsvis H₂O-adsorbent og CO₂-adsorbent, vasket i vann for eventuelle partikler og deretter ført inn i nivå 2. Overflødig gass fra begge nivåer ble ført ut gjennom utløp. Systemene for gjennomstrømning av medium og kultur og for automatisk logging er ikke vist (se henholdsvis figur 2.2 og 2.4).

Pilene markert i kulturene indikerer hvordan gassen som ble pumpet inn skapte turbulens og ga en oppstrøm i midten og nedstrøm langs kantene.

2.1.4 Automatisk logging av lysabsorpsjon, pH og temperatur

Det ble benyttet en phidget (I/O board 8/8/8, Phidgets Inc., Calgary, Alberta, Canada) for automatisk logging av lysabsorpsjon, pH og temperatur. Kortet var tilkoblet via USB til en datamaskin og ble herfra kontrollert av et program kodet i Java (se kode i appendiks B). Kortet hadde åtte analoge innganger, hvorav seks ble benyttet: (1) måling av lysintensitet bak nivå 1, (2) måling av lysintensitet bak nivå 2, (3) kontrollmåling av lysintensitet direkte foran lyskilden, (4) pH i kultur fra nivå 1, (5) pH i kultur fra nivå 2, og (6) temperatur i kabinettet. Lysmålerne returnerte relative verdier mellom 0 og 1000. Det viste seg å være nødvendig å dempe lysintensiteten de mottok for å unngå metning med kontinuerlige verdier på 1000. Dette ble utført ved å feste papir foran sensorene. Samtlige verdier ble logget hvert 10. sekund og lagret til fil hvert 15. minutt. Se figur 2.4 for skjematisk illustrasjon av oppsettet.



2.1.5 Tidsserier

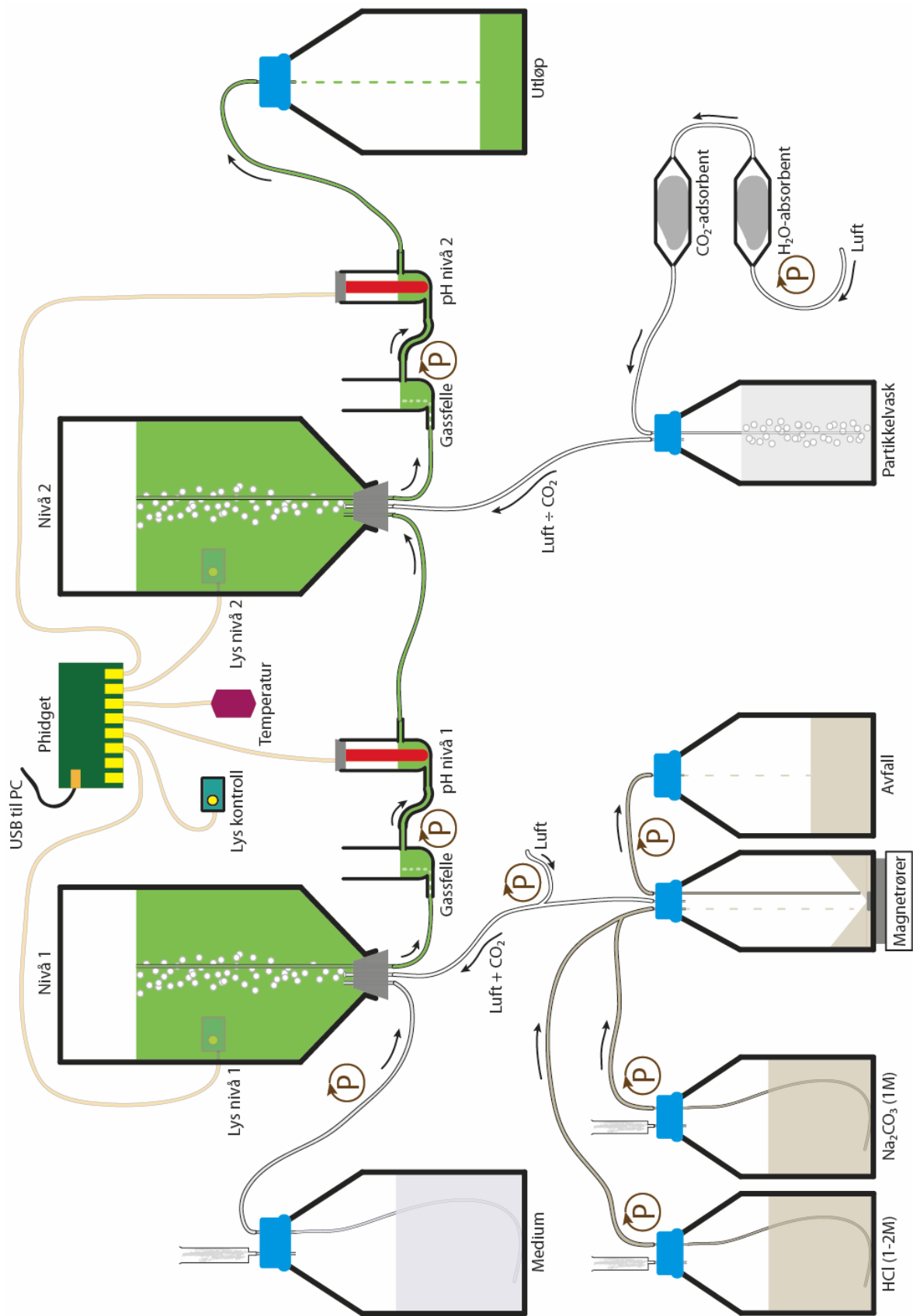
Det ble gjennomført tre tidsserier, som heretter blir referert til som serie 1, serie 2 og serie 3. De tre seriene var ulike på to områder: (1) varighet og (2) konsentrasjon av HCl til CO₂-produksjon (se tabell 2.1).

Avgjørelsen om når seriene skulle avsluttes ble tatt underveis, med grunnlag i de loggede lysintensitetsmålingene, som ga et inntrykk av hvor tette kulturene var på ethvert tidspunkt. En oversikt over ulikhetene mellom tidsseriene er presentert i tabell 2.1.

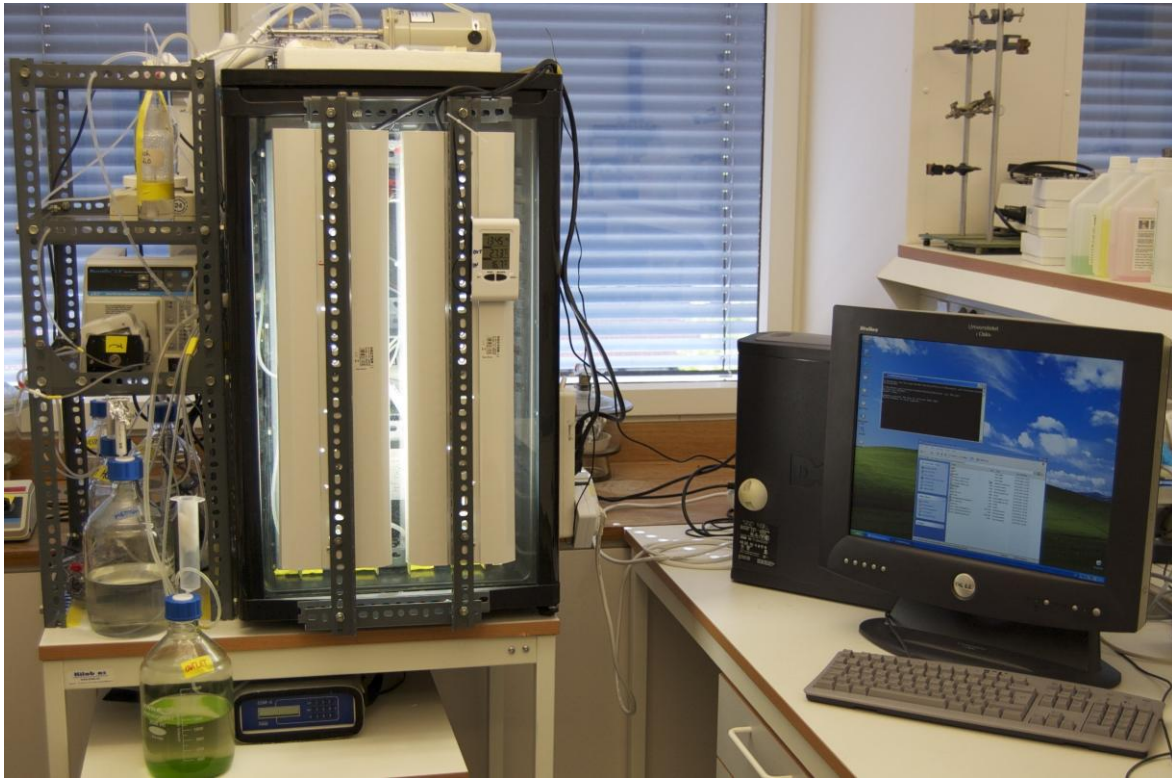
Figur 2.4: Phidget koblet via USB til en PC og til de seks målepunktene: Lys bak nivå 1, lys bak nivå 2, lys direkte foran lyskilden, pH i nivå 1, pH i nivå 2 og temperatur i kabinettet. Alle verdier ble logget hvert tiende sekund.

Serie	Varighet	Konsentrasjon, HCl
1	12 døgn	1,0 M
2	8 døgn	1,2 M
3	7 døgn	2,0 M

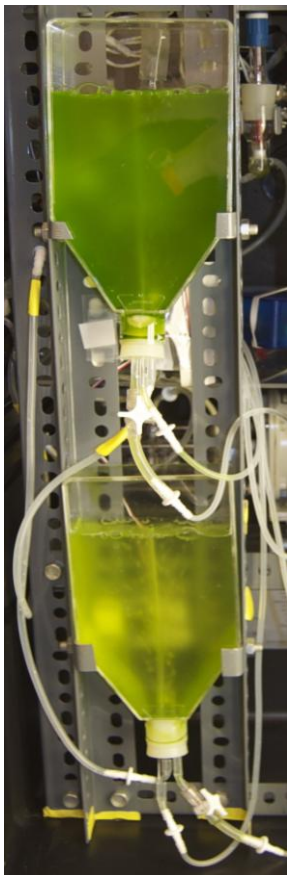
Tabell 2.1: Oversikt over konsentrasjon av HCl og varighet for de respektive serier.



Figur 2.5: Skjematisk illustrasjon av kjemostatsystemet i sin helhet. Se figurene 2.2, 2.3 og 2.4 for en mer detaljert beskrivelse av underordnede systemer for henholdsvis gjennomstrømming for kultur og næring, gjennomstrømming for gass og automatisk logging.



Bilde 2.3: Oversikt over hele systemet.



Bilde 2.4: Nivå 1 øverst, nivå 2 nederst.



Bilde 2.5: Kabinettet med åpen dør. De to kulturflaskene til høyre ble aldri benyttet.

2.2 Prøvetakinger underveis

Det ble tatt ut prøver fra begge nivåer daglig for alle tre serier, bortsett fra én dag i serie 2. Prøvetakingen ble utført ved hjelp av en 10 mL sprøyte koblet sammen med en silikonslange med volum 0,5 mL. Sprøyten og slangen ble fylt med 5,5 mL medium og 5 mL luft, og innholdet ble injisert til nivå 1 via et tilkoblingspunkt i gjennomstrømningssystemet for medium og kultur. Årsaken til injisering av luft etter medium var å sikre at hele volumet av medium forlot silikonslangen og entret kulturen. Noen sekunder senere ble 5,5 mL kultur trukket ut med samme sprøyte. Prosessen ble deretter gjentatt for nivå 2. Om lag 1,2 % av kulturen i hvert nivå ble således daglig skiftet ut med medium, som et tillegg til utskiftingen beskrevet i avsnitt 2.1.2. Sprøyten ble grundig skyllet i friskt medium mellom hver prøvetaking.

Prøver på totalt 5,5 mL kultur fra hvert nivå ble fordelt i tre rør: (1) 150 μ L til pigmentanalyse i plateleser (se avsnitt 2.2.1), (2) 500 μ L til celledelling i flowcytometer (se avsnitt 2.2.2), og (3) ca. 4,85 mL til bestemmelse av lipidinnhold (se avsnitt 2.2.3).

2.2.1 Pigmentanalyse i plateleser

Det ble undersøkt konsentrasjon av klorofyll a i alle prøver fordi denne parameteren kan brukes som indikator på biomasse og lysabsorpsjonseffektivitet. En daglig prøve med 150 μ L kultur fra hvert nivå ble tilsatt 1,4 mL etanol til et totalvolum på ca. 1,55 mL. Prøvene ble deretter plassert i fryseskap og oppbevart ved -30° C inntil alle seriene var avsluttet.

Det ble brukt en blank brønnplate (Becton Dickinson) med 96 brønner á 300 μ L til å måle konsentrasjon av klorofyll a i alle prøvene. Brønnplaten ble analysert i en plateleser (Synergy Mx, BioTek, Winooski, Vermont, USA) for fluorescens ved 665 nm etter eksitasjon ved 430 nm, med avlesing nedenfra. Bølgelengdene som ble benyttet er tilknyttet absorpsjonsmaksimum for klorofyll a.

På grunnlag av observert fargeintensitet på prøvene ble varierende volumer fordelt i brønnplaten. Hensikten med dette var å utjevne konsentrasjonen av klorofyll a mellom prøvene, slik at ingen av dem gikk utenfor skalaen til plateleseren. Grad av fortykning ble senere korrigert for. Tabell 2.2 oppsummerer hvor mye volum som ble tatt ut og på hvilket grunnlag.

<u>Fargeintensitet</u>	<u>Tilsatt kultur</u>	<u>Tilsatt etanol</u>	<u>Totalt volum</u>
Ingen farge, svakt synlig	300 µL	-	300 µL
Moderat synlig	150 µL	150 µL	300 µL
Sterkt synlig	100 µL	200 µL	300 µL

Tabell 2.2: Oversikt over kriterium for uttynning av prøver for analyse av klorofyll a.

Resultatene fra plateleseren ga et relativt mål på daglig konsentrasjon av klorofyll a i begge nivåer. For å kunne beregne absolutt konsentrasjon av klorofyll a ble en klorofyllstandard (Chlorophyll a from spinach, Sigma-Aldrich, varenr. C5753) med kjent konsentrasjon på 10 mg/L fortynnet med etanol i et forhold på 1:49, og av dette ble 300 µL pipettert til fire brønner.

2.2.2 Celletelling i flowcytometer

Celletettheten ble undersøkt i alle prøvene i flowcytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA). Celletettheten er grunnlaget for å estimere innholdet per celle av andre målte faktorer, i tillegg til at det ga en indikasjon på celledelingsraten i de respektive nivåer.

En daglig prøve med 500 µL kultur fra hvert nivå ble fiksert i 10 µL glutaraldehyd (solution 50% EM Grade, AppliChem, varenr. A3166) og deretter plassert i kjøleskap og oppbevart ved 4° C inntil alle seriene var avsluttet. Prøvene ble deretter sendt til analyse i flowcytometer (se appendiks C).

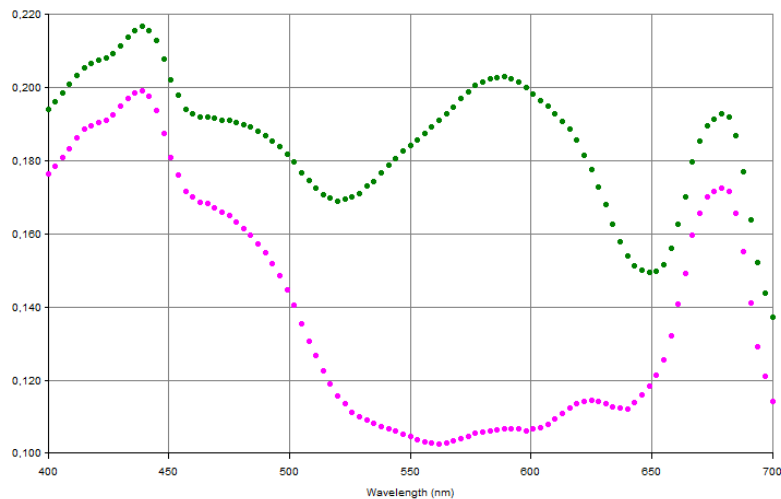
2.2.3 Bestemmelse av lipidinnhold

En tradisjonell metode for måling av lipidinnhold i celler er beskrevet i Bligh og Dyer (1959). Denne metoden er imidlertid tidkrevende, og det ble derfor gjennomført en analyse basert på metoden beskrevet i Chen et al. (2009). Her skildres bruk av fargestoffet Nile Red (Sigma-Aldrich, varenr. N3013) som indikator på lipidmengde ved hjelp av fluorescensmåling i plateleser.

En daglig prøve med ca. 4,85 mL kultur fra hvert nivå ble sentrifugert ved 2000 rpm i 10 minutter ved 20° C, og overflødig væske ble forsiktig helt av. Sentrifugerørene med kultur ble veid før sentrifugering og etter at overflødig væske var fjernet for å kunne beregne hvor mye prøvene ble oppkonsentrert i prosessen. Deretter ble de plassert i fryseskap og oppbevart ved -30° C inntil alle seriene var avsluttet.

Før videre analyse ble prøvene fortynnet i vann (se kapittel 4 for diskusjon) for å oppnå omtrent samme celleantall per volumenhet. Individuell fortynning av hver prøve var basert på resultatene fra celledelling i flowcytometer (se avsnitt 2.2.2). Deretter ble to replikater á 225 µL fra hver prøve pipettert til en sort brønnplate (Becton Dickinson) med 96 brønner á 300 µL. Hver brønn ble tilsatt 75 µL DMSO (dimetylsulfoksid C₂H₆OS) og iblandet Nile Red med en sluttkonsentrasjon etter sammenblanding med kultur på 1 µg / mL.

Platen ble analysert for fluorescens i plateleser (Synergy Mx, BioTek, Winooski, Vermont, USA) for fluorescens ved 575 nm etter eksitasjon ved 430 nm, med avlesing ovenfra. Grunnet valg av bølgelengder var en sammenligning av absorpsjonsspektrene til alger med Nile Red og alger uten Nile Red, som vist i figur 2.6.



Figur 2.6: Absorpsjonsspektrum for henholdsvis alger med Nile Red (grønn) og alger uten Nile Red (rosa).

2.3 Prøvetakinger ved avslutning

2.3.1 Lysintensitet

Responser fra lyssensorene i loggingssystemet ga ikke noe mål på faktisk lysintensitet som bestrålet algekulturene. Lysintensitet ble målt i mol fotoner per areal og tid ved hjelp av en lysmåler (LI-1000, LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA) ved fire vertikalt jevnt fordelte punkter bak hvert nivå. Dette ble gjort både bak kulturflasker med tett kultur og med kun medium. I utgangspunktet var det ønskelig med flere målepunkter, men stativet kulturflaskene var festet i vanskeliggjorde målinger langs kanten av flaskene. Lysintensitetsmålingene var nødvendige for å kunne beregne kvantutbyttet for fotosyntesen i algene (forholdet mellom antallet fikserte karbonatomer og antall absorberte fotoner). Arealet av fronten på algekulturene ble målt, det vil si størrelsen på mikroalgeflaten som var orientert normalt på lyskilden.

2.3.2 CO₂-flyt

Det ble brukt en CO₂-måler (EGM-4, PP Systems, Amesbury, Massachusetts, USA) til å undersøke hvor høy CO₂-konsentrasjon det var i gassen som passerte gjennom systemet ved tre punkter: (1) inn i nivå 1, (2) ut av gassfellen tilknyttet nivå 1, og (3) ut av gassfellen tilknyttet nivå 2.

2.3.3 Kalibrering av pH-elektroder

To bufferstandarder med kjente pH-verdier på henholdsvis 7 og 10 ble benyttet til å kalibrere begge pH-elektrodene, det vil si undersøke hvilken verdi de logget i løsninger med kjent verdi. Ut fra dette kunne alle de loggede verdiene omregnes til pH-skala.

2.3.4 Tørrvekt og CHN-analyse

Ved avslutning av hver serie ble tørrvekt per volumenhet bestemt for tre replikater á 5 mL kultur per nivå. Dette utgjorde totalt 18 målinger. Prøvene ble filtrert gjennom mikrofiberfiltre (Whatman FG/C 25 mm Ø, varenr. 1825-025) og deretter tørket i varmeskap i et døgn ved 60° C. Fire kontrollfiltre uten alger ble behandlet på tilsvarende måte. Før filtrering og etter tørking ble filtrene veid på vekt med nøyaktighet på ±1 µg. Etter tørking og veiing ble de

samme filtrerene sendt til CHN-analyse for å finne karbon- og nitrogeninnhold i kulturene (se appendiks D).

2.3.5 Måling av alkalinitet

Den resterende kulturen fra hver serie (450 mL per nivå) ble sentrifugert ved 2500 rpm i 10 minutter ved 20° C. Overflødig væske etter sentrifugering ble forsiktig helt av og analysert for alkalinitet, mens den resterende biomassen ble tilsatt 0,2 mL etanol / mL opprinnelig kultur og deretter plassert i fryseskap og oppbevart ved -30° C. Det ble også målt alkalinitet i mediet. Resultatene fra alkalinitetsmålingene kunne kombinert med målingene av pH brukes for å beregne innhold av ulike former for løst uorganisk karbon i kulturene og konsentrasjonen av CO₂ i kulturflaskene (se avsnitt 2.4.7).

2.4 Statistisk bearbeiding

Rådata bestod av de automatisk loggede verdiene (se avsnitt 2.1.4) i tillegg til resultatene fra analyse av de 52 kulturprøvene (se avsnitt 2.2) og prøvetakinger ved avslutning (se avsnitt 2.3). Microsoft Excel 2007 (<http://office.microsoft.com/en-us/excel/>) ble brukt til å organisere dataene, mens R 2.11.1 (<http://www.r-project.org/>) ble brukt til å analysere dem og produsere diagrammene som er presentert i kapittel 3.

2.4.1 Transmisjon

Transmisjon T er definert som den lysintensiteten I som trenger gjennom et legeme i forhold til den lysintensiteten I_0 som treffer legemet:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2)$$

Både I og I_0 for begge kulturer var kjent for hvert tiende sekund som følge av de automatiske lysmålingene. De målte lysintensitetene måtte imidlertid først korrigeres i forhold til referanseverdier for hver av de tre lyssensorene. Til dette ble gjennomsnittet av de 180 første loggede verdiene for hver av lyssensorene benyttet (tilsvarer 30 minutter).

2.4.2 Absorbans

Absorbans A er definert som den naturlige logaritmen av forholdet mellom den lysintensiteten I_0 som treffer et legeme og den lysintensiteten I som trenger gjennom legemet:

$$A = \ln\left(\frac{I_0}{I}\right) = -\ln(T) \quad (3)$$

2.4.3 Beregnet biomasse underveis

Ifølge Beer-Lamberts lov (4) er konsentrasjonen C av et stoff som kan absorbere elektromagnetisk stråling proporsjonal med absorbansen A i stoffet:

$$A = \sigma \cdot Z \cdot C \quad (4)$$

hvor σ er en konstant kalt optisk tverrsnitt som er spesifikk for et gitt stoff ved en gitt bølgelengde, mens Z er optisk veilengde. Optisk veilengde er lengden i lysretning av legemet lyset penetrerer, i denne sammenhengen tykkelsen på kulturflaskene (3,3 cm). Tørrvekten av algekulturene ble målt for begge nivåer ved avslutning av hver av de tre seriene, og kombinert med lysmålingene kunne σ dermed bestemmes og biomassen hvert tiende sekund estimeres.

2.4.4 Optisk tverrsnitt

Det optiske tverrsnittet σ kan tolkes som evnen et stoff har til å absorbere lys, eller hvor stor flate en enhet av stoffet bidrar til å dekke slik at en gitt lysmengde blir absorbert. Beer-Lamberts lov sier at det optiske tverrsnittet σ er:

$$\sigma = -\frac{\ln(T)}{Z \cdot C} \quad (5)$$

Konsentrasjonen C av både klorofyll a og celler var kjent for begge nivåer for hvert tidspunkt for prøvetaking. Dermed kunne optisk tverrsnitt σ beregnes for fotosynteseapparatet og for hver enkelt celle.

2.4.5 Kvanteeffektivitet

Kvanteeffektiviteten QE i fotosyntesen beskriver forholdet mellom antall fikserte karbonatomer C_{fix} per tidsenhet og antall absorberte fotoner Q_{abs} per tidsenhet:

$$QE = \frac{C_{fix}}{Q_{abs}} \quad (5)$$

Ved å anta et konstant forhold mellom karbonmengde og biomasse kunne karbonmengde hvert tiende sekund beregnes for begge nivåer på samme måte som for biomasse (se avsnitt 2.4.3). På grunn av at det ble pumpet medium eller kultur inn i reaktorene med jevne mellomrom (3 timer mellom hver pumpesekvens), var det hensiktsmessig å velge tidspunkter fra datasettet ut fra dette. Disse tidspunktene er 30 minutter før pumpen startet, hver tredje time.

La Δt være endring i tid, D være utskiftingsrate av kultur og K_{fix} være antall fikserte karbonatomer per tidsenhet i nivå 1. Da er mengden partikulært organisk karbon K i nivå 1 ved tidspunkt $i+1$ gitt ved:

$$K_{i+1} = K_i - K_i \cdot D_i \cdot \Delta t_i + K_{fix_i} \cdot \Delta t_i \quad (6)$$

Dette kan forstås som at den mengden partikulært organisk karbon K i nivå 1 ved tidspunkt $i+1$ vil være den mengden K som var der ved tidspunkt i , minus den mengden K som har forlatt kulturen siden tidspunkt i , pluss den mengden karbon K_{fix} som er blitt fiksert siden tidspunkt i .

Ved å omforme dette uttrykket med hensyn på K_{fix} , ser vi at antallet karbonatomer som fikseres i nivå 1 ved ethvert tidspunkt er:

$$K_{fix_i} = K_i \cdot D_i + \frac{K_{i+1} - K_i}{\Delta t_i} \quad (7)$$

La Δt være endring i tid, D være utskiftingsrate av kultur og L_{fix} være antall fikserte karbonatomer per tidsenhet i nivå 2. Da er mengden partikulært organisk karbon L i nivå 2 ved tidspunkt $i+1$ gitt ved:

$$L_{i+1} = L_i - L_i \cdot D_i \cdot \Delta t_i + K_i \cdot D_i \cdot \Delta t_i + L_{fix_i} \cdot \Delta t_i \quad (8)$$

Dette kan forstås som at den mengden partikulært organisk karbon L i nivå 2 ved tidspunkt $i+1$ vil være den mengden L som var der ved tidspunkt i , minus den mengden L som har forlatt kulturen siden tidspunkt i , pluss den mengden K som har blitt overført fra nivå 1 siden tidspunkt i , pluss den mengden karbon L_{fix} som er blitt fiksert siden tidspunkt i .

Ved å omforme dette uttrykket med hensyn på L_{fix} , ser vi at antallet karbonatomer som fikseres i nivå 2 ved ethvert tidspunkt er:

$$L_{fix_i} = (L_i - K_i) \cdot D_i + \frac{L_{i+1} - L_i}{\Delta t_i} \quad (9)$$

Utskiftingsraten D ble funnet ved hjelp av målingene av hvor mye kultur per tidsenhet som ble ført ut av systemet til utløp (se avsnitt 2.1.2), dividert med volumet i reaktorene. D var således lik for begge nivåer.

For å finne antall fotoner som absorberes Q_{abs} i løpet av samme tidsperiode ble målt transmisjon T i begge nivåer benyttet for å regne om til antall absorberte fotoner per m^2 og sekund ved hjelp av lysmålingene beskrevet i avsnitt 2.3.1. Multiplisert med areal av algekulturenes front og aktuell tidsperiode ble Q_{abs} funnet for hvert respektive nivå.

Dermed kunne kvanteeffektiviteten QE uttrykt i (5) beregnes for hvert nivå hver tredje time.

2.4.6 Konsentrasjon av løst uorganisk karbon

Seacarb (<http://cran.r-project.org/web/packages/seacarb/>), en tilleggspakke til R, ble benyttet til å beregne konsentrasjonen av løst uorganisk karbon i kulturene ved avslutning av hver serie, ut fra pH- og alkalinitetsmålingene. Seacarb beregnet også konsentrasjon av CO_2 i lufta i hver reaktor, for direkte sammenligning med resultatet av CO_2 -målingene beskrevet i avsnitt 2.3.2.

3 RESULTATER

Resultatene fra den automatiske loggingen og fra prøvetakingen underveis presenteres i avsnitt 3.1 for å gi en dekkende illustrasjon av hvordan begge nivåer i de tre seriene utviklet seg. De tre seriene er plottet i hvert sitt diagram for å sammenligne nivåene i hver serie med hverandre, med antall døgn siden oppstart av serien som forklaringsvariabel. Det blir også vist et diagram med alle tre serier samlet for bedre å illustrere generelle likheter og ulikheter mellom nivåene, samt eventuelle forskjeller mellom seriene. I den forbindelse bør det merkes at tidsskalaen er noe ulik for de tre seriene: Serie 1 går over omtrent 12 døgn, serie 2 over omtrent 8 døgn og serie 3 over omtrent 7 døgn. Konsekvensen for det felles diagrammet er at plottene for serie 2 og serie 3 ikke spenner over hele tidsaksen.

I avsnitt 3.2 er utvalgte målingsvariabler av interesse plottet mot hverandre uavhengig av serie for nærmere å sammenligne mønstre i respons i de to respektive nivåer. I disse diagrammene er det tegnet en linje som representerer den lineære funksjonen som passer best med dataene fra hvert nivå. Regresjonskoeffisienten med konfidensintervaller er oppgitt med en konfidenskoeffisient på 95 %.

Forhold ved gjennomstrømningssystemenes natur gjorde det hensiktsmessig å plukke ut enkelte verdier fra den automatiske loggingen for presentasjon og analyse. Dette presiseres når det er aktuelt. Merk for øvrig at loggingen av temperaturen i kabinettet holdt seg stabil innenfor $18^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ gjennom alle serier.

I samtlige diagrammer er nivå 1 og nivå 2 konsekvent markert med henholdsvis sort og rødt.

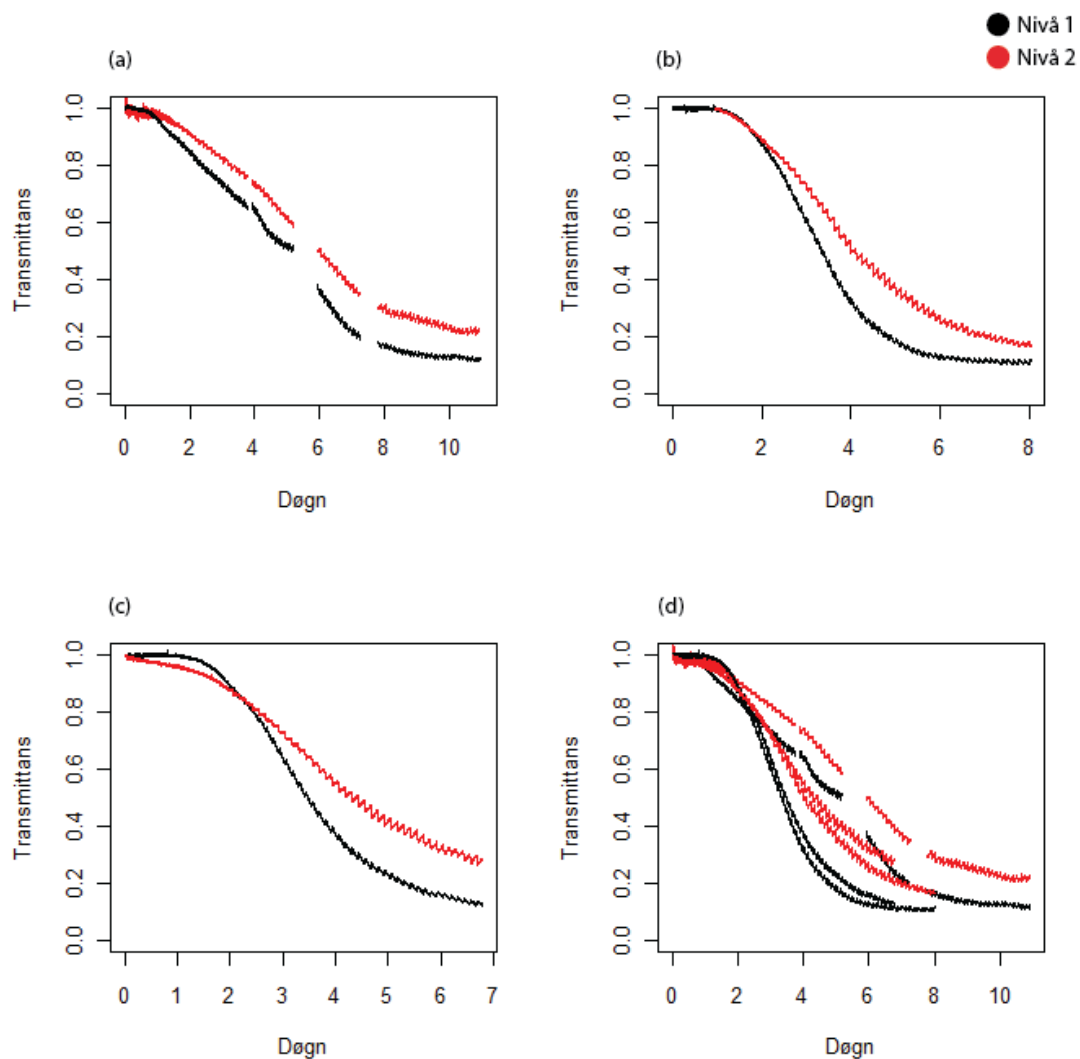
Rådata fra prøvetakingene er samlet i tabeller i appendiks E.

3.1 Utvikling over tid

3.1.1 Transmittans

Utviklingen av transmittans er vist i figur 3.1. Her er alle de automatisk loggede verdiene for lys benyttet for å framstille grafene. Årsaken til kurvenes ujevnheter er at det hver tredje time ble pumpet inn medium eller kultur til de to nivåene, noe som raskt endret sammensetningen i kulturene. Enkelte resultater fra serie 1 og 2 mangler, noe som skyldes problemer med dataloggingen underveis (se kapittel 4).

Det er høyere transmittans i nivå 2 for alle serier gjennom hele perioden, bortsett fra de to

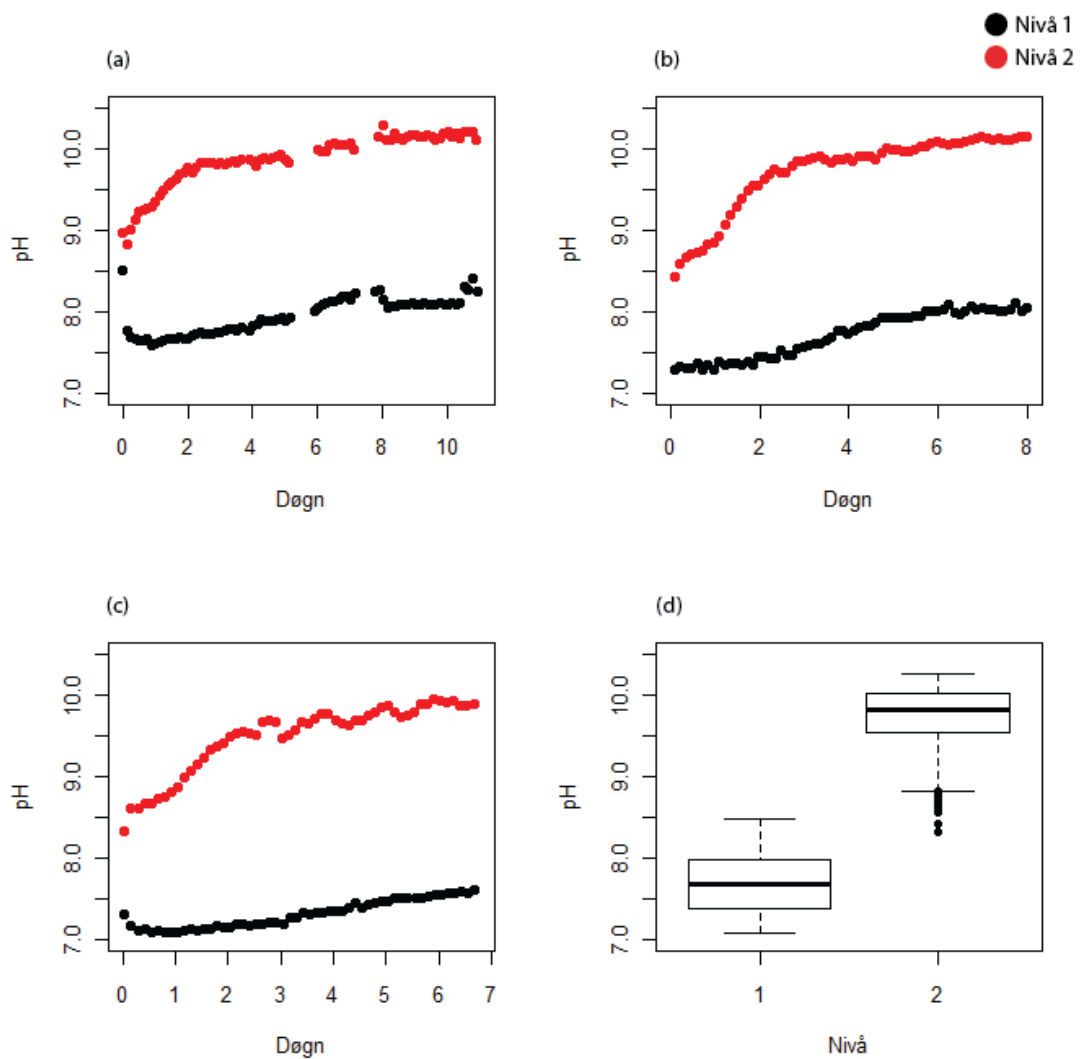


Figur 3.1: Utvikling av transmittans i serie 1 (a), serie 2 (b), serie 3 (c) og alle serier samlet (d).

første døgnene i serie 3. Serie 1 skiller seg fra serie 2 og 3 ved at transmittansen avtar saktere.

3.1.2 pH

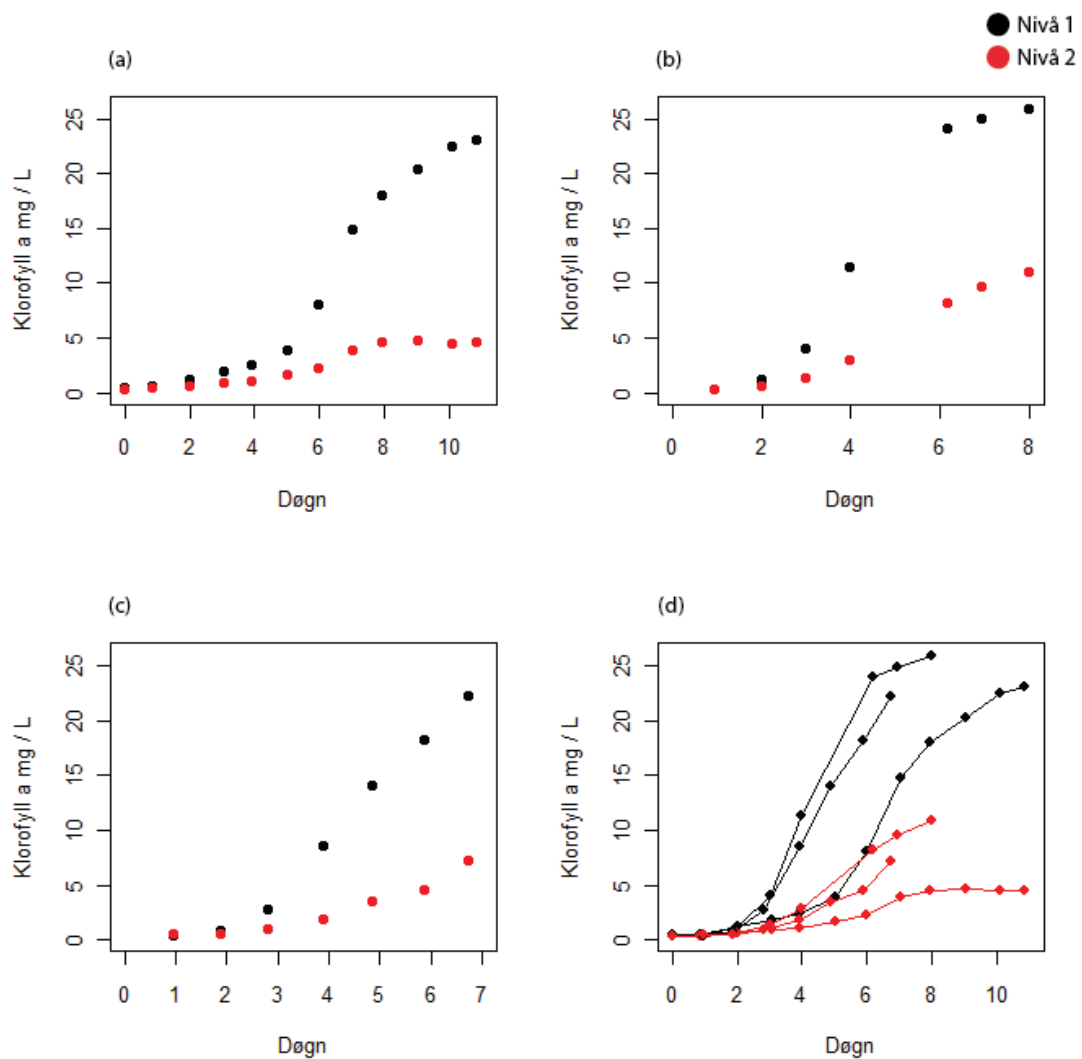
Utviklingen av pH er vist i figur 3.2. Her er det plukket ut en verdi for hvert nivå fra hvert pumpeintervall, dvs. hver tredje time. Det er en lignende utvikling i pH i alle serier i form av en svak oppadgående trend gjennom hele perioden fra døgn 2. Plottene viser at det til enhver tid var høyere pH i nivå 2 enn i nivå 1. Boksplottet (d) inkluderer alle serier og illustrerer variasjonen i pH i de respektive nivåer over tid.



Figur 3.2: Utvikling av pH i serie 1 (a), serie 2 (b), serie 3 (c) og boksplot med alle serier samlet (d).

3.1.3 Klorofyll a

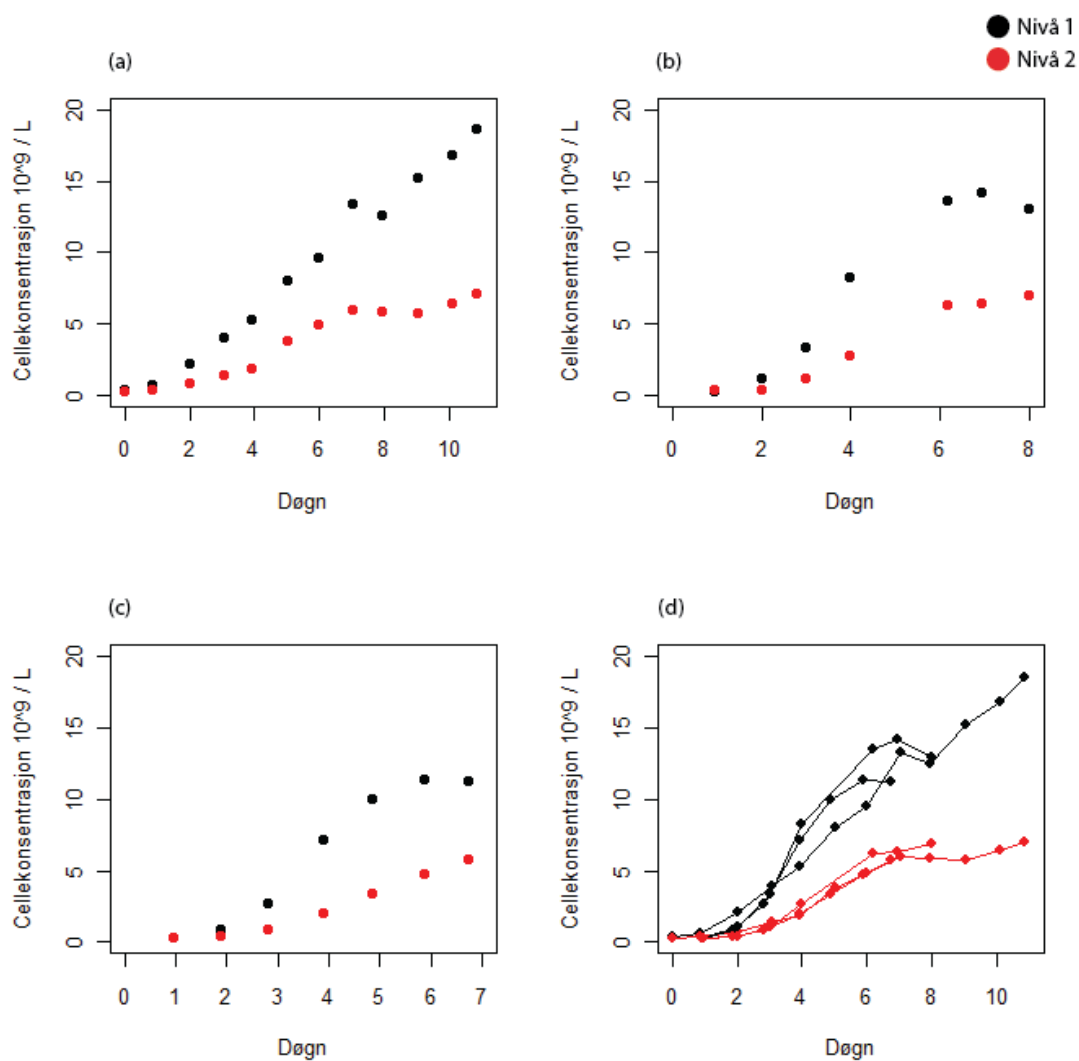
Utviklingen av klorofyll a er vist i figur 3.3. I plottene ser man at innholdet av klorofyll a per volumenhet er høyere i nivå 1 fra døgn 2 og at konsentrasjonen videre øker raskere enn i nivå 2. Nivå 2 viser for øvrig en lignende utvikling, men med en svakere stigning. Begge nivåer i serie 1 har en forsinket utvikling i forhold til de tilsvarende nivåer i serie 2 og 3.



Figur 3.3: Utvikling av klorofyll a i serie 1 (a), serie 2 (b), serie 3 (c) og alle serier samlet (d).

3.1.4 Cellekonsentrasjon

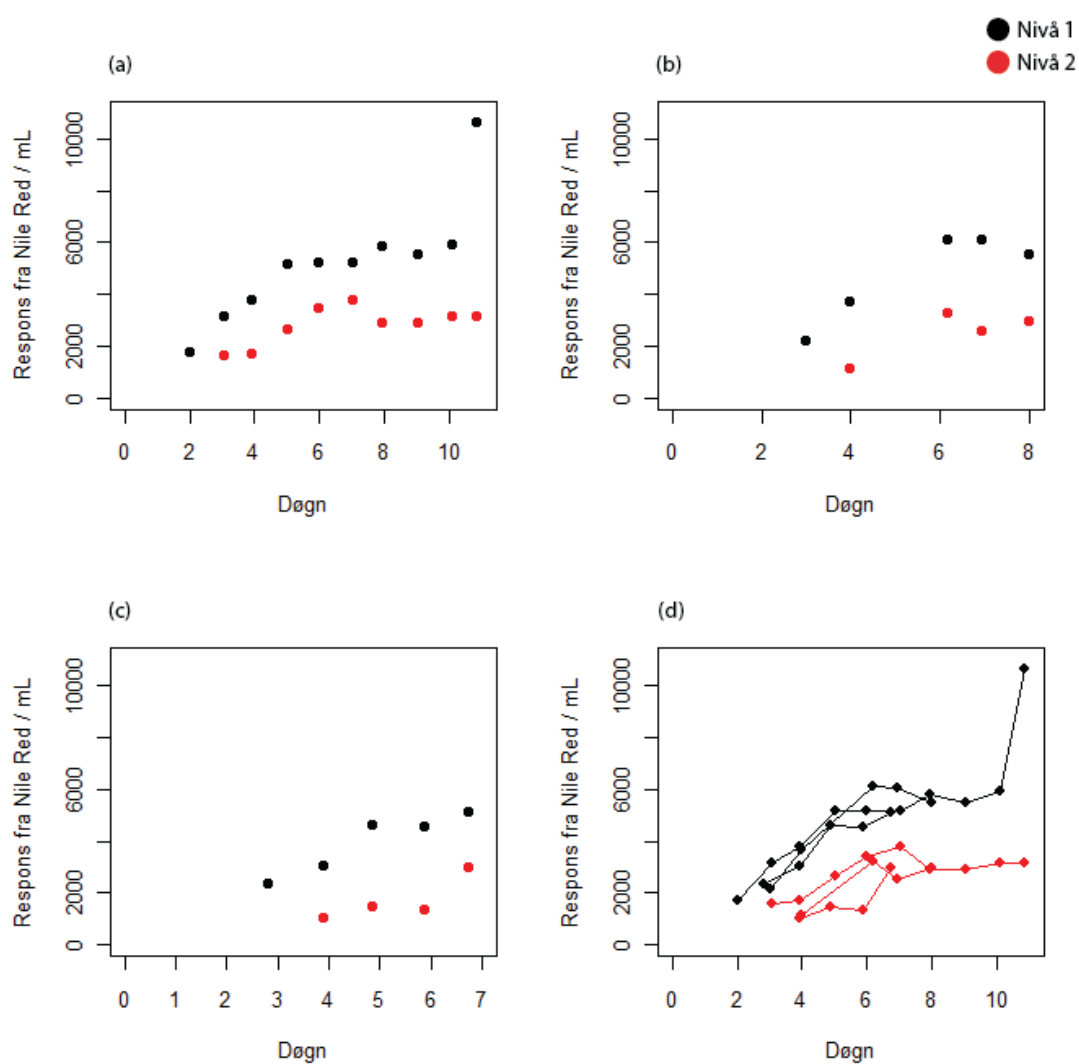
Utviklingen av cellekonsentrasjon er vist i figur 3.4. Celleantallet varierer betydelig mellom de to nivåene fra 2-3 døgn. Seriene viser en sammenfallende utvikling for hvert nivå, med tegn til en noe lavere økning i serie 1 for begge nivåer. I nivå 1 er det antydning til en stagnasjon etter 7-8 døgn for både serie 1 og 2, før den igjen stiger bratt i serie 1 fra 8 døgn.



Figur 3.4: Utvikling av cellekonsentrasjon i serie 1 (a), serie 2 (b), serie 3 (c) og alle serier samlet (d).

3.1.5 Nile Red som lipidindikator

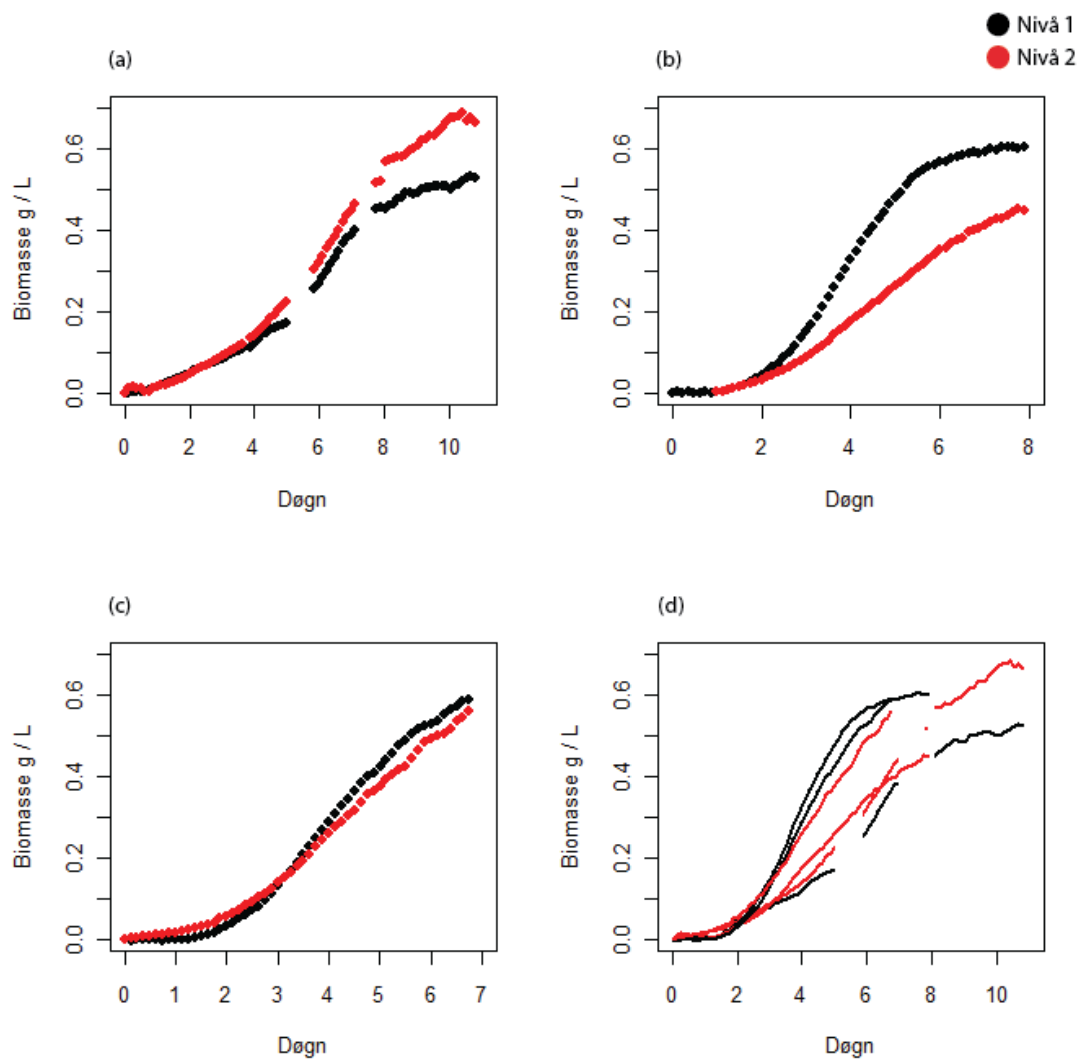
Respons fra Nile Red indikerer lipidinnhold i algene, og utviklingen er vist i figur 3.5. I alle serier mangler resultater fra de to første prøvene fra nivå 1 og de tre første fra nivå 2 grunnet for lav cellekonsentrasjon (se kapittel 4). For alle serier er det ved samtlige tidspunkter en tydelig tendens til høyere respons per volumenhet i nivå 1.



Figur 3.5: Respons fra Nile Red i serie 1 (a), serie 2 (b), serie 3 (c) og alle serier samlet (d).

3.1.6 Biomasse

Utviklingen av biomasse er vist i figur 3.6. Biomassen ble kun målt ved forsøkets avslutning, og derfor er alle verdier i diagrammene beregnet ut fra absorbans (se avsnitt 2.4.3). De manglende verdiene i serie 1 og 2 skyldes problemer med den automatiske dataloggingen. Alle verdiene er plukket ut i tre timers intervaller, fra 30 minutter før pumpen til gjennomstrømningssystemet for kultur og medium ble slått på. Biomasseutviklingen i de to nivåene følger hverandre i 7 døgn i serie 1 og 3, før utviklingene skiller lag i serie 1. Det er større forskjell mellom nivåene i serie 2. I serie 1 er biomassen i nivå 2 høyere enn i nivå 1 ved nesten alle tidspunkter for beregning.



Figur 3.6: Utvikling av biomasse i serie 1 (a), serie 2 (b), serie 3 (c) og alle serier samlet (d).

3.1.7 Elementsammensetning

Figur 3.7 viser karboninnhold i forhold til biomasse (a) og nitrogeninnhold (b). Det ble foretatt målinger av biomasse, partikulært organisk karbon og partikulært organisk nitrogen ved avslutning av hver serie, og hvert punkt i diagrammene representerer ett nivå. Stigningstallet til regresjonslinjene i (a) gir andel karbon av biomasse:

Nivå 1: $(0,554 \pm 0,0304)$ g karbon / g tørrvekt

Nivå 2: $(0,516 \pm 0,0481)$ g karbon / g tørrvekt

Stigningstallet til regresjonslinjene i (b) gir masse av partikulært organisk karbon per masse av partikulært organisk nitrogen:

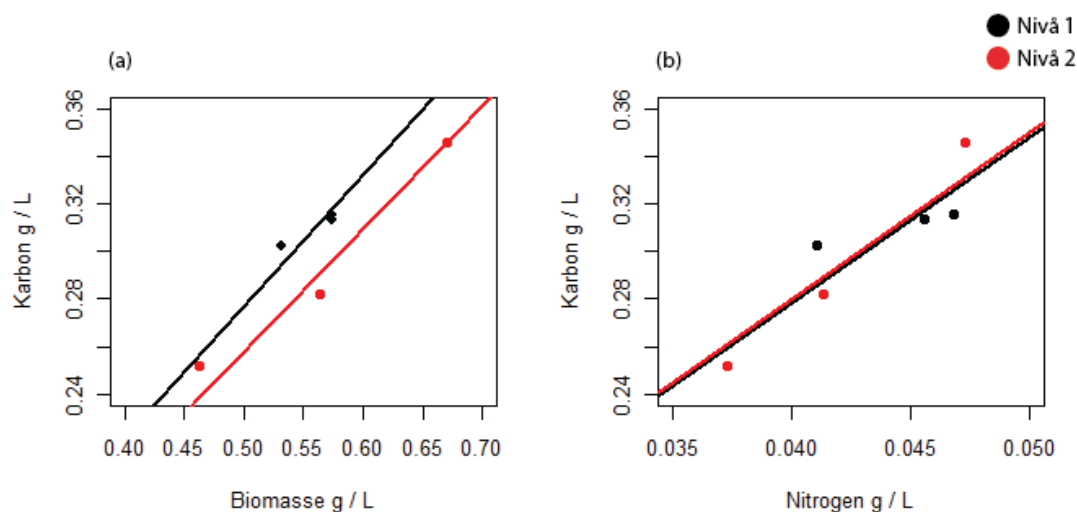
Nivå 1: $(6,96 \pm 0,779)$ g karbon / g nitrogen

Nivå 2: $(7,00 \pm 0,797)$ g karbon / g nitrogen

Dette gir ved omregning til mol forholdet mellom stoffmengde C : N:

Nivå 1: $(8,11 \pm 0,909)$ mol karbon / mol nitrogen

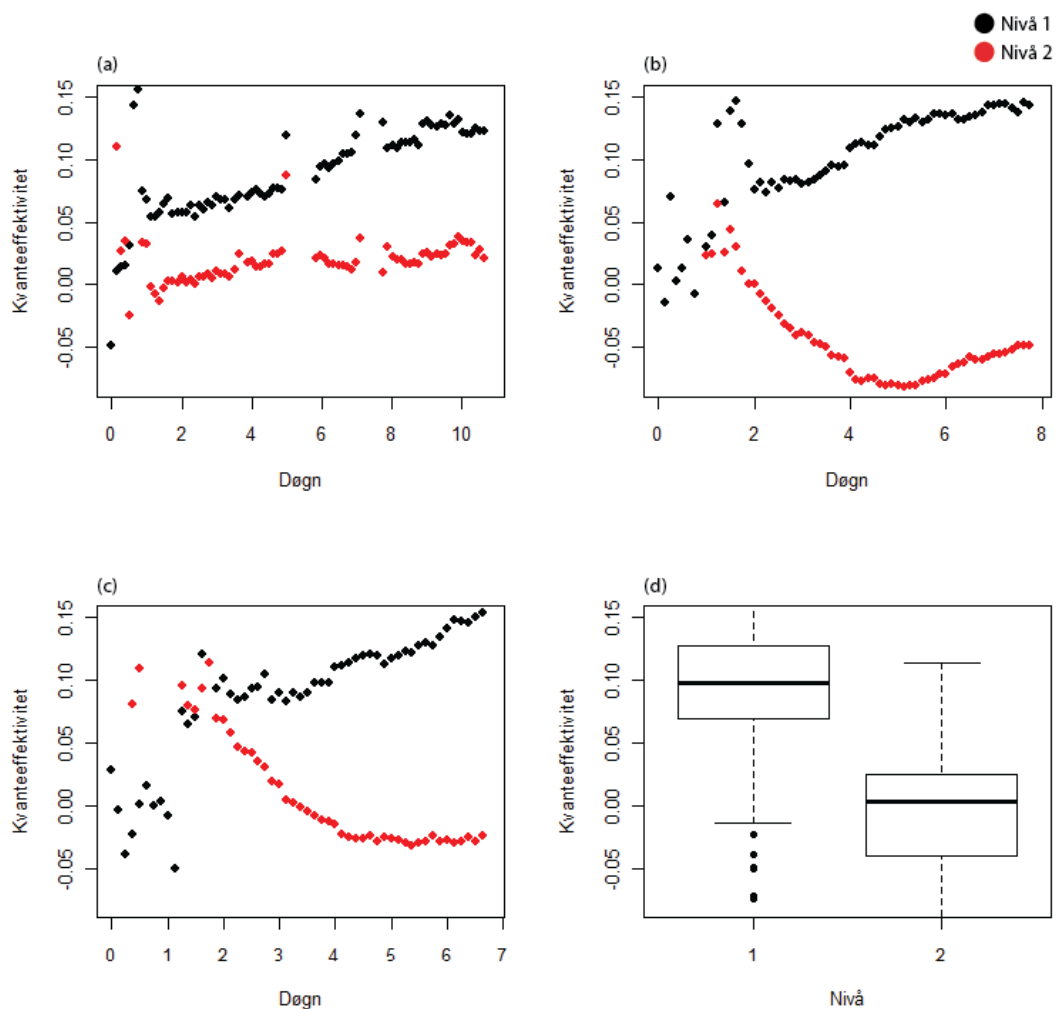
Nivå 2: $(8,16 \pm 0,929)$ mol karbon / mol nitrogen



Figur 3.7: Forhold mellom partikulært organisk karbon og biomasse (a) og mellom partikulært organisk karbon og partikulært organisk nitrogen (b).

3.1.8 Kvanteeffektivitet

Den beregnede kvanteeffektiviteten (se avsnitt 2.4.5) over tid er vist i figur 3.8. Nivå 1 har en oppadgående tendens for alle serier, mens nivå 2 viser lavere effektivitet. Flere av verdiene i nivå 2 i serie 1 og 2 ender opp negative. De tidligste verdiene i alle serier er svært spredt, mens de i større grad samler seg senere. Boksplottet (d) sammenfatter alle serier for de respektive nivåer og viser en tendens til at kvanteeffektiviteten samler seg rundt 0,1 for nivå 1 og rundt 0 for nivå 2. De beregnede verdiene har en relativt høy grad av spredning.



Figur 3.8: Kvanteeffektivitet i serie 1 (a), serie 2 (b), serie 3 (c) og boksploTT med alle serier samlet (d).

3.1.9 CO₂-flyt, lysintensitet, alkalinitet og løst uorganisk karbon

Ved avslutning av serie 1 og 3 ble det foretatt målinger av konsentrasjonen av CO₂ det var i gassen som ble ført inn i og ut av hvert nivå. De målte verdiene varierte i tidsintervaller og er angitt i ppm ved ytterpunkter i variasjonen. Resultatene er vist i tabell 3.1.

	<u>Inn nivå 1</u>	<u>Ut nivå 1</u>	<u>Ut nivå 2</u>	<u>I rommet</u>
Serie 1	1550-4217	700-800	380-400	470-490
Serie 3	7990-13200	2600-2700	360-420	480-490

Tabell 3.1: Måling av CO₂-konsentrasjon.

Lysintensitet som passerte hvert nivå's kulturflasker fylt med kun medium ble målt ved avslutning av serie 3. Også disse verdiene varierte noe ut fra hvor lyssensoren ble plassert. Verdiene som er gitt i $\mu\text{mol fotoner/m}^2/\text{s}$ og vist i tabell 3.2 er derfor et gjennomsnitt av lysintensiteten ved 4 målepunkter bak hver kulturflaske.

	<u>Nivå 1</u>	<u>Nivå 2</u>
Lysintensitet	113,5	96,1

Tabell 3.2: Måling av lysintensitet.

Det ble foretatt målinger av alkalinitet i begge nivåer ved avslutning av hver serie. Resultatene er vist i tabell 3.3 og gitt med benevnning mekv/L.

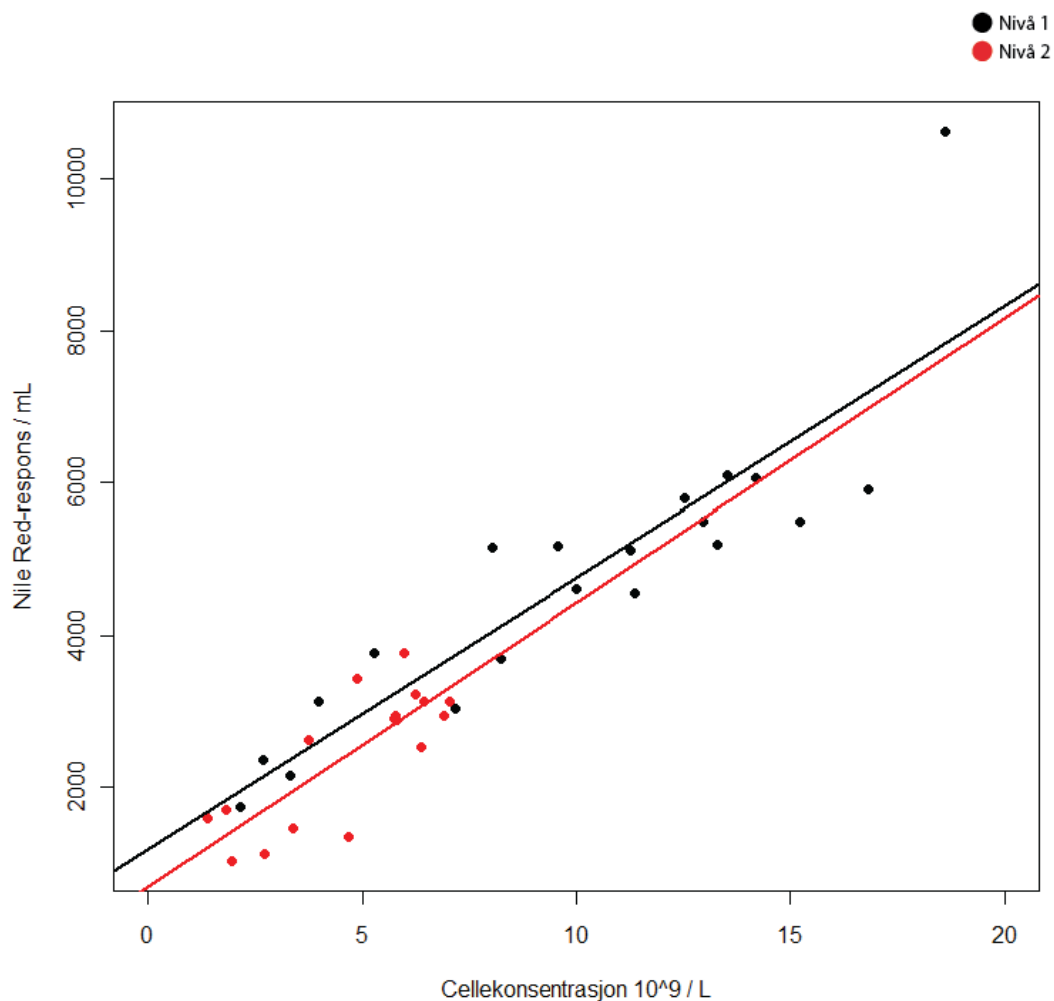
	<u>Nivå 1</u>	<u>Nivå 2</u>	<u>Medium</u>
Serie 1	4,22	4,51	1,36
Serie 2	5,15	5,01	
Serie 3	4,44	4,17	

Tabell 3.3: Måling av alkalinitet.

3.2 Relasjoner

3.2.1 Respons fra Nile Red relatert til cellekonsentrasjon

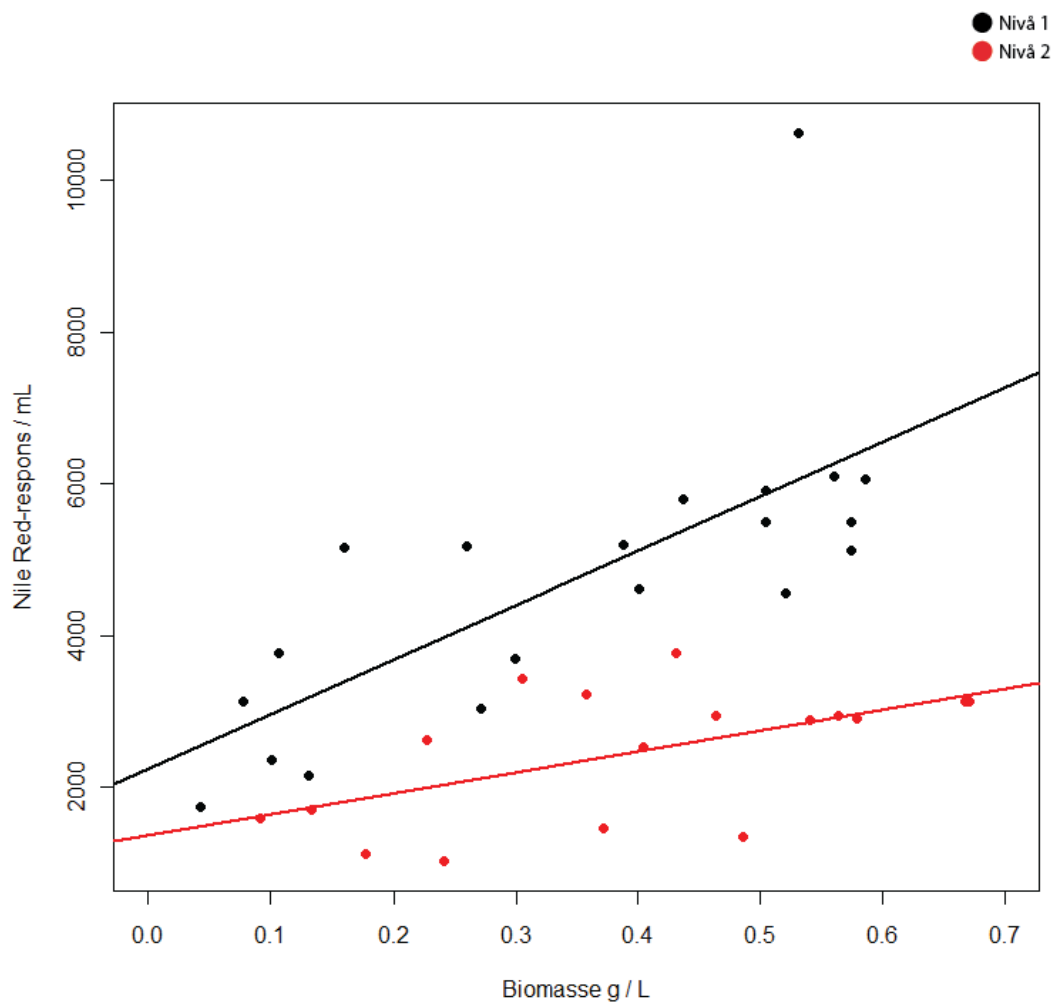
Figur 3.9 viser målt fluorescens som indikator på lipidinnhold i forhold til hvor høy celledetthet det var i de to respektive nivåene. Mange av prøvene fra nivå 1 viste høye cellekonsentrasjoner sammenlignet med prøvene fra nivå 2, og resultatene av farging med Nile Red viser en tendens til høyere respons jo flere celler det er i kulturen. Det er imidlertid samtidig tydelig at det ikke er noen påviselig høyere respons per celle i noen av nivåene. Det er ingen signifikant forskjell mellom nivå 1 og nivå 2, $p = 0,88$ (respons fra Nile Red er uten nullpunkt. Se kapittel 4 for diskusjon).



Figur 3.9: Respons fra Nile Red relatert til cellekonsentrasjon per nivå ($p = 0,88$).

3.2.2 Respons fra Nile Red relatert til biomasse

Figur 3.10 viser respons fra Nile Red korrelert med biomasse. Det er ingen tydelig forskjell mellom verdiene for biomasse mellom de to nivåene, men det er en synlig tendens til høyere respons fra Nile Red i nivå 1 ved de ulike biomasseverdiene. Det er liten signifikant forskjell mellom nivå 1 og nivå 2, $p = 0,043$. (respons fra Nile Red er uten nullpunkt. Se kapittel 4 for diskusjon).



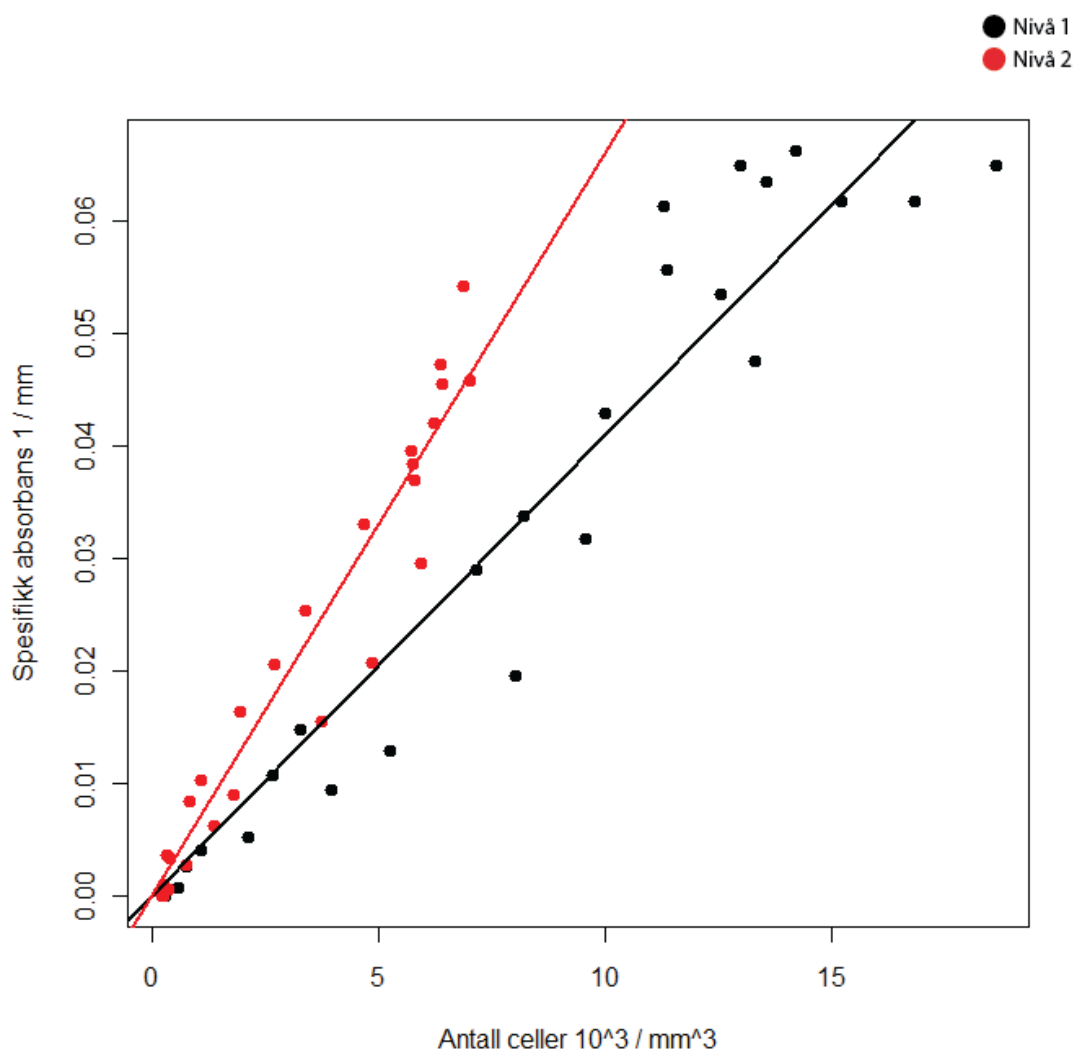
Figur 3.10: Respons fra Nile Red relatert til biomasse per nivå ($p = 0,043$)

3.2.3 Spesifikk absorbans relatert til cellekonsentrasjon

Figur 3.11 viser hvor stor spesifikk absorbans det er i forhold til cellekonsentrasjon i de to nivåene. Cellekonsentrasjonen er gitt i antall celler per mm^3 . Stigningstallet til regresjonslinjene er det optiske tverrsnittet til 1000 celler (se avsnitt 2.4.4). Dette kan tolkes som evnen hver celle har til å absorbere lys. Det er tydelig at cellene i nivå 2 har et større optisk tverrsnitt enn cellene i nivå 1. Omregnet til hensiktsmessig benevnning er regresjonskoeffisientene:

Nivå 1: $(4,10 \pm 0,286) \mu\text{m}^3 / \text{celle}$

Nivå 2: $(6,61 \pm 0,443) \mu\text{m}^3 / \text{celle}$



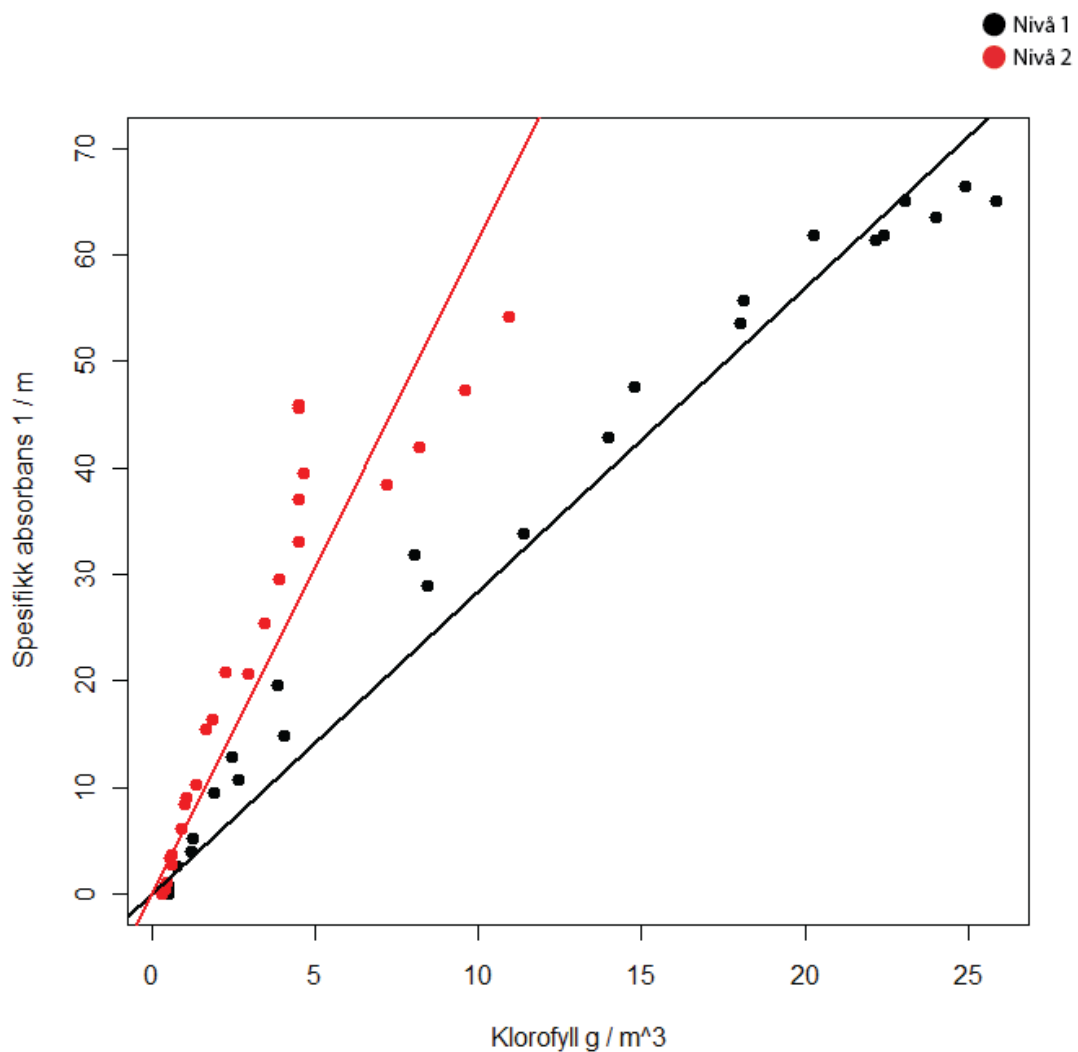
Figur 3.11: Spesifikk absorbans relatert til cellekonsentrasjon per nivå ($p < 0,001$).

3.2.4 Spesifikk absorbans relatert til klorofyllkonsentrasjon

Figur 3.12 viser hvor stor spesifikk absorbans det er i forhold til klorofyllkonsentrasjon i de to nivåene. Klorofyllkonsentrasjonen er gitt i $\text{mg} / \text{L} = \text{g} / \text{m}^3$. Stigningstallet til regresjonslinjene er det optiske tverrsnittet til fotosynteseapparatet (se avsnitt 2.4.4). Dette kan tolkes som evnen fotosynteseapparatet har til å absorbere lys. Det er tydelig at klorofyllet i nivå 2 har et større optisk tverrsnitt enn klorofyllet i nivå 1. Regresjonskoeffisientene i dette tilfellet er:

Nivå 1: $(2,84 \pm 0,124) \text{ m}^2 / \text{g klorofyll}$

Nivå 2: $(6,16 \pm 0,721) \text{ m}^2 / \text{g klorofyll}$



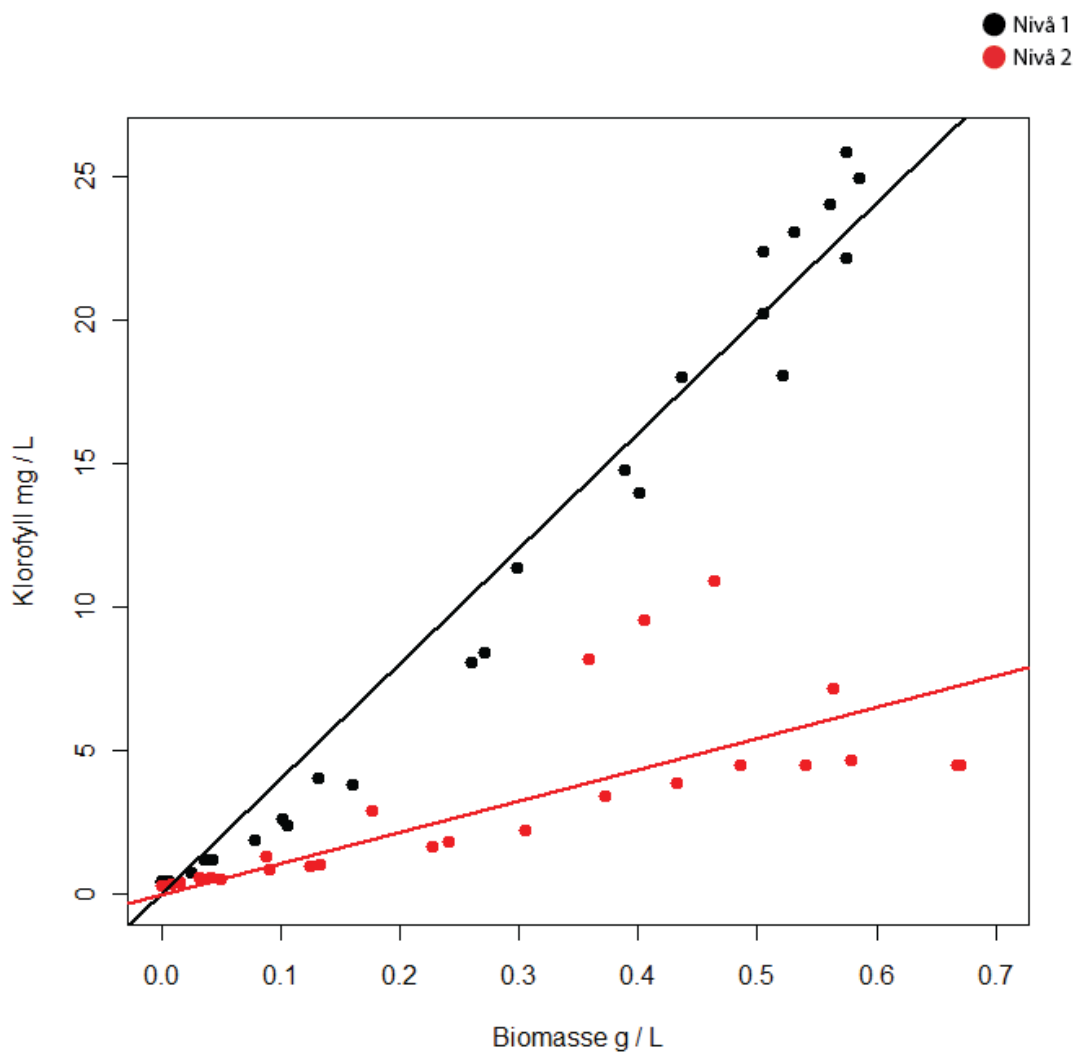
Figur 3.12: Spesifikk absorbans relatert til klorofyllkonsentrasjon per nivå ($p < 0,001$).

3.2.5 Klorofyll relatert til biomasse

Figur 3.13 viser klorofyllmengde per biomasse. Det er tydelig at klorofyllnivåene generelt er høyere i nivå 1, mens biomassemålingene ikke viser tegn til forskjell. Det ser ut til gjennomgående å være mer klorofyll per biomasse i nivå 1. Det er signifikant forskjell mellom nivå 1 og nivå 2 ($P < 0,001$). Stigningstallene til regresjonslinjene er andel klorofyll av tørrvekt:

Nivå 1: $(40,1 \pm 1,81)$ mg klorofyll / g biomasse

Nivå 2: $(10,9 \pm 2,38)$ mg klorofyll / g biomasse



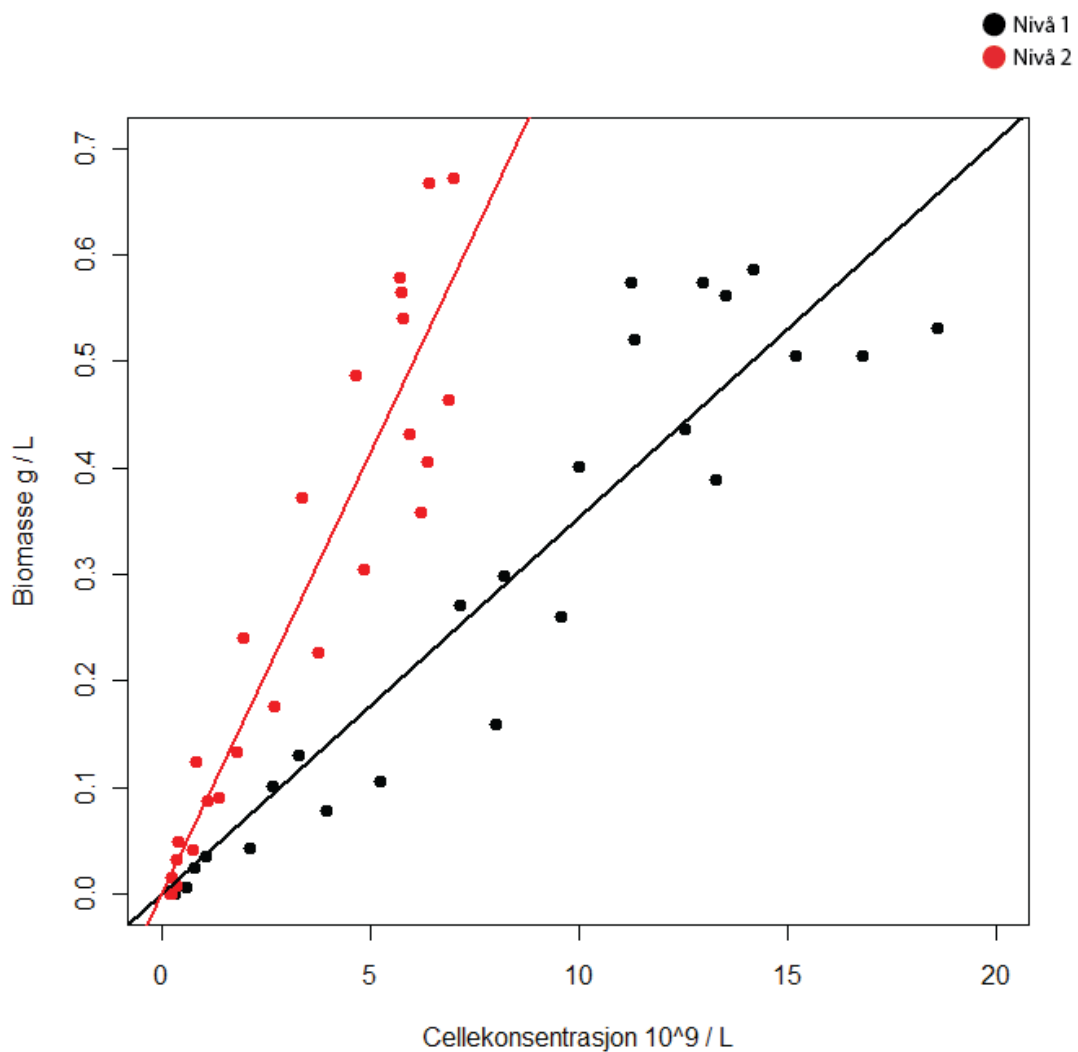
Figur 3.13: Klorofyllkonsentrasjon relatert til biomasse per nivå ($p < 0,001$).

3.2.6 Biomasse relatert til cellekonsentrasjon

Figur 3.14 viser biomasse relatert til cellekonsentrasjonen i kulturprøvene. Det er tydelig høyere tetthet av celler i nivå 1, mens det ikke er noen tydelig forskjell på biomasse. Det er signifikant forskjell mellom nivå 1 og nivå 2 ($P < 0,001$). Stigningstallet til regresjonslinjene er tørrvekt per celle, og de blir etter omregning til hensiktsmessig benevnning:

Nivå 1: $(35,3 \pm 3,12) \mu\text{g biomasse} / 10^6 \text{ celler}$

Nivå 2: $(83,0 \pm 7,64) \mu\text{g biomasse} / 10^6 \text{ celler}$



Figur 3.14: Biomasse relatert til cellekonsentrasjon per nivå ($p < 0,001$).

4 DISKUSJON

Ved å sammenligne fargen på algene i de to kulturene (se bilde 2.4) kan man anta at det foregikk en ulik utvikling i de to nivåene. Resultatene bekrefter dette. Det var også forventet ettersom vekstforholdene for mikroalgene var svært forskjellige med hensyn til tilførsel av CO₂. Likheter og ulikheter i utvikling mellom de to nivåene drøftes i avsnitt 4.1.

I løpet av forsøket oppstod situasjoner som ikke var planlagt. Det ble også klart underveis at enkelte ting både kunne og burde ha vært gjort annerledes. Dette blir diskutert i avsnitt 4.2.

Avslutningsvis blir det i avsnitt 4.3 trukket en konklusjon som svar på hypotesen. Det blir også foreslått hva som kan være interessant å undersøke videre.

4.1 Likheter og ulikheter mellom nivå 1 og nivå 2

4.1.1 Biomasseøkning

Det strømmer like mye væske inn og ut av hvert nivå hvert døgn. Forskjellen er at det i nivå 1 kommer inn friskt medium og at det i nivå 2 kommer inn kultur fra nivå 1. At det forekommer vekst i nivå 1 sier seg selv. Om det forekommer vekst også i nivå 2 må derimot undersøkes nærmere.

Den beregnede biomassen underveis (se figur 3.6) viser at utviklingen av biomasse per volum fortonet seg relativt likt i to grupperinger på tvers av nivå (nivå 1 fra serie 2 og 3, og nivå 2 fra serie 3 følger hverandre tett). Det var nivå 1 fra serie 1 som viste den tregeste akkumuleringen av biomasse, fulgt av nivå 2 fra serie 1 og 2. Disse dannet dessuten relativt lineære vekstkurver. Dette kan tyde på at veksten her var begrenset av en annen faktor enn lys, antakelig karbon. Det var nettopp en mistanke om karbonbegrensende vekstvilkår i det CO₂-anrikede nivå 1 i trinn 1 som førte til avgjørelsen om å øke CO₂-produksjonen før oppstart av serie 2. Den karakteristiske S-formen på vekstkurvene til nivå 1 i serie 2 og 3 kan tyde på at denne økningen var vellykket.

I et gjennomstrømningssystem bygget opp på denne måten er det flere faktorer som avgjør hvordan akkumuleringen av biomasse i de respektive nivåer arter seg. Avhengig av hvor høy kulturenes utskiftingsrate er, kan mengden biomasse følge hverandre tett selv om det ikke

forekommer vekst i andre nivå. I dette tilfellet virker ikke utviklingen av beregnet biomasse å kunne gi noe grunnlag for å si om det forekommer vekst også i nivå 2. Det foreligger imidlertid en sterk mistanke til nivå 2 i serie 1, hvor biomassen altså er høyere enn i nivå 1 ved stort sett samtlige tidspunkter.

Figurer av kvanteeffektivitet i avsnitt 3.1.8 antyder at det i nivå 1 er en relativt effektiv karbonfikseringsrate i forhold til absorberte fotoner. Resultatene viser at det fikseres omtrent 1 karbonatom per 10 ± 3 absorberte fotoner. Verdiene for nivå 2 i serie 2 og 3 viser at det her store deler av tida foregår en negativ karbonfiksering. Dette er en begrepsbruk som rent intuitivt kan virke meningsløs, og det er naturlig å tenke seg at det betyr at det ikke forekommer vekst. Dette vil imidlertid være en feilslutning. Det bør snarere tolkes som at det blir pumpet biomasse ut av reaktoren i et høyere tempo enn det mikroalgene makter å produsere, slik at det blir et netto underskudd av karbon i nivå 2. For serie 1 arter resultatene fra nivå 2 seg noe annerledes: Disse indikerer også at det forekommer vekst her, om enn noe ineffektiv i forhold til antall absorberte fotoner.

Vanligvis er målinger av klorofyll a et godt mål på biomasse. I denne sammenhengen viste det seg imidlertid ikke å være et tilfredsstillende mål for sammenligning på tvers av nivåer. Dette er fordi forskjellen var stor mellom nivåene (se figur 3.1.3), samtidig som målingene av tørrvekt var relativt jevne. I stedet blir klorofyllmålingene en tydelig indikasjon på at det algecellene endres i nivå 2. Logisk kan man tenke seg at det enten: (1) skjer en form for degradering, omdanning eller inaktivering av klorofyll a i nivå 2, (2) foregår økt cellevekst i forhold til klorofyllsyntese i nivå 2, eller (3) en kombinasjon av disse. Det er vanskelig å se for seg at det forekommer lysinhibisjon i nivå 2, ettersom lysintensiteten her ble målt til å være lavere enn i nivå 1 (se avsnitt 3.1.9). En mulighet er eventuelt at et lavt CO₂-nivå kan øke graden av lysinhibisjon.

Om vi ser på resultatene av målingene av cellekonsentrasjon blir det enda tydeligere at algene reagerer på den raske endringen i vekstvilkår. Figur 3.1.4 viser at det i nivå 1 konsekvent er omtrent dobbelt så mange celler som i nivå 2. Ved å plote biomasse mot cellekonsentrasjon blir det enkelt å se at den generelle celledørrelsen øker betraktelig etter overføring til nivå 2. Med andre ord kan det med stor sikkerhet slutes at det forekommer vekst i nivå 2, men antakelig av en annen art enn i nivå 1. Det kan se ut til at algene øker celledmassen i nivå 2, men at det oppstår problemer i celledelingsprosessen. Hvorvidt dette er en direkte eller indirekte følge av mangel på CO₂ er vanskelig å avgjøre, men man kan for eksempel tenke

seg at det er for høy pH i kulturen til at algene kan vokse normalt. De fleste mikroalger trives dårlig i miljø med $\text{pH} > 9$. Det kan også tenkes at det er en direkte sammenheng med mangel på substrat i form av karbon.

Til dette formålet ble det gjort undersøkelser med fargestoffet Nile Red som indikator på lipidinnhold i mikroalgene. Resultatene fra fluorescensmålinger med alger farget med Nile Red viser at det i forhold til volumenhet er en betydelig lavere respons i nivå 1. Det må imidlertid påpekes at verdiene for respons fra Nile Red er oppgitt uten et bestemt nullpunkt (se avsnitt 4.2). De kan derfor ikke ses på som noe annet enn indikasjoner på forskjell mellom nivåene. I figur 3.10 er respons fra Nile Red plottet mot biomasse, og dette bekrefter resultatene fra figur 3.6. Her må det bemerkes at usikkerheten her er av betydning, relativt høy p-verdi for signifikant ulikhet mellom nivåene ($p = 0,043$). Dette kan imidlertid ses i sammenheng med at responsverdiene bør reduseres i forhold til et nullpunkt.

Ved å plote respons fra Nile Red mot cellekonsentrasjon dannes et interessant bilde. Figur 3.9 indikerer hvor høyt lipidinnhold det er i hver celle, og her er det ingen signifikant forskjell mellom de to nivåene. Med andre ord kan man se for seg at økningen i cellemasse ikke innebærer noen økning i lipidmasse. Hva som representerer denne biomasseøkningen er derfor fortsatt uavklart.

4.1.2 pH

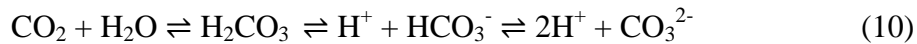
For at det skal kunne forekomme vekst av biomasse i nivå 2 kreves det tilstedeværelse av løst uorganisk karbon. Det er ingen isolert tilførsel av CO_2 til dette nivået, så den eneste kilden til karbon er dermed mediet fra nivå 1. Hvilken form det uorganiske karbonet foreligger som avhenger av pH-verdien i kulturen. Som vist i avsnitt 3.1.9 er det løst uorganisk karbon til stede i nivå 2 i alle serier ved avslutning, hovedsaklig i form av bikarbonationer (HCO_3^-) og karbonationer (CO_3^{2-}).

Målingene av pH viser at det til enhver tid i samtlige serier er høyere pH i nivå 2. Dette er en naturlig følge av forskjellen på gasstilførselen til de to nivåene. Le Châteliers prinsipp fastslår at det for en kjemisk reaksjon i likevekt ved påvirkning utenfra vil bli en forskyvning i likevekten. I nivå 1 tilføres CO_2 utenfra, og likevekten i (10) vil forskyves mot høyre. I nivå 2 tilføres CO_2 -fri luft slik at likevekten i (10) vil forskyves mot venstre.

$$pK_a = 3,75$$

$$pK_a = 6,36$$

$$pK_a = 10,33$$

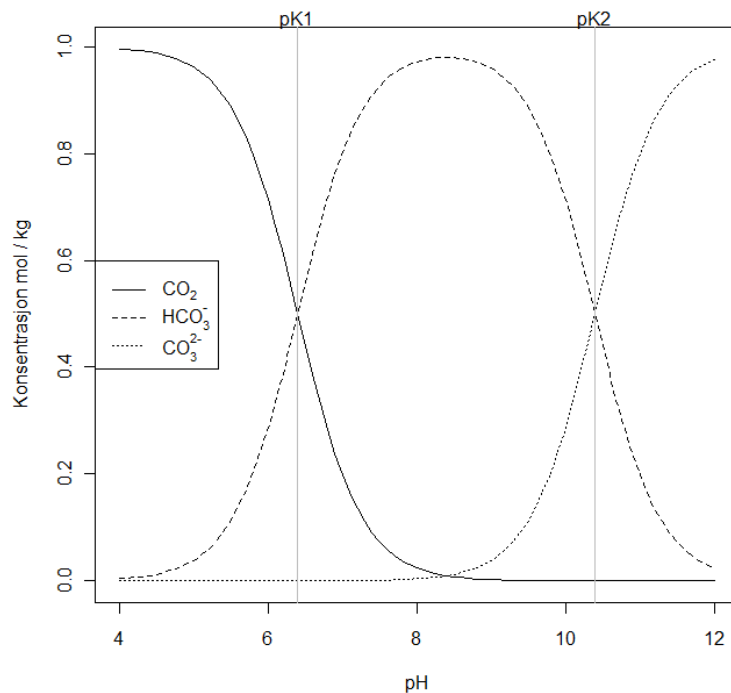


Dermed blir det høyere og lavere konsentrasjon av hydrogenioner i henholdsvis nivå 1 og nivå 2, og pH blir påvirket.

Alkaliniteten eller bufferevnen i mediet ble målt ved avslutning og brukt til å beregne konsentrasjonen av bikarbonationer og karbonationer. Tilførsel eller fravær av CO_2 vil ikke påvirke alkaliniteten fordi det i (10) blir produsert det samme antallet positivt og negativt ladede ioner. Alkaliniteten vil imidlertid øke ved algeproduksjon fordi det ved vekst tas opp nitrater til cellene ved hjelp av en $\text{NO}_3^-/\text{OH}^-$ antiport. Hydroksydionet som da tilføres mediet vil reagere med tilgjengelig CO_2 og danne bikarbonat.

Ved hjelp av R-pakken Seacarb beskrevet i avsnitt 3.1.9 kan det enkelt produseres et Bjerrum-diagram for karbonatsystemet (se figur 4.1). Dette illustrerer godt hvilken form løst uorganisk karbon i kulturen vil opptre som ved ulike pH-verdier. Både temperatur og salinitet har innvirkning på pK-verdiene, og de er her satt til henholdsvis 18°C og 0. Det er ikke tatt hensyn til alkalinitet. Konsentrasjonen langs y-aksen er kun et eksempel. Som allerede vist i tabell 3.4 kan man se at det

ved en pH rundt 10 er omtrent lik fordeling av bikarbonat- og karbonationer, mens det ved en pH rundt 8 nesten er utelukkende bikarbonationer. Dette betyr at den allerede lave karbonmengden i nivå 2 i tillegg er vanskelig å utnytte for mikroalgene, noe som vil forhindre vekst.



Figur 4.1: Bjerrum-diagram som beskriver hvilken form løst organisk karbon opptrer som ved ulik pH (temperatur 18°C , salinitet 0).

4.2 Svakheter ved forsøket

4.2.1 Nile Red som lipidindikator

Kjernen i forsøket dreide seg om å kartlegge lipidnivået i kulturprøvene som ble tatt underveis. Konvensjonelle metoder for å måle lipidmengde er relativt tidkrevende, som for eksempel metoden beskrevet i Bligh og Dyer (1959). Det ble derfor i stedet valgt en metode som går ut på å farge lipidene i cellene med fargestoffet Nile Red, for deretter å lese av prøvene i plateleser for fluorescens. Utgangspunktet for valgene som er beskrevet i avsnitt 2.2.3 er i stor grad basert på framgangsmåten i Chen et al. (2009). Det ble her konkludert med at Nile Red i stor grad ga pålitelige resultater.

Underveis i prosessen dukket det opp et problem med å kunne relatere responsen fra algeprøvene til en bakgrunnsrespons fra Nile Red. Fargestoffet gir relativt stor respons også uten alger til stede, og den viste seg å stige kontinuerlig med tiden. En brønnplate med fargede kulturprøver og kontrollprøver uten alger ble avlest etter 10, 40 og 90 minutter, og etter 90 minutter var responsen fra kontrollene høyere enn fra flesteparten av algeprøvene. Responsen fra algeprøvene holdt seg imidlertid stabile over tid. Med den svakheter at det ikke fantes noen bakgrunnsverdi å korrigere i forhold til, ble det likevel valgt å presentere disse verdiene som en indikator på lipidmengde.

Grunnen til dette er at resultatene fra algeprøvene antas å være til å stole på. Bakgrunnen for denne antakelsen er flere tester gjort i forkant av forsøket, som alle har gitt lignende resultater ved farging samme algemengder, både fra ferske og tidligere fryste alger. I løpet av disse testene ble det kjent at det var problemer knyttet til å finne bakgrunnsfluorescensen til Nile Red. Omfanget ble imidlertid aldri kjent fordi prøvene aldri stod lenge nok før avlesing i plateleser.

Problemene kunne til en viss grad vært løst ved parallelt å teste for respons i prøver med kjent lipidkonsentrasjon. Dette ble testet i forkant med lipidstandarden Triolein (Sigma-Aldrich, varenr. 44895-U), men resultatene fra disse testene varierte i stor grad. Derfor ble det utelatt fra dette forsøket. Dessverre ble det ikke tatt nok prøvemateriale underveis til å undersøke dem med metoden beskrevet i Bligh og Dyer (1959).

4.2.2 Automatisk logging av lysabsorpsjon, pH og temperatur

Det viste seg omtrent midtveis i serie 1 at Java-programmet som kontrollerte phidgeten i systemet for automatisk logging ikke var stabilt. Dette ga seg utslag i perioder med manglende data. Noen stor konsekvens kan ikke dette sies å ha hatt. I tillegg ble det gjort en feil tidlig i serie 2. Lyssensoren som var plassert bak nivå 2 viste seg å motta for sterk lysintensitet slik at sensoren logget maksimumsverdier (se avsnitt 2.1.4). Problemet ble imidlertid oppdaget og rettet opp relativt tidlig og før akkumuleringen av alger aksellererte.

4.2.3 Prøvetakinger underveis

I etterpåklokskapens lys burde det ha blitt tatt ut større volum algekultur underveis. På den annen side ble det vurdert som ønskelig å unngå å ta ut volumer særlig høyere enn 1% av reaktorvolumet for å forstyrre utviklingen i minst mulig grad. Mer prøvemateriale hadde vært nyttig også med tanke på å kunne måle flere tørrvektverdier og å kunne foreta CHN-analyser underveis. Med slike data kunne de estimerte verdiene i større grad blitt knyttet til faktiske måleresultater.

Det ble aldri tatt prøver av løst organisk karbon i kulturene. Dette burde ha blitt gjort, da mangelen på slike resultater gjorde massebalansen noe mangelfull.

Enkelte ledd i framgangsmåten for prøvetaking til avlesing av Nile Red-respons viste seg å være unødvendige. Prøvene ble sentrifugert før nedfrysing for å sikre en høy nok algekonsentrasjon til å få en tilfredsstillende respons. Etter at resultatene fra celledelling i flowcytometer ankom ble det vurdert som fornuftig å tynne ut de mest konsentrerte prøvene for å oppnå et likt antall celler i hver prøve. Dette kan ha vært en feilvurdering, ettersom kulturprøvene fra nivå 2 hadde såpass mye høyere masse per celle. Uansett var det for flere prøver minst ett unødvendig ledd i prøvetakingen ved først å konsentrere og senere tynne ut. Det ble dessuten gjort ytterligere en feilvurdering i uttynningsprosessen. Algeprøvene ble tynnet ut i destillert vann i stedet for i medium, med en potensiell konsekvens at cellene sprakk. Det er ukjent om de faktisk gjorde dette, men konsekvensen av det antas ikke å være alvorlig, ettersom de kort tid etterpå likevel skulle løses opp i DMSO for farging.

Også tidspunktene for prøvetaking burde vært bedre planlagt. For nøyaktighetens skyld burde det tas ut prøver på omtrent tilsvarende tidspunkter i forhold til når pumpen for gjennomstrømning av medium og kultur var aktive. Resultatene fra beregningene av

transmittans (se avsnitt 3.1.1) viser at forholdene endret seg noe ved hvert pumpeintervall. For best mulig å kunne sammenligne prøver med hverandre hadde en slik planlegging vært hensiktsmessig. Det er vanskelig å anslå hvor stor betydning dette kan ha hatt.

4.2.4 Prøvetakinger ved avslutning

Lysmålingene som er beskrevet i avsnitt 2.3.1 avslørte at det var ulik lysintensitet fra lysrørene fordelt i rom vertikalt. Dette fikk konsekvensen at nivå 2 ble bestrålt med en lavere lysintensitet enn nivå 1. De to nivåene kan dermed ikke påstås å ha fått lik behandling for alle andre vekstfaktorer enn CO₂-tilgang. Det antas imidlertid ikke å ha hatt noen stor konsekvens for resultatene i og med at nivå 2 ikke var begrenset av lys for vekst. Dette burde likevel vært testet og rettet opp før forsøket startet.

CO₂-produksjonen til nivå 1 i serie 1 viste seg å være for lav. Dette ble utbedret før serie 2 ble igangsatt, men antas å ha ført til karbonbegrensende vekst. Dermed ble serie 1 ikke behandlet likt som serie 2 og 3. Det var imidlertid uansett interessant å analysere resultatene.

4.3 Konklusjon

Hypotesen tok utgangspunkt i at mikroalger som først blir dyrket under lysbegrensende forhold og deretter utsettes for CO₂-begrensende forhold kunne tenkes å reagere på en slik behandling ved å utnytte et potensielt overskudd av NADPH til å syntetisere og akkumulere lipider fra karbohydrater. Etter å ha overvåket mikroalgekulturer kontinuerlig og analysert kulturprøver ved lipidfarging med Nile Red, eksisterer det ingen holdepunkter for å påstå at slik behandling fører til økt lipidproduktivitet i den undersøkte mikroalgen, *Selenastrum capricornutum* Printz. Metoden for å indikere lipidinnhold viste seg imidlertid å være vanskelig å beherske og ikke godt nok gjennomført til å få solide resultater. Likevel var det ingen indikasjon i noen av seriene på økt lipidproduktivitet verken per celle, per masse eller per volum. Konklusjonen blir derfor at hypotesen avvises.

4.4 Forslag til videre undersøkelser

Siden ulike algearter kan reagere svært forskjellig på tilsvarende påvirkning utenfra foreslås det å gjennomføre lignende forsøk på andre mikroalgearter. I den forbindelse vil det være

interessant å undersøke i større grad hvilke prosesser som settes igang internt i mikroalgene når de utsettes for plutselig karbonmangel. Det har blitt vist at algene akkumulerte biomasse uten å dele seg, men det er ikke fastslått hva denne biomassen bestod av. Hva som forårsaket den store graden av absorpsjon er heller ikke kjent. Det er derfor interessant også å analysere mikroalgene for et bredere spekter av pigmenter.

Litteraturliste

- Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2006). *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. CRC press, USA.
- Becker, E. W. (1994). *Microalgae: biotechnology and microbiology*. Cambridge University Press.
- Benemann, J. R., Weissman, J. C., Koopman, B. L., & Oswald, W. J. (1977). Energy production by microbial photosynthesis. *Nature*, 268(5615), 19-23. doi:10.1038/268019a0
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol*, 37(8), 911–917.
- Borowitzka, M. A. (1992). Algal biotechnology products and processes — matching science and economics. *Journal of Applied Phycology*, 4(3), 267-279. doi:10.1007/BF02161212
- Carvalho, A. P., Silva, S. O., Baptista, J. M., & Malcata, F. X. (2010). Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(5), 1275-1288. doi:10.1007/s00253-010-3047-8
- Chen, W., Zhang, C., Song, L., Sommerfeld, Milton, & Hu, Qiang. (2009). A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *Journal of Microbiological Methods*, 77(1), 41-47. doi:10.1016/j.mimet.2009.01.001
- Chini Zittelli, G., Rodolfi, L., Biondi, N., & Tredici, M. R. (2006). Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. *Aquaculture*, 261(3), 932–943.
- Chisti, Yusuf. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294-306. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.02.001

- Chisti, Yusuf. (2008). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*, 26(3), 126-131. doi:10.1016/j.tibtech.2007.12.002
- Day, J. G., Benson, E. E., & Fleck, R. A. (1999). In vitro culture and conservation of microalgae: Applications for aquaculture, biotechnology and environmental research. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 35(2), 127-136. doi:10.1007/s11627-999-0022-0
- Dismukes, G. C., Carrieri, D., Bennette, N., Ananyev, G. M., & Posewitz, M. C. (2008). Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Current opinion in biotechnology*, 19(3), 235–240.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2010). The State of Food Insecurity in the World. Hentet april 16, 2011, fra <http://www.fao.org/publications/sofi/en/>
- Ginzburg, B. Z. (1993). Liquid fuel (oil) from halophilic algae: a renewable source of non-polluting energy. *Renewable Energy*, 3(2-3), 249–252.
- Goldemberg, J. (2000). *World Energy Assessment: Energy and the challenge of sustainability*. United Nations Pubns.
- Gordon, J. M., & Polle, J. E. W. (2007). Ultrahigh bioproductivity from algae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(5), 969-975. doi:10.1007/s00253-007-1102-x
- Gressel, J. (2008). Transgenics are imperative for biofuel crops. *Plant Science*, 174(3), 246–263.
- Griffiths, M. J., & Harrison, S. T. L. (2009). Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, 21(5), 493-507. doi:10.1007/s10811-008-9392-7

- Groom, M. J., Gray, E. M., & Townsend, P. A. (2008). Biofuels and biodiversity: principles for creating better policies for biofuel production. *Conservation biology*, 22(3), 602–609.
- Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S., & Tiffany, D. (2006). Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(30), 11206.
- Hoffert, M. I., Caldeira, K., Jain, A. K., Haites, E. F., Harveyk, L. D. D., Potter, S. D., Schlesinger, M. E., mfl. (1993). Energy implications of future stabilization of atmospheric CO₂ content. *Nature* 363, 605, 607.
- Hoogwijk, M., Faaij, A., van den Broek, R., Berndes, G., Gielen, D., & Turkenburg, W. (2003). Exploration of the ranges of the global potential of biomass for energy. *Biomass and Bioenergy*, 25(2), 119-133. doi:10.1016/S0961-9534(02)00191-5
- Hossain, A. B. M. S., Salleh, A., Boyce, A. N., chowdhury, P., & Naquiuddin, M. (2008). Biodiesel Fuel Production from Algae as Renewable Energy. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 4(3), 250-254. doi:10.3844/ajbbbsp.2008.250.254
- Hsieh, C.-H., & Wu, W.-T. (2009). Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. *Bioresource Technology*, 100(17), 3921-3926. doi:10.1016/j.biortech.2009.03.019
- Hu, Qiang, Sommerfeld, Milton, Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., & Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*, 54(4), 621-639. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x
- Huisman, J., Matthijs, H. C. P., Visser, P. M., Balke, H., Sigon, C. A. M., Passarge, J., Weissing, F. J., mfl. (2002). Principles of the light-limited chemostat: theory and ecological applications. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81(1), 117–133.

- Huntley, M. E., & Redalje, D. G. (2006). CO₂ Mitigation and Renewable Oil from Photosynthetic Microbes: A New Appraisal. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 12(4), 573-608. doi:10.1007/s11027-006-7304-1
- Illman, A. M., Scragg, A. H., & Shales, S. W. (2000). Increase in Chlorella strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and microbial technology*, 27(8), 631–635.
- Khozin-Goldberg, I., & Cohen, Z. (2006). The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry*, 67(7), 696–701.
- Klass, D. L. (1998). *Biomass for renewable energy, fuels, and chemicals*. Academic Press.
- Kondili, E. M., & Kaldellis, J. K. (2007). Biofuel implementation in East Europe: Current status and future prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 11(9), 2137-2151. doi:10.1016/j.rser.2006.05.001
- Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C. Q., & Dubois-Calero, N. (2008). Biofuels from microalgae. *Biotechnology progress*, 24(4), 815–820.
- Lv, J.-M., Cheng, L.-H., Xu, X.-H., Zhang, L., & Chen, H.-L. (2010). Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresource Technology*, 101(17), 6797-6804. doi:10.1016/j.biortech.2010.03.120
- Ma, F., & Hanna, M. A. (1999). Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology*, 70(1), 1-15. doi:10.1016/S0960-8524(99)00025-5
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., & others. (2000). *Brock biology of microorganisms* (Bd. 608). Prentice Hall Upper Saddle River, NJ.
- Mairet, F., Bernard, O., Masci, P., Lacour, T., & Sciandra, A. (2010). Modelling neutral lipid production by the microalga *Isochrysis aff. galbana* under nitrogen limitation. *Bioresource technology*.

- Mazzuca Sobczuk, T., & Chisti, Yusuf. (2010). Potential fuel oils from the microalga *Choricystis minor*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85(1), 100-108. doi:10.1002/jctb.2272
- Metting, F. B. (1996). Biodiversity and application of microalgae. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 17(5-6), 477-489. doi:10.1007/BF01574779
- Miao, X., & Wu, Q. (2006). Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology*, 97(6), 841-846. doi:10.1016/j.biortech.2005.04.008
- Molina Grima, E., Belarbi, E. H., Ación Fernández, F. G., Robles Medina, A., & Chisti, Y. (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances*, 20(7-8), 491–515.
- Phillips Jr, J. N., & Myers, J. (1954). Growth Rate of *Chlorella* in Flashing Light. *Plant Physiology*, 29(2), 152.
- Posten, C., & Schaub, G. (2009). Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels--A process view. *Journal of Biotechnology*, 142(1), 64-69. doi:10.1016/j.jbiotec.2009.03.015
- Pruvost, J., Van Vooren, G., Cogne, G., & Legrand, J. (2009). Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. *Bioresource Technology*, 100(23), 5988-5995. doi:10.1016/j.biortech.2009.06.004
- Raja, R., Hemaiswarya, S., Kumar, N. A., Sridhar, S., & Rengasamy, R. (2008). A perspective on the biotechnological potential of microalgae. *Critical Reviews in Microbiology*, 34(2), 77–88.
- Ratledge, C. (2002). Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. *Biochemical Society Transactions*, 30(6), 1047–1049.

- Reitan, K. I., Rainuzzo, J. R., & Olsen, Y. (1994). EFFECT OF NUTRIENT LIMITATION ON FATTY ACID AND LIPID CONTENT OF MARINE MICROALGAE1. *Journal of Phycology*, 30(6), 972–979.
- Rodolfi, Liliana, Chini Zittelli, Graziella, Bassi, N., Padovani, G., Biondi, Natascia, Bonini, G., & Tredici, Mario R. (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(1), 100-112. doi:10.1002/bit.22033
- Roman-Leshkov, Y., Barrett, C. J., Liu, Z. Y., & Dumesic, J. A. (2007). Production of dimethylfuran for liquid fuels from biomass-derived carbohydrates. *Nature*, 447(7147), 982-985. doi:10.1038/nature05923
- Schenk, P. M., Thomas-Hall, S. R., Stephens, E., Marx, U. C., Mussgnug, J. H., Posten, C., Kruse, O., mfl. (2008). Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *BioEnergy Research*, 1(1), 20-43. doi:10.1007/s12155-008-9008-8
- Scott, S. A., Davey, M. P., Dennis, J. S., Horst, I., Howe, C. J., Lea-Smith, D. J., & Smith, A. G. (2010). Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(3), 277-286. doi:10.1016/j.copbio.2010.03.005
- Shay, E. G. (1993). Diesel fuel from vegetable oils: status and opportunities. *Biomass and Bioenergy*, 4(4), 227–242.
- Sheehan, J., & others. (1998). *A look back at the US Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from algae* (Bd. 328).
- Sims, R. E. H., Mabee, W., Saddler, J. N., & Taylor, M. (2010). An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresource technology*, 101(6), 1570–1580.

- Skulberg, O. M. (1964). Algal problems related to the eutrophication of European water supplies, and a bio-assay method to assess fertilizing influences of pollution on inland waters.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*, *101*(2), 87–96.
- Store norske leksikon, K. A. R. (2011, april 24). Elektrisitet - samfunnsmessig betydning. *Store norske leksikon, snl.no*. Hentet fra http://snl.no/elektrisitet/samfunnsmessig_betydning
- Tsukahara, K., & Sawayama, S. (2005). Liquid fuel production using microalgae. *J Jpn Petrol Inst*, *48*(5), 251–259.
- Wang, B., Li, Yanqun, Wu, Nan, & Lan, Christopher Q. (2008). CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *79*(5), 707-718. doi:10.1007/s00253-008-1518-y
- Williams, P. R. D., Inman, D., Aden, A., & Heath, G. A. (2009). Environmental and sustainability factors associated with next-generation biofuels in the US: what do we really know? *Environmental science & technology*, *43*(13), 4763–4775.
- Xin, L., Hong-Ying, H., Ke, G., & Ying-Xue, S. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource technology*, *101*(14), 5494–5500.
- Yang, J., Xu, M., Zhang, Xuezhi, Hu, Qiang, Sommerfeld, Milton, & Chen, Yongsheng. (2011). Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: Water footprint and nutrients balance. *Bioresource Technology*, *102*(1), 159-165. doi:10.1016/j.biortech.2010.07.017

Zhang, X., Hu, Q., Sommerfeld, M., Puruhito, E., & Chen, Y. (2010). Harvesting algal biomass for biofuels using ultrafiltration membranes. *Bioresource technology*, *101*(14), 5297–5304.

Appendiks A: Oppskrift på medium

Næringsrikt medium for dyrking av mikroalger i lysbegrenset kjemostat:

<u>Næringsstoff</u>	<u>Konsentrasjon (mg / L)</u>
NaNO ₃	1500
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O ¹	80
NaHCO ₃ ¹	80
MgSO ₄ ·7H ₂ O	75
CaCl ₂ ·2H ₂ O	36
Fe(III)(NH ₄) ₃ -citrate ¹	6
Citric acid	6
H ₃ BO ₃	4,3
MnCl ₂ ·4H ₂ O	2,7
Na ₂ EDTA	1,1
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,6
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,3
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,12
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,07

¹ Autoklavert separat og tilsatt etter nedkjøling til romtemperatur for å unngå utfelling.

Appendiks B: Java-kode

```
package ph1;

import com.phidgets.*;

import java.io.FileWriter;

import java.util.Date;

import java.text.DateFormat;

public class Main {

    public static void main(String args[]) throws Exception {

        int Ph1 = 125262;          // Phidget 8/8/8/ ID

        int sleeptime = 10000;    // 10s between readings

        int readings = 0;

        long t_current, t_end;

        long pump_on_time = 300000; // ms = 5 minutes on

        long pump_off_time = 3300000; // ms = 55 minutes off

        boolean pump_on = false;

        InterfaceKitPhidget ik = new InterfaceKitPhidget();

        ik.open(Ph1);

        System.out.println("Waiting for Phidget...");

        ik.waitForAttachment();

        System.out.println("Logger ready... ");

        System.out.println();

        FileWriter logger = new FileWriter("Ph1 " + (long) new Date().getTime() + ".txt");

        System.out.println("Logging started: " + (new Date()));

        System.out.println("Unplug Phidget to stop logging...");

        System.out.println();

        t_current = System.currentTimeMillis();

        t_end = t_current + pump_off_time;

        while (true) { // (ik.isAttached()) {

            if (ik.isAttached()) {

                String timeStamp = DateFormat.getDateTimeInstance(DateFormat.SHORT,
                    DateFormat.LONG).format(new Date());

                int light_0 = ik.getSensorValue(0);
```

```

int light_1 = ik.getSensorValue(1);

int light_2 = ik.getSensorValue(2);

double temp_1 = 0.2222 * ik.getSensorValue(3) - 61.11;

double pH_1 = 0.0178 * ik.getSensorValue(4) - 1.889;

double pH_2 = 0.0178 * ik.getSensorValue(5) - 1.889;

logger.write(timestamp);

logger.write("\t" + light_0);

logger.write("\t" + light_1);

logger.write("\t" + light_2);

logger.write("\t" + temp_1);

logger.write("\t" + pH_1);

logger.write("\t" + pH_2);

logger.write("\r\n");          }

readings++;

if (readings == 360) {          // Give life sign to console every hour

    System.out.print(".");      // And flush logger file buffer

    logger.flush();

    readings = 0;                }    // Turn pump on digital 0 on/off

t_current = System.currentTimeMillis();

if (t_current > t_end) {

    if (pump_on) {

        t_end = t_current + pump_off_time;

        ik.setOutputState(0, false);          }

    else {

        t_end = t_current + pump_on_time;

        ik.setOutputState(0, true);          }

    pump_on = !pump_on;                }

    Thread.sleep(sleeptime);          }

// System.out.println();

// System.out.println("Logging ended: " + (new Date()));

// logger.close();

// ik.close();

}}

```

Appendiks C: Protokoll flowcytometer

Protokoll fra rapporten:

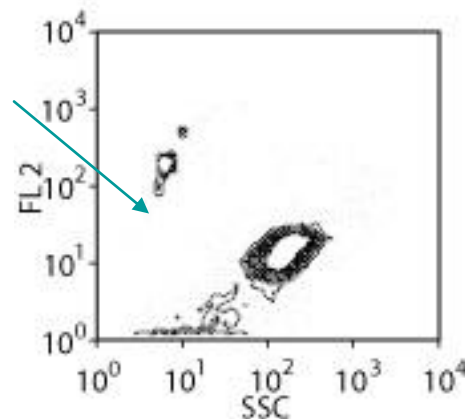
Vegsalt og planteplankton i innsjøer. Salt og biologiske tålegrenser

Biologisk Institutt, Universitetet i Oslo.

Det ble også tatt prøver for kvantitative tellinger med Flowcytometer (BD FACS Calibur flowcytometer). Flowcytometri gir vesentlig bedre kvantitative resultater enn manuell telling i mikroskop (Shapiro 1995). Blant annet fordi instrumentet har den egenskap at det kan telle svært mange celler på kort tid (opp mot 50.000/min.). For at flowcytometeret skal kunne benyttes effektivt, må prøven ha relativ høy celletetthet og ikke mer enn 2 til 3 arter i samme prøve.

1 ml planteplanktonprøve ble overført til 5 ml polystyrenrør (Falcon 352054), fiksert med 20 μ l 50 % glutaraldehyd (EM-grade) og oppbevart i kjøleskap. Før analyse i flowcytometeret, ble alle prøvene tilsatt en bestemt volum Fluorobrite rød 0,5 μ m kuler (Polysciences) som intern standard. Den eksakte mengde intern standard ble igjen beregnet ved hjelp av BD Truecount rør, dvs. prøverør med kjent eksakt antall kuler. Resultatene fra flowcytometeranalysene ble i etterkant behandlet med dataprogrammet CellQuest. Et eksempel på et todimensjonalt histogram av cellestørrelse mot klorofyllinnhold er vist nedenfor (fig 2.5).

Fig. 2.5 Todimensjonalt histogram som viser frekvensfordeling av celler i forhold til side-scatter (SSC) og fluorescens (FL2). Firkanten viser populasjonen av *Cryptomonas* sp. mens pilen viser intern standard (0,5 μ m kuler).



Appendiks D: CHN-analyse

Organic Elemental Analysis

Flash EA 1112 NC Analyzers

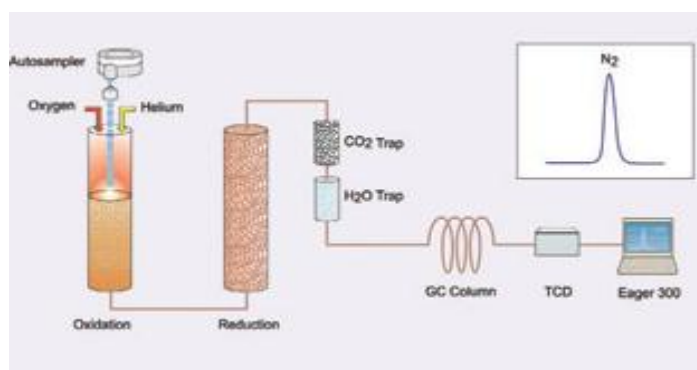
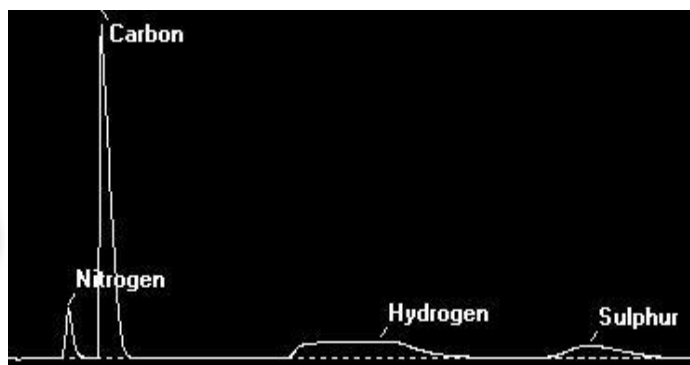
ThermoFisher
SCIENTIFIC

The world leader in serving science

Flash EA 1112 NC Analyzers deliver rapid, precise and environmental-friendly determinations of nitrogen and carbon in geological and agriculture materials such as soils, sediments or particulate materials obtained by filtration of sea, river, lake, or tap water. Unlike traditional techniques operations with Flash EA 1112 NC Analyzers does not involve any toxic or polluting substances.



Rapid method for routine work. Flash EA 1112 NC Analyzers are based on the well known Dynamic Flash Combustion which produced complete combustion of the sample followed by an accurate and precise determination of the elemental gases produced. The method is rapid, less than 5 minutes for a complete sample characterization.



Appendiks E: Rådata

*1=Nivå 1, *2=Nivå 2, I=Transmisjon, Klf=klorofyll mg/L, Cel=#celler/mL, NR=Nile Red

Time	I1	I2	Klf1	Klf2	Cel1	Cel2	NR1	NR2
07.04.11 14:44:18 CEST	1	1	0.48	0.3	313042	220359	NA	NA
08.04.11 11:16:08 CEST	0.975	0.982	0.49	0.38	603528	356554	NA	NA
09.04.11 14:47:48 CEST	0.84	0.911	1.22	0.6	2131714	764876	1743	NA
10.04.11 16:04:48 CEST	0.731	0.815	1.87	0.87	3963444	1374240	3128	1590
11.04.11 11:59:19 CEST	0.652	0.741	2.42	1.06	5250140	1813953	3765	1703
12.04.11 15:13:49 CEST	0.523	0.599	3.84	1.65	8005246	3746044	5157	2630
13.04.11 14:19:47 CEST	0.35	0.503	8.06	2.24	9572900	4861173	5187	3426
14.04.11 14:31:57 CEST	0.208	0.377	14.8	3.87	13300077	5947908	5200	3768
15.04.11 12:52:56 CEST	0.171	0.295	18.01	4.51	12532442	5804681	5807	2893
16.04.11 14:34:46 CEST	0.13	0.271	20.26	4.65	15216670	5730844	5502	2906
17.04.11 16:26:46 CEST	0.13	0.222	22.41	4.49	16810404	6418077	5913	3135
18.04.11 11:01:46 CEST	0.117	0.22	23.05	4.51	18606642	7019479	10634	3135
Time	I1	I2	Klf1	Klf2	Cel1	Cel2	NR1	NR2
19.04.11 14:01:07 CEST	0.997	0.998	0.28	0.29	250581	263484	NA	NA
20.04.11 15:44:07 CEST	0.875	0.885	1.18	0.57	1074895	351464	NA	NA
21.04.11 15:28:17 CEST	0.612	0.712	4.02	1.33	3297214	1088190	2160	NA
22.04.11 15:02:07 CEST	0.327	0.506	11.37	2.93	8217579	2708810	3692	1123
24.04.11 19:49:07 CEST	0.123	0.25	24.04	8.19	13538552	6230883	6096	3228
25.04.11 14:01:57 CEST	0.112	0.21	24.93	9.56	14196881	6369373	6067	2535
26.04.11 15:09:17 CEST	0.117	0.167	25.85	10.94	12978378	6888100	5506	2949
Time	I1	I2	Klf1	Klf2	Cel1	Cel2	NR1	NR2
27.04.11 15:52:33 CEST	1	0.965	0.39	0.42	216919	260968	NA	NA
28.04.11 14:11:33 CEST	0.915	0.893	0.76	0.54	777579	397954	NA	NA
29.04.11 12:42:23 CEST	0.7	0.755	2.65	0.97	2678568	848136	2373	NA
30.04.11 14:39:53 CEST	0.384	0.581	8.44	1.85	7165773	1960875	3041	1029
01.05.11 13:40:23 CEST	0.243	0.433	13.99	3.43	10013689	3385653	4615	1455
02.05.11 14:10:53 CEST	0.159	0.335	18.1	4.51	11355351	4672979	4560	1358
03.05.11 10:39:53 CEST	0.132	0.281	22.17	7.17	11279834	5758720	5128	2949

Tørrvekt1 g/L	Tørrvekt2 g/L	N1 g/L	N2 g/L	C1 g/L	C2 g/L
S1: 0.531	0.671	0.0411	0.0473	0.3022	0.34563
S2: 0.574	0.464	0.04681	0.03733	0.31504	0.25179
S3: 0.574	0.564	0.04559	0.04136	0.31346	0.28143