



Høgskulen  
på Vestlandet

# BACHELOROPPGAVE

Vekstutvikling til mikroalgen *Chlorella Vulgaris* ved dyrking i avløpsvann  
fra settefiskanlegg - Med litteraturstudie om potensialet for mikroalger som en  
ressurs i bioøkonomien i Norge

Growth development of the microalgae *Chlorella Vulgaris* grown in  
wastewater from a fish hatchery - With a literature study of the potential in  
microalgae as a resource in the Norwegian bio economy

**Fornybar Energi**  
**FE403**  
**Avdeling for Ingeniør og Naturfag**  
**1. JUNI**  
**20 921 ord**

**120 - HILDE SOLEND VINDEDAL**  
**114 - EIRIN MARIE SVENDAL KLEIVEN**

Jeg bekrefter at arbeidet er selvstendig utarbeidet, og at referanser/kildehenvisninger til alle kilder som er  
brukt i arbeidet er oppgitt, jfr. Forskrift om studium og eksamen ved Høgskulen på Vestlandet, § 10.

**Avtale om elektronisk publisering i Høgskulen på Vestlandet sitt institusjonelle arkiv (Brage)**

Jeg gir med dette Høgskulen på Vestlandet tillatelse til å publisere oppgaven (Skriv inn tittel) i Brage hvis karakteren A eller B er oppnådd.

Jeg garanterer at jeg er opphavsperson til oppgaven, sammen med eventuelle medforfattere. Opphavsrettslig beskyttet materiale er brukt med skriftlig tillatelse.

Jeg garanterer at oppgaven ikke inneholder materiale som kan stride mot gjeldende norsk rett.

Ved gruppeinnlevering må alle i gruppa samtykke i avtalen.

Fyll inn kandidatnummer og navn og sett kryss:

120 - Hilde Solend Vindedal

kandidatnummer og navn

JA  NEI

114 - Eirin Marie Svendal Kleiven

kandidatnummer og navn

JA  NEI

# Forord

Denne oppgaven er skrevet av to studenter ved Avdeling for Ingeniør - og Naturfag ved Høgskulen på Vestlandet (HVL). Oppgaven er den endelige avslutningen på bachelorstudiet Fornybar Energi.

I forbindelse med arbeidet med bacheloroppgaven vil vi takke Osland Havbruk AS for bruk av avløpsvann fra deres lokalitet. Vi vil også gjerne takke kontaktperson Sverrir Valdemarsson for å ha vært behjelpelig med frakt av avløpsvann og besvaring av spørsmål. Videre vil vi takke co-veileder, førsteamanuensis Torbjørn Dale, for hjelp med deler av oppgaven som omhandlet hans fagfelt som marinbiolog.

En spesiell takk blir gitt til førsteamanuensis og veileder Geoffrey Sean Gilpin for gode faglige råd gjennom hele oppgaven, og stort engasjement rundt oppgaven. Vi vil også gjerne takke for hjelp med utforming av forsøk.

Takk til familie og venner som har tatt seg tid til å hjelpe med korrekturlesing og struktur.

Til slutt vil vi takke Høgskulen på Vestlandet for finansiering av oppgaven.

Sogndal, våren 2017

Hilde Solend Vindedal

Eirin Marie Svendal Kleiven

# Sammendrag

For å oppnå et bærekraftig samfunn i en verden med klimaendringer, økende befolkningsvekst og et økende energibehov, er en omstilling til mer miljøvennlige energiformer essensielt. En er derfor avhengig av fornybare energikilder som en erstatning til fossil energi. Siden strøm alene ikke greier å møte energibehovet er en avhengig av et utvalg av energiformer. Blant disse har biodrivstoff et potensiale som en erstatning for deler av energibehovet som i dag dekkes av fossile kilder.

Da første- og andre generasjon biodrivstoff innehar etiske og teknologiske begrensninger, er det en tredje generasjon under utvikling. Denne generasjonen omhandler biodrivstoff fra mikro- og makroalger, der potensiale til mikroalger som en ressurs vil bli fokusert på i denne oppgaven. Med bakgrunn i dette, er det overordnede målet med oppgaven å tilegne seg kunnskap om prosessen ved dyrking av mikroalger i laboratorium. En skal produsere biomasse, hvor tanken er at biomassen skal kunne blitt brukt til energiformål. Ved å bruke avløpsvann fra settefiskanlegg vil en se på muligheten for å rense avløpsvannet, som er et av mikroalgers mange potensialer. Potensialet vil så bli undersøkt videre ved å se på mikroalger som en ressurs i bioøkonomien i Norge.

Problemstillingene i oppgaven vil være:

- I. Hvordan er veksten til *Chlorella Vulgaris* ved dyrking i avløpsvann fra settefiskanlegg, ved optimal temperatur og lysintensitet?*
- II. Hvordan påvirkes veksten til *Chlorella Vulgaris* ved dyrking i avløpsvann fra settefiskanlegg, ved begrenset temperatur og lysintensitet?*
- III. Hva er potensialet for mikroalger som en ressurs i bioøkonomien i Norge?*

De to første problemstillingene vil bli besvart med en naturvitenskapelig forskningsmetode, problemstilling tre vil ha en litteraturbasert tilnærming.

For å svare på de to første problemstillingene ble det gjennomført tre forsøk. I forsøk 1 ble mikroalgen *Chlorella Vulgaris* dyrket ved optimal temperatur og lysintensitet på 22°C +/- 2 °C og 2 400 lx. Det påfølgende forsøket hadde så optimal temperatur, men begrenset lysintensitet

til 1 200 lx. Det siste forsøket hadde optimal lysintensitet, men en temperatur som var begrenset til 15°C +/- 2 °C. Natt temperaturen ble innstilt til 15°C +/- 2 °C i alle forsøkene. For å se på veksten av *Chlorella Vulgaris* ble det gjennomført måling av vekt, turbiditet og næringsinnhold i forsøkene.

Resultatet fra forsøket viste at i forsøk 1 var det en jevn økning i turbiditet og vekt i tillegg til en tydelig reduksjon i fosfor. Ved forsøk 2 var verdiene for turbiditet noe varierende og lavere enn ved forsøk 1. Vektøkningen var forholdsvis jevn, men likevel lavere enn ved forsøk 1. For fosfor var nedgangen var tydelig også ved forsøk 2, men svakere enn det tidligere forsøket. I forsøk 3 var turbiditeten minst, med store variasjoner i målte verdier. Det samme gjaldt for vektøkning og fosfor-nedgang. Også her var resultatene varierende, men med lavere verdier enn de to tidligere forsøkene.

I forsøkene kom en frem til at *Chlorella Vulgaris* kunne dyrkes i avløpsvann fra settefiskanlegg. Ved optimale forhold var det forutsetninger for vekst. Forutsetningen for vekst er også gjeldende ved begrenset lysintensitet, men da svekket i forhold til optimale forhold. Ved begrenset temperaturforhold var det reduserte vekstforhold.

Det ble i tillegg til forsøket gjennomført litteraturstudie for å undersøke hvordan potensialet til mikroalger som ressurs er i den norske bioøkonomien. Mikroalger som bioenergi er ikke ny forskning, men de siste årene har interessen for ressursen økt. Spesielt som en ressurs til produksjon av biodrivstoff, som en erstatning for fossilt drivstoff. Det er flere selskaper i Norge som jobber med å utvikle mikroalger som en ressurs. For at produksjonen av mikroalger til biodrivstoff skal bli økonomisk gunstig er det viktig med videre utvikling av teknologien, og satsing på storskala prosjekter. Selskapene etterspør derfor en forutsigbar politikk. Det er også viktig å forske videre på konsepter som kan styrke økonomien. En løsning kan være bioraffineri, hvor en produserer ulike produkter fra mikroalger i tillegg til biodrivstoff. Det kan også kombineres med avløpsvann eller CO<sub>2</sub>-fangst.

# Abstract

To achieve a sustainable society in a world with climate changes, increased population growth and an increasing energy demand, a switch towards environmentally friendly energy sources are essential. By that, we need renewable energy sources as a replacement for fossil fuels. Since electricity alone is not able to meet the needs for the growing demand, we are dependent on energy in different forms. Among these, biofuels have a potential to replace parts of the demand covered by fossil fuels today.

Since first generation biofuels may have ethical and technological limitations, a third generation is under development. This generation accounts for biofuels from micro- and macroalgae, where the potential for microalgae as a resource will be further investigated in this assessment. With this in mind, the main target for this assessment is to gain knowledge about the process in which microalgae is grown. The overlying aim for the produced biomass will be biofuel production. By using wastewater from a fish hatchery, we will look into the possibility of treating wastewater, which is one of microalgae's great potential. Microalgae's potential as a resource in the Norwegian bio economy will be further investigated.

Issues for this thesis will be:

- I. *How is the growth of Chlorella Vulgaris in wastewater from a fish hatchery, with optimal temperature conditions and light intensity?*
- II. *How is the growth of Chlorella Vulgaris in wastewater from a fish hatchery affected by limited temperature conditions and light intensity?*
- III. *What is the potential for microalgae as a resource in the Norwegian bio economy?*

The two first issues will be answered by a scientific research method, while the third issue will be answered by a literature approach.

To answer the first two issues three experiments were implemented. In experiment 1 the microalgae *Chlorella Vulgaris* was grown with optimal temperature conditions and light intensity at 22°C +/- 2 °C and 2 400 lx. The following experiment was implemented with optimal temperature conditions and a limited light intensity to 1 200 lx. The last experiment

had optimal light intensity and limited temperature condition to 15°C +/- 2 °C. The night temperature was set to 15°C +/- 2 °C in all experiments. To look at the growth of *Chlorella Vulgaris* measurements of turbidity, weight and nutrients concentrations were implemented in each experiment. In experiment 1, the results showed an even increase in turbidity and weight, and a significant reduction in phosphor. In experiment 2 the values for turbidity was varying and lower than in the previous experiment. The weight was even, but still lower than in experiment 1. The same accounts for phosphor where the reduction was lower than in the previous experiment. In experiment 3, the turbidity was the lowest with large variations. The same accounts for weight and phosphor reduction.

Throughout the experiments, it was found that *Chlorella Vulgaris* can be grown in wastewater from a fish hatchery. With optimal conditions, there was assumptions for growth. The assumptions is also present for limited light intensity, but weakened in relation to optimal conditions. With limited temperature conditions, the growth was limited.

In addition to the experiment, a literature study was implemented to investigate the potential of microalgae as a resource in the Norwegian bio economy. Bioenergy from microalgae is not new within science, but the last years the interest for this resource have increased. In particular as biofuel as a replacement for fossil fuels. Several Norwegian companies are working towards further developing of microalgae as a recourse. By that companies demand predictable politic. To attain an economical production from microalgae, further development of technology and focus on large-scale production is a priority. One solution can be the concept of biorefinery, where several products are produced from microalgae in addition to biofuels. This can also be combined with wastewater treatment or CO<sub>2</sub>-capture.

# INNHALDSFORTEGNELSE

|  |           |
|--|-----------|
| FORORD .....   | III       |
| SAMMENDRAG .....   | IV        |
| ABSTRACT .....   | VI        |
| FIGUR LISTE.....   | XI        |
| TABELL LISTE .....   | XI        |
| <b>1. INNLEDNING.....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>2. BAKGRUNN .....</b>   | <b>8</b>  |
| 2.1 BAKGRUNN FOR FORSØKET .....  | 8         |
| 2.2 KUNNSKAPSSTATUS FOR MIKROALGER I VERDEN OG NORGE .....   | 10        |
| 2.3 PROBLEMSTILLING.....   | 13        |
| <b>3. OPPBYGNING AV FORSØK, MATERIALE OG METODE.....</b>   | <b>14</b> |
| 3.1 OPPBYGNING AV FORSØK .....   | 14        |
| 3.2 MATERIALE.....   | 18        |
| 3.3 METODE .....   | 21        |
| 3.3.1 <i>Vekstmedium</i> .....   | 21        |
| 3.3.2 <i>Algekultur</i> .....  | 24        |
| 3.3.3 <i>Gjennomføring av forsøk og datainnsamling</i> .....   | 27        |
| <b>4. RESULTATER OG OBSERVASJONER .....</b>  | <b>33</b> |
| 4.1 RESULTATER.....  | 33        |
| 4.2 OBSERVASJONER.....   | 38        |
| <b>5. DISKUSJON .....</b>  | <b>41</b> |
| 5.1 DISKUSJON AV RESULTATENE .....   | 41        |
| 5.2 GRADERING AV USIKKERHETER .....  | 43        |
| 5.3 RENSING AV AVLØPSVANN .....  | 47        |
| 5.4 MIKROALGER SOM RESSURS I BIOØKONOMIEN .....  | 49        |
| <b>6. KONKLUSJON.....</b>  | <b>53</b> |
| <b>7. REFLEKSJON RUNDT EGET ARBEID .....</b>   | <b>54</b> |
| <b>8. REFERANSELISTE.....</b>  | <b>55</b> |
| <b>9. VEDLEGG .....</b>  | <b>60</b> |
| VEDLEGG 1: TEMPERATURJUSTERING MED SMARTCELLA STYRINGSSENTRAL (DAGTEMPERATUR) .....                      | 60        |
| VEDLEGG 2: TEMPERATURJUSTERING MED RIVA COLD STYRINGSSENTRAL (NATT-TEMPERATUR).....                      | 60        |
| VEDLEGG 3: DØGN- OG UKESYKULUS JUSTERING MED MICROTIME .....   | 61        |
| VEDLEGG 4: BEREGNING AV MENGDE VEKSTMEDIUM TIL FORSØKENE .....   | 62        |
| VEDLEGG 5: <i>EGLUENA GRACILIS</i> MEDIUM OG <i>JAWORSKI'S</i> MEDIUM .....                              | 62        |
| VEDLEGG 6: RÅDATA FOR TURBIDITET .....   | 65        |
| VEDLEGG 7: RÅDATA FOR HØSTET ALGEMASSE .....   | 66        |
| VEDLEGG 8: RÅDATA FOR NITROGENMÅLINGER .....   | 68        |
| VEDLEGG 9: RÅDATA FOR FOSFORMÅLINGER.....  | 69        |
| VEDLEGG 10: STORT FORMAT AV FIGURER SOM VISER TURBIDITET, HØSTET ALGEMASSE OG FOSFOR KONSENTRASJON ..... | 69        |



## Figur liste

|   |    |
|---|----|
| FIGUR 1: FIGUREN ILLUSTRERER ÅRLIG MENNESKELIG UTSLIPP AV DRIVHUSGASSER TIL ATMOSFÆREN, I PERIODEN 1970-2010..... | 2  |
| FIGUR 2 : TOTALT SLUTTFORBRUK AV ENERGI ETTER ENERGIVARE I 2015 OPPGITT I PROSENT. ....                           | 5  |
| FIGUR 3: KLIMAROM .....   | 17 |
| FIGUR 4: SMARTCELLA TEMPERATURSTYRER.....   | 17 |
| FIGUR 5: RIVACOLD NATT-TEMPERATURSTYRER.....  | 17 |
| FIGUR 6: MICROTOME INTERVALLJUSTERING FOR LYS-SYKLUS .....  | 18 |
| FIGUR 7: FLASKENE SOM BLE BRUKT FOR OPPBEVARING AV VEKSTMEDIUM VED NEDFRYSING. ....                               | 21 |
| FIGUR 8: FILTRERING AV VEKSTMEDIUM GJENNOM FILTER MED MASKESTØRRELSE 25MM.....                                    | 22 |
| FIGUR 9: FILTRERING AV VEKSTMEDIUM GJENNOM MILLIPORE FILTRERINGS-OPPSETT .....                                    | 22 |
| FIGUR 10: TRYKKOKER TIL AUTOKLAVERING AV VEKSTMEDIUM.....   | 23 |
| FIGUR 11: VEKT BRUKT UNDER AUTOKLAVERING AV VEKSTMEDIUM .....   | 23 |
| FIGUR 12: DE SEKS BEHOLDERNE MED 5 ML ALGEKULTUR I HVER, VED LEVERING .....                                       | 24 |
| FIGUR 13: VISER EN A-RUTE, SOM IGJEN BESTÅR AV FLERE B-RUTER .....  | 25 |
| FIGUR 14: VISER HVORDAN EN C- OG D-RUTE ER EN DEL AV EN B-RUTE.....   | 25 |
| FIGUR 15: TURBIDITETS MÅLER AV TYPEN HACH, RATIO TURBIDIMETER .....   | 28 |
| FIGUR 16: DYRKET ALGEKULTUR FORDELT PÅ TRE GLASSFLASKER FOR MÅLING AV TURBIDITET.....                             | 28 |
| FIGUR 17: FILTRERING AV ALGER GJENNOM GLASSFIBERFILTER .....  | 29 |
| FIGUR 18: EKSIKATOR FOR OPPBEVARING AV GLASSFIBERFILTER .....   | 29 |
| FIGUR 19: TERMAKS TØRKEOVN SOM BLE BRUKT TIL TØRKING AV GLASSFIBERFILTER .....                                    | 29 |
| FIGUR 20: VEKT AV TYPEN HAUS, ANALYTICAL PLUS .....   | 29 |
| FIGUR 21: RED SEA ALGAE CONTROL PRO TEST KIT.....   | 30 |
| FIGUR 22: TESTING AV NITROGEN MED NITRATE PRO TEST KIT .....  | 31 |
| FIGUR 23: AVLESING AV NITROGENKONSENTRASJON.....  | 31 |
| FIGUR 24: TESTING AV FOSFOR MED PHOSPHATE PRO TEST KIT .....  | 32 |
| FIGUR 25: AVLESING AV FOSFORKONSENTRASJON .....   | 32 |
| FIGUR 26: TURBIDITET FOR FORSØK 1, 2 OG 3 .....   | 34 |
| FIGUR 27: GRAM HØSTET ALGEMASSE FRA FORSØK 1, 2 OG 3 PER 100 G VEKSTMEDIUM.....                                   | 35 |
| FIGUR 28: KONSENTRASJON AV FOSFOR I VEKSTMEDIUM VED FORSØK 1, 2 OG 3 .....  | 37 |
| FIGUR 29: VISER HVORDAN ALGEKULTUREN HAR UTVIKLET SEG FREM TIL DAG 10 I FORSØK 1, 2 OG 3. (FRA VENSTRE) .....     | 38 |
| FIGUR 30: GLASSFIBERFILTER MED ALGEKULTUR SOM VISER FARGEUTVIKLINGEN GJENNOM FORSØK 1, 2 OG 3 .....               | 39 |
| FIGUR 31: TYDELIG FARGEVARIASJON MELLOM FLASKE 8 OG 9 VED DAG 10. FORSØK 2.....                                   | 40 |
| FIGUR 32: VISER ALGEKULTUR SOM ER UTBLANDET I ELVEVANN ETTER 2 DAGER .....  | 40 |
| FIGUR 33: VISER ALGEKULTUR SOM ER UTBLANDET I ELVEVANN ETTER 15 DAGER .....                                       | 40 |

## Tabell liste

|  |    |
|--|----|
| TABELL 1: VISER VALG AV ALGE, LYSINTENSITET, LYS-SYKLUS, TEMPERATURER (DAG/NATT) FOR FORSØK 1, 2 OG 3..... | 16 |
| TABELL 2: VISER OPPBEVARINGSFORHOLDENE TIL ALGEKULTUREN.....   | 25 |
| TABELL 3: SPESIFIKKE VERDIER FOR PUNKTENE I FIGUREN SOM PRESENTERER TURBIDITET .....                       | 34 |
| TABELL 4: SPESIFIKKE VERDIER FOR PUNKTENE I FIGUREN SOM PRESENTERER HØSTET ALGEMASSE .....                 | 35 |
| TABELL 5: SPESIFIKKE VERDIER FOR PUNKTENE I FIGUREN SOM PRESENTERER FOSFOR KONSENTRASJON .....             | 37 |
| TABELL 6: NITROGEN OG FOSFOR I ULIKE FORMER I MEDIET EG:JM .....   | 43 |
| TABELL 7: HVILKEN DAG FLASKENE BLE TATT UT FRA KLIMAROM VED FORSØK 3 .....                                 | 45 |
| TABELL 8: GRADERING AV USIKKERHETER VED GJENNOMFØRING AV METODE .....                                      | 46 |

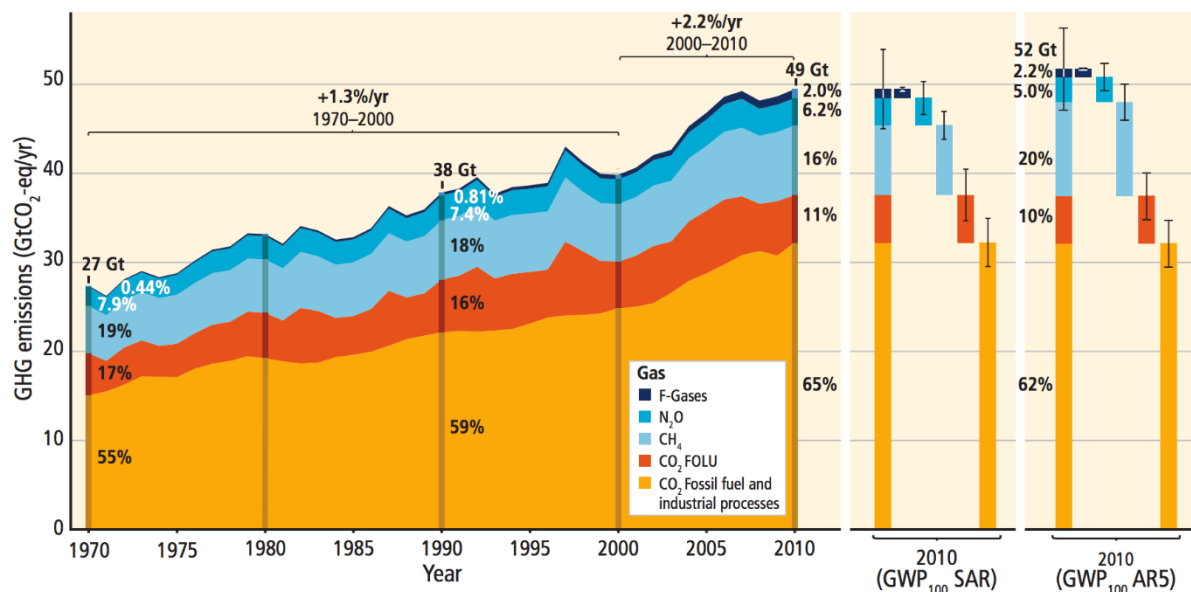
# 1. Innledning

Omfanget av menneskers inngrep i naturen øker, og virkningene sprer seg over landegrensene. Mennesker manglende evne til å tilpasse seg hva jorden kan tåle i det lange løp, har nå ført til at klimaet endres (Brundtland & Dahl, 1987).

Klima blir definert som vær over en tidsperiode, hvor Meteorologisk institutt bruker 30 år som en normalperiode for beregning (Dannevig & Harstveit, 2017; Harstveit, 2009, 14.02). Klimaet blir påvirket av ulike naturlige svingninger. De kan ha forskjellige tilbakekoblingsmekanismer som reduserer eller forsterker endringene (Norsk Polarinstitutt, 2014, 04.03). Da det de siste tiårene har vært en drastisk økning i menneskeskapte utslipp av spesielt CO<sub>2</sub>, er også mennesker ansvarlig for de klimatiske endringene verden står ovenfor i dag. Dette kommer frem i IPCC sin rapport fra 2014, hvor de konstaterer at det pågår klimaendringer forårsaket av menneskelig innblanding (IPCC, 2014a).

Den største årsaken til klimaendringer generert av menneskene er fra energiutvinning av fossile brennstoff, som olje, kull og gass. Det har ført til en høy konsentrasjon av klimagasser i atmosfæren, og blir av IPCC definert som karbondioksid, metan, dinitrogenoksid, og fluorholdige gasser (IPCC, 2014b). Konsentrasjonen av karbondioksid, metan og dinitrogenoksid i atmosfæren er unik for de siste 800 000 årene (IPCC, 2014b). For høy konsentrasjon av gassene har resultert i at utstråling fra jorden blir hindret, og fører til at jordens overflate blir varmere (Alfsen, Hessen, & Jansen, 2013). Fra 1970 til 2010 medvirket CO<sub>2</sub> utslipp fra fossilt brensel og industriprosesser for 78% av den totale økningen i drivhusgasser (Figur 1) Selv om perioden 2000-2010 var preget av flere politiske avtaler om utslippsreduksjoner, er dette den perioden i historien hvor utslippene har vært høyest (IPCC, 2014c).

## Totalt årlig menneskelig utslipp av drivhusgasser fra perioden 1970-2010



Figur 1: Figuren illustrerer årlig menneskelig utslipp (gigaton CO<sub>2</sub>-ekvivalenter per år) av drivhusgasser til atmosfæren, i perioden 1970-2010. Figuren er kategorisert ut ifra gasser: CO<sub>2</sub> fra fossilt drivstoff og industrielle prosesser; CO<sub>2</sub> fra skogsindustri og annen arealbruk (FOLU); Metan (CH<sub>4</sub>); Dinitrogenoksid (N<sub>2</sub>O); Fluorholdige gasser som ble regulert under Kyoto-avtalen (F-gasser/F-gasser) (IPCC, 2014b).

Endringene i klimaet fører til at temperaturen i havet og på jorden stiger, isen på Grønland og Antarktis smelter, noe som igjen medfører at havnivået stiger. Det er også ventet mer ekstremvær i fremtiden (IPCC, 2014b). Konsekvensene av endringene kan ifølge FNs klimapanel føre til ødeleggelse av økosystemer og tap av naturmangfold. Det vil kunne påvirke vannressurser og matproduksjon. Dårligere tilgang til rent vann og landområder som er egnet til matproduksjon, vil føre til helseproblemer og større konflikter. Nevnte konsekvenser vil sammenlagt føre til større økonomiske ulikheter, og ramme de fattige i verden hardest (IPCC, 2014a).

En mer bærekraftig utvikling kan være en av løsningene på problemene verden står overfor i dag. Bærekraftig utvikling blir definert som "En utvikling som imøtekommer dagens behov uten å ødelegge mulighetene for at kommende generasjoner skal få dekket sine behov" (Brundtland & Dahl, 1987) Siden 1987 har temaet bærekraftig utvikling fått større fokus i politikk og samfunn, og i 2015 kom FN med 17 bærekraftsmål. De skal være en felles arbeidsplan, hvor en skal utrydde fattigdom, bekjempe ulikhet og stoppe klimaendringer innen 2030. Det er mål som er avhengig av hverandre, og omhandler miljø, økonomi og sosiale forhold. Målene er tett sammenknyttet, og kan ikke oppnås isolert (FN-Sambandet, 2016, 04.04). Et av

bærekraftsmålene innebærer å *stoppe klimaendringene*. For at dette skal gjennomføres er det avgjørende med en drastisk reduksjon i CO<sub>2</sub>-utslipp, samt utvikling av teknologi for fanging og lagring av CO<sub>2</sub>. Større satsing på fornybare energikilder er også en viktig del av denne utviklingen (FN-sambandet, 2016a). Satsing på fornybare energikilder og velfungerende energisystemer er nødvendig for å lykkes med en videre utvikling av bærekraftige samfunn. Dette har høy prioritet da *Bærekraftige byer og samfunn*, og *Ren energi* er to egne bærekraftsmål (FN-Sambandet, 2016b, 2016c).

For å oppnå bærekraftige samfunn i dagens globale verden, er en avhengig av en utvikling med mer miljøvennlige drivstoff og transportformer. Transportsektoren er svært energikrevende, og stod ifølge IPCC for 27% av verdens totale energiforbruk i 2010. Det høye forbruket av energi fører til store utslipp av menneskeskapt klimagasser, og fra 2000-2010 stod transportsektoren for 11% av disse utslippene (IPCC, 2014c). Ved å effektivisere transportsektoren og satse på utvikling av drivstoff fra fornybare energikilder vil en redusere utslippene. Med fornybar energi mener en energistrømmer i naturens kretsløp, som kontinuerlig får ny tilførsel av energi, og som fornyes i samme rate som de blir brukt. Hovedkilden til fornybar energi er solen og dens stråling. Solenergi kan bli konvertert til energi direkte, eller indirekte gjennom andre energiformer som eksempelvis vannkraft, vindkraft, bølgekraft og bioenergi. Tidevannsenergi og geotermisk energi er også former for fornybar energi, men har ikke sin opprinnelse fra solen (Boyle, 2012, s. 14-17). I 2014 var 14,1% av verdens energiproduksjon fra fornybare energikilder (IEA, 2016).

Utviklingen av fornybar energi, skjer ikke like raskt som forventet. Markedet er økonomi-styrt, og høye priser er et hinder for produksjon av fornybar energi. Uten subsidier og annen støtte til fornybar energi, blir den store tilgangen til billigere energi fra fossile kilder foretrukket (Myher, 2015, s. 269). Norge har gjennom direktiver og avtaler forpliktet seg til å motarbeide klimaendringer, samt å øke satsingen på fornybar energi. En viktig del av den norske klimapolitikken er forpliktelsene en innehar gjennom Kyotoprotokollen fra 1997, og Kyoto 2-avtalen fra 2012 (Regjeringen, 2016, 29.12a). Norge er her forpliktet til å kutte utslipp av CO<sub>2</sub> med 30% i 2020 sammenlignet med 1990 (Klima- og miljødepartementet, 2015). Den viktigste klimaavtalen i verden i dag er Parisavtalen (Regjeringen, 2016, 29.12b), som trådte i kraft i november 2016 (Norway INDC, 2015, 24.03 ). Det er den første globale klimaavtalen som er rettslig bindende, og gjelder alle land som frivillig har skrevet under på avtalen. Hovedfokuset er å hindre at den globale temperaturen stiger med mer enn 2 grader, og prøve å begrense

stigningen til 1,5 grader sammenlignet med det førindustrielle nivået. Et annet hovedmål er at i løpet av andre del av århundre skal verden være klimanøytral (United nation, 2015).

I 2009 ble det opprettet et fornybardirektiv i EU for å få en overordnet politikk på fornybar energiproduksjon. Hovedmålet er at 20% av det totale energiforbruket skal være fra fornybar energi, og 10% av det totale drivstoff forbruket skal være fornybart (EU, 2009). Norge ble deltakende i 2011, da direktivet ble en del av EØS avtalen. Gjennom avtalen hadde Norge som mål å øke andelen fornybar energi til 67,5% av den totale energiproduksjonen i landet innen utgangen av 2020 i. Dette ble oppnådd i 2014, da andelen var på 69,4% (Eurostart, 2017). EU er i dag også på god vei til å klare hovedmålet, etter en stor økning i andel produsert fornybar energi de siste årene (Eurostart, 2017, 15.03).

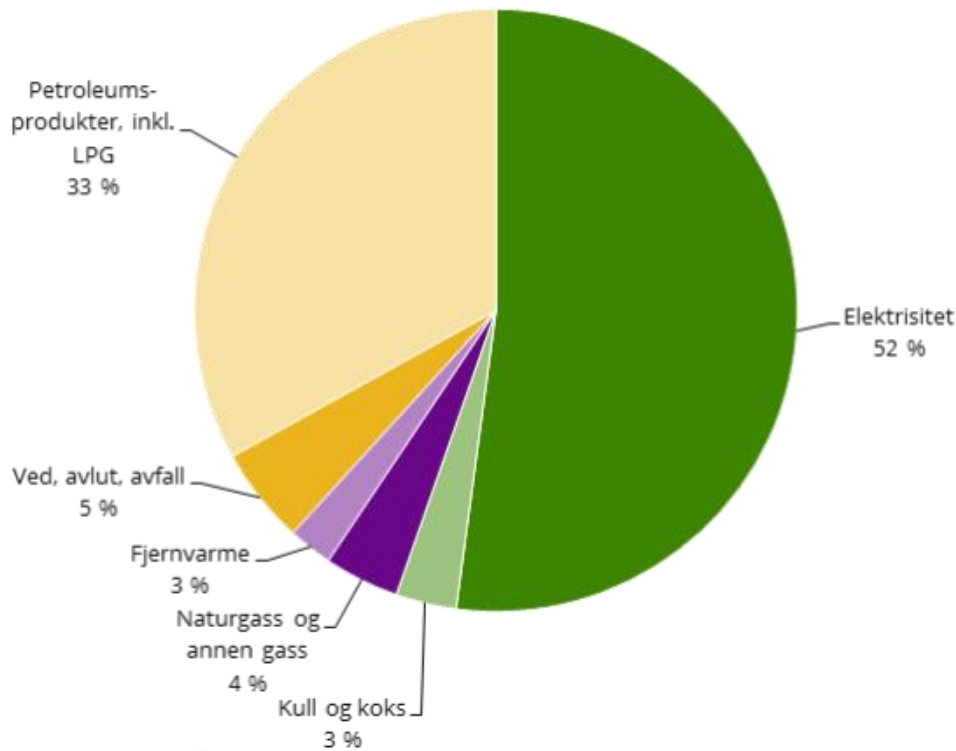
Selv om det har vært en økning i produsert fornybar energi, har en fortsatt et satsingsproblem grunnet variabel energitilførsel. Det kan til tider være dårlig samsvar mellom tilgang og energibehov. For å løse det må en produsere energi fra flere kilder som samlet kan møte behovet. Fra vann- og vindkraft kan en produsere store mengder strøm, men en er avhengig av energiformer som kan møte behovet som strøm ikke klarer å dekke. Biodrivstoff har et potensiale som en erstatning for deler av energibehovet som i dag dekkes av fossile kilder.

Bioenergi er energi utvunnet fra organisk materiale, som ved, planter og matavfall. Ettersom planter forbruker like mye av CO<sub>2</sub> og O<sub>2</sub> som de avgir, er biomassen en fornybar ressurs hvis raten som blir konsumert er mindre enn raten som blir revegetert (Boyle, 2012, s. 16). Grunnlaget for produksjonen er fotosyntese, en prosess hvor klorofyllet til plantene bruker solenergi til å produsere glukose fra vann og karbondioksid. Glukose er grunnlaget for biomasseen sitt innhold av stivelse, lipider, cellulose og protein.



I 2014 stod bioenergi for 10,3 % av verdens energiproduksjon (IEA, 2016). Mesteparten av den produserte bioenergien er nyttet til varmeenergi, men utgjør også en stor andel av noen lands energitilførsel i form av biogass, bioetanol og biodiesel (Boyle, 2012, s. 16). I 2015 hadde Norge et samlet energiforbruk på 213 TWh (ekskludert råstoff). Av dette var 8,1 % fra biodrivstoff og fjernvarme (ved, avlut, avfall 5 % og fjernvarme 3 %) (Figur 2). Nesten all bruk av fossil brensel i Norge går til drivstoff i transportsektoren, men det brukes også biodiesel, biogass og strøm. I 2015 var forbruket av dette på 4,1% (SSB, 2016, 18.10).

## Totalt sluttforbruk av energi etter energivare 2015



Figur 2 : Totalt sluttforbruk av energi etter energivare i 2015 oppgitt i prosent (SSB, 2016, 18.10).

Biodrivstoff blir klassifisert i første, andre, tredje og fjerde generasjon på bakgrunn av hvor materialet stammer fra. Første generasjon er i dag økonomisk å dyrke i store kvantum (Brennan & Owende, 2010) og produseres av sukker, stivelse, vegetabilsk olje eller dyrefett. Fordelen med nevnte biologiske materialer er et stort innhold av sukker og olje, der selve prosessen med å utvinne energien er lite energikrevende. Materialer som eksempelvis havre, mais, soyabønner og sukker er potensielle kilder for mat. Ved bruk av primærprodukter til produksjon av bioenergi, vil en kunne skape konkurranse for matproduksjon og påvirke det globale matmarkedet (Cherubini, 2010). Det vil trolig gi negativ innvirkning på matsikkerhet, hvor de allerede mest sårbare regionene vil bli hardest rammet (Brennan & Owende, 2010). Ettersom potensialet er begrenset til områder med god dyrkbar jord, kan også produkter som ikke er egnet til mat komme i konflikt med matproduksjon. En bekymring ligger også i selve CO<sub>2</sub> besparelsen. Ved å erstatte fossilt brensel med bioenergi kan en få reduksjon i utslippsmengden

av drivhusgasser. Det er likevel viktig å ta med i betraktningen at indirekte energitap gjennom dyrking og konverteringsprosesser vil redusere total energibesparelse (Cherubini, 2010).

Da første generasjon biodrivstoff innehar begrensninger, har det ført til videreutvikling av teknologien slik at andre materialer kan brukes som råstoff (Brennan & Owende, 2010).

Denne nye generasjonen tar utgangspunkt i materiale laget av lignocellulose, og omtales som andre generasjon biodrivstoff. Lignocellulose er et materiale som ikke er egnet for matproduksjon. Dette innebærer utnyttelse av rester, avfall og overflødig materiale fra landbruk- og skognæringen, men også avlinger dedikert til bioenergi. Teknologien gjør det mulig å utnytte alle deler av planten. Det er svært gunstig da etterspørselen i stor grad vil gjelde allerede tilgjengelig materialer, i form av avfall og rester. Dette vil redusere energitap i berørte industrier og effektivisere energiutnyttelsen (Cherubini, 2010). For at prosessen skal være økonomisk gunstig, er det likevel nødvendig med videre utvikling av prosesser og teknologi (Brennan & Owende, 2010; Cherubini, 2010)

For at bioenergi som en ressurs skal være bærekraftig, er det visse økonomiske og tekniske betingelser som må innfris. Produksjonen må være økonomisk konkurransedyktig med fossilt drivstoff, det må resultere i en lav til ingen utvidet bruk av areal, en minimal bruk av vannressurser og forbedret luftkvalitet. Da verken første eller andre generasjon bioenergi alene kan innfri disse kravene, er enda en generasjon under utvikling (Brennan & Owende, 2010). Tredje generasjons drivstoff er utvunnet fra marin biomasse fra makro- og mikroalger. Fordelen med å bruke alger som råmateriale er at en kan få en miljøvennlig produksjon ved begrenset bruk av ressurser. Makroalger er flercellede organismer som er sammensatt av fiber eller enkle vev, for eksempel tang, tare eller sjøgress. Mikroalger er encellede organismer, mindre enn 0,4 mm i diameter, som kan eksistere både individuelt eller i kolonier som danner grupper eller kjeder (Guiry, 2012). Sammenlignet med andre oljerike avlinger som rapsfrø, er mikroalger ikke avhengig av sesongbasert dyrking, og kan derfor gi avkastninger hele året. Selv om de vokser akvatisk, og da er avhengig av vann for vekst, er vannforbruket mindre enn ved landbaserte planter. Mikroalger bruker derfor begrenset mengde ferskvann (Brennan & Owende, 2010). På samme tid tåler de en rekke forhold med ulik næring og saltinnhold, og er ikke avhengig av tilsetning av ekstra næring eller bruk av dyrkbare landområder. Dermed unngår en konflikt med det biologiske mangfoldet og matproduksjon (Alaswad, Dassisti, Prescott, & Olabi, 2015).

For å redusere luftforurensning kan mikroalger nyttes til CO<sub>2</sub> -fiksering, da algene nytter CO<sub>2</sub> for vekst. Siden opptaket av CO<sub>2</sub> er like stort som utslippet innen et kort tidsrom, er biodrivstoff fra mikroalger en fornybar energiressurs (Brennan & Owende, 2010). Til tross for mikroalger sitt potensiale er teknologien for produksjon og utvinning av biodrivstoff fortsatt under utvikling. Det er fortsatt flere hindringer som gjenstår før mikroalger kan være en økonomisk gunstig ressurs til biodrivstoff (Brennan & Owende, 2010). Hvis utvinning gjennomføres på en bærekraftig måte, vil biodrivstoff fra alger kunne være med på å erstatte drivstoff fra fossile energikilder. En slik endring kan da være en medvirkende faktor til utviklingen av et mer bærekraftig samfunn (Cherubini, 2010).



## 2. Bakgrunn

### 2.1 Bakgrunn for forsøket

Selv for en fykolog, dvs. en som forsker på alger, er det å definere hva en alge egentlig er, en vanskelig oppgave. Deres mangfoldighet har resultert i at de er kategorisert under hele 4 ulike riker: *Bacteria*, *Plantae*, *Protista* og *Chromista* (*Protista* og *Chromista* kan klassifiseres under samme rike, *Protista*), og er estimert å inkludere alt fra 30 000 til 1 million arter. En av flere generelle definisjoner innebærer autotrofe, akvatiske organismer som har en *oksygen evolving* fotosyntetisk prosess (Guiry, 2012). Oppgaven definerer slik som Brennan og Owende (2010) mikroalger som både prokaryote mikroalger, dvs. blågrønnbakterier (*Chloroxybacteria*), og eukariote mikroalger, f. eks. grønnalger (*Chlorophyta*), rødalger (*Rhodophyta*) og kiselalge/diatomé (*Bacillariophyta*).

For å oppnå en økonomisk gunstig dyrking av alger for produksjon av biodrivstoff er det viktig å se på veksten, reproduksjonen og produksjonen av lipider i hver enkelt celle. Vekst og reproduksjon er avgjørende for hvor mye biomasse som kan produseres innen et gitt tidsrom. Mengden lipider er avgjørende for hvor stor mengde av biomassen som kan brukes til produksjon av biodrivstoff. For utvikling av veksten hos grønn-alger er det mange faktorer som spiller inn, blant dem har lys en essensiell rolle. Lys er avgjørende for autotrof vekst og fotosyntese. Algene inneholder klorofyll som har stor evne til å absorbere lys. Pigmentene i klorofyllet er da spesielt sensitive for lysbølgene som danner rødt og blått lys. Temperaturforholdene ved dyrkingsprosessen er også en avgjørende faktor for cellene sin kjemiske komposisjon, opptak av næringsstoffer, opptak av CO<sub>2</sub> og veksthastighet. På samme tid har lysintensiteten, livssyklusen og miljømessige faktorer stor innvirkning på mengde produsert biomasse (Singh & Singh, 2015).

Mikroalger har en eksponentiell vekstrate, der hver enkelt alge, under ideelle forhold, vil fordobles per 3.5 time. Det er registrert at ved noen algearter er det mulig å regulere vekstforhold for å øke akkumulasjon av lipider i hver enkelt celle (Wang, Li, Wu, & Lan, 2008). Den høye veksten kommer av dens enkle struktur, og kontinuerlig tilgang på vann som inneholder store mengder CO<sub>2</sub> og andre viktige næringsstoffer (Brennan & Owende, 2010).

Ved vekst lagrer alger energi i form av karbohydrater, proteiner og lipider. Biomasse som består av store mengder lipider i forhold til karbohydrater og proteiner, vil være gunstig til produksjon av biodrivstoff (Wang et al., 2008). Lipider er fettstoffer, som i flytende form omtales som olje. Mengden olje er avgjørende for hvor stor del av biomassen som kan brukes til produksjon av biodrivstoff. Mange arter har et oljeinnhold på 20-50% av tørrvekten (Brennan & Owende, 2010).

Langs Norges kyst blir det årlig tilført store mengder nitrogen og fosfor fra jordbruk, akvakultur, avløp, industri og naturlig avrenning. Blant dem står akvakultur for den største tilførselen av fosfor, og nest største tilførsel av nitrogen etter naturlig avrenning. I 2015 var utslipp av fosfor på 9 948 tonn, og for nitrogen var det på 57 569 tonn (Selvik & Høgåsen, 2016). Ved for stor tilførsel av næringsalter til det marine miljøet kan det oppstå eutrofiering. Det er en prosess hvor en kan få oppblomstring av planktonalger, som fører til overgjødning. Et resultat kan bli at en får mindre oksygeninnhold i det marine miljøet. Det kan få negative konsekvenser og føre til mindre vekst, eller død blant andre organismer i økosystemet (Sjøtun et al., 2011). De fleste områdene langs kysten risikerer likevel ikke å bli utsatt for overgjødning med produksjonen en har i dag. Det kommer av god vannutskifting. Men en mangler fortsatt kunnskap om tålegrensen et større område har før miljøkvaliteten blir svekket. En økning i produksjon vil gi større risiko for forurensning. I fjordene hvor vannutskiftingen ikke er like god som i de åpne sjøområder, foregår det fortsatt mye oppdrett. Det er her, i fjordsystemene, den største risikoen for forurensning er gjeldende (Svåsand et al., 2016).

Nitrogen og fosfor som i dette systemet kan gi negative konsekvenser for marine og akvatiske miljø, kan i et annet system være en nyttbar ressurs. Da nitrogen og fosfor er to viktige komponenter for dyrking av mikroalger, kan avløpsvann fra nevnte sektorer brukes som vekstmedium for kultivering. På denne måten vil overflødig næring fra eksempelvis akvakultur kunne brukes som næring for alger. Denne tankegangen bygger på prinsippet om industriell økologi. I industriell økologi ser en på sammenhengen mellom industri og naturen, og prøver å se på løsninger hvor industrien ikke påvirker naturen negativt. Her vil en gjøre materialstrømmen mest mulig sirkulær, og ikke lineær slik den er i store deler av verden i dag. Sirkulær materialstrøm vil si at man bruker lukkede kretser hvor alt ved et produkt blir gjenvunnet. Industriavfall fra en bedrift, blir råstoff i en annen bedrift. Slik skal man forhindre forurensning og spare ressurser, samtidig som det kan være økonomisk gunstig for bedriftene (Patel, 1992).

## 2.2 Kunnskapsstatus for mikroalger i verden og Norge

Interessen for mikroalger til bruk i biodrivstoff, har den siste tiden økt i takt med ønske om et mer bærekraftig samfunn. Viktigheten av fornybare energiresurser som en erstatning for fossilt drivstoff blir tydeligere sett i sammenheng med et økt energibehov, og en kraftig økende populasjon av mennesker i verden (Chew et al., 2017). Et mål ifølge *IEA Bioraffineri Task 42* er å anvende prinsippet om bioraffineri for å oppnå økt andel biodrivstoff i transportsektoren. Biodrivstoff får da en økt økonomisk posisjon gjennom tilleggs- produksjon av andre produkter fra biomassen. *IEA Bioraffineri Task 42* definerer et bioraffineri som en bærekraftig prosessering av biomasse til et spekter av markedsførbare produkter (mat, fôr, materiale, kjemikalier) og energi (brensel, elektrisitet, varme) (Sonnenberg, Baars, & Hendrickx, 2009). Konseptet som et bioraffineri bygger på har mange likhetstrekk ved et oljeraffineri. Hovedforskjellen er relatert til materiale som går inn i prosessen, og teknologien for utvinning av råmaterialene. Biomasse og petroleum har ulike egenskaper og trenger derav ulik behandlingsmetode, samt at de er egnet for å produsere ulike co-produkter (Chew et al., 2017). Bioraffineri trenger ikke være et stort anlegg, men kan kombinere materialstrømmen til ulike industrier. På denne måten kan en få til en fullverdig utnyttning av alle komponentene til et råstoff (Cherubini, 2010). Bedriften Borregaard er et eksempel der de bruker biologisk materiale i et raffineri. Råmaterialet er da fra tømmer hvor de produserer biokjemikalier, biomaterialer og biodrivstoff (Borregaard, 2017). Neste steg blir å anvende konseptet om bioraffineri hvor råmaterialet er biomasse fra mikroalger. Det er da avgjørende å utvikle separeringsteknikker som bevarer egenskapene til både hovedproduktet og verdifulle co-produkter (Chew et al., 2017).

Biomassen fra mikrolager kan brukes til produksjon av ulike produkter. For produksjon av biodrivstoff er det lipider som blir nyttet. Ved å videre bruke alle deler av algen, kan proteiner og karbohydrater, samt andre verdifulle komponenter som fettsyrer, vitaminer og pigmenter anvendes. Proteiner er blant de viktigste co-produktene, og kan nyttes som næring for mennesker eller dyr. Dette er et området som har vært forsket lenge på, og alger produseres kommersielt i dag som næring. Karbohydratene i mikroalger kan nyttes som en karbonressurs for gjæringsprosesser på samme måte som sukker eller behandlet lignocellulose produkter (Chew et al., 2017).

Det er flere prosjekter som jobber med å øke mikroalger sin økonomiske posisjon ved å videreutvikle teknologien og nyttbare produkter fra algedyrking. Et viktig prosjekt for teknologiutvikling for å anvende mikroalger som en ressurs er *Aquatic species program (ASP)*, et stort forskningsprosjekt som ble startet av *U.S Department of Energy's Office of Fuels Development*. Programmet startet opp i 1978 og varte til 1996. Hovedfokuset var å produsere biodrivstoff fra algearter som inneholdt store konsentrasjoner av olje og samtidig nyttet CO<sub>2</sub>-avfall fra kullforbrenningsanlegg. Prosjektet gjorde flere viktige funn relatert til produksjon av nyttbar biomasse og produksjonsforhold (Sheehen, Dunahay, Benemann, & Roessler, 1998). *AlgaePARC*, er et annet stort forskningsprosjekt i Nederland som vil pågå i tidsperioden 2010-2025. Formålet med prosjektet er å utvikle en kommersiell og bærekraftig produksjonskjede for mat, fôr, kjemikalier, materiale og drivstoff produsert fra mikroalger. De har mange underprosjekter hvor de fokuserer på spesifikke deler av prosessen, og utfører test-prosjekter i storskala produksjonsforhold (*AlgaePARC*, 2017, 10.05).

I Norge har den langstrakte kysten gjennom generasjoner vært en viktig kilde for mat og inntekter for folket i form av fiske og havbruk. Potensialet som er tilknyttet havbruksnæringen har resultert i en viktig økonomisk sektor for eksport av oppdrettslaks, men også nye områder innenfor havbruk har blitt aktuelle. Det har blitt fokusert mer på det store bruksområdet til alger. I dag høstes det naturlige bestander av stortare langs kysten til produksjon av alginat, samt at en har kommersielle dyrkningsanlegg av tare til produksjon av mat (*Seaweed from Norway*, 2017, 30.05; Steen, 2009). Blant pågående prosjekter har *Ocean Forest* (stiftet av *Bellona* og *Lerøy Seafood Group*) startet opp et dyrkningsanlegg for integrert havbruk. Også kalt *IMTA*, *Integrert Multi-trofisk akvakultur*. Det går ut på at en dyrker flere arter fra ulike nivå i næringskjeden sammen, og skaper et økosystem. Tanken er at mikro -og makroalger, blåskjell og bunndyr skal kunne dyrkes på næringssalter fra lakseoppdrettsanlegg. Målet er å utvikle produkter til mat, fôr og råstoff til industri, jordbruk og energi (Nes, 2016).(*Bellona*, 2017, 10.05). Resultatene vil de bruke til å utvikle et bærekraftig kommersielt konsept for biomasseproduksjon i stor skala. I 2016 hadde *Ocean Forest* dyrket 1500m med butare og sukkertare som får næring fra lakseoppdrett like ved dyrkingsområdet. Selskapet har også fått produsert blåskjellmel som klimavennlig råstoff alternativ i fiskefôr (Nes, 2016).

Til energiformål er det ingen kommersiell produksjon av mikroalger så langt i Norge, men det forventes at mikroalger til biodrivstoff vil være en viktig ressurs i fremtiden. *SINTEF* (Skandinavias største uavhengige forskningsorganisasjon) har forsket lenge på dyrking og

produksjon av mikroalger som råstoff til mange formål. De har forskningsprosjekt hvor mikroalgens kvalitet er i fokus, og storskalaprojekter på flere hundre liter i volum (SINTEF, 2013, 13.02, 2015, 28.01). SINTEF har i samarbeid med flere institusjoner og Biokraft, et innovasjonsprosjekt kalt COMPLETE. Et av målene med prosjektet er å se på dyrking av mikroalger i avløpsvann fra biogassproduksjon. Avløpsvannet vil ha næringsrike stoffer, og formålet er å undersøke om algene vil ha gode vekstvilkår. COMPLETE vil se på muligheten ved å dyrke mikroalger med høyt innhold av fett, for å kunne bruke den produserte biomassen til fiskefôr. Den økonomiske analysen vil være en viktig del av prosjektet, da det er sannsynlig at de vil lykkes med forsøket, men det er usikkert til hvilken pris (SINTEF, 2017, 02.05).

Avløpsvannet fra biogassproduksjonen vil være fra Biokraft sitt produksjonsanlegg for flytende biogass drivstoff (LBG) på Skogn i Nord Trøndelag. Det skal stå ferdig november 2017, og vil være verdens største produksjonsanlegg for LBG når det er ferdig. Det skal produsere drivstoff med biprodukter og avfall fra settefiskanlegg og skogbruk. Det jobbes også med å få til en produksjon av biogass med alger som råstoff (Biokraft, 2016). Et annet prosjekt som ser på muligheten for rensing, er et pilotanlegg bygget av Universitetet i Bergen i samarbeid med havbruksnæringen. Ved anlegget dyrkes det mikroalger basert på fanget CO<sub>2</sub> fra Teknologisenter Mongstad (TMC). Målet er å dyrke omega3- rike alger som kan brukes til råstoff i fiskefôrproduksjon, samtidig som en binder CO<sub>2</sub>. Til nå har det blitt sluppet ut CO<sub>2</sub> på rundt 100 000 tonn i året (Aadland, 2016, 18.04; Jerver, 2016, 16.11; Kjetland, 2016, 21.11).

Som nevnt er det flere prosjekter i verden og i Norge som jobber mot at mikroalger skal bli en økonomisk nyttbar ressurs i fremtiden. Prosjektene er knyttet opp mot teknologiutvikling og mulighetene for å sette produksjonen av mikroalger inn i ett større system. Dette vil oppgaven se nærmere på, da problemstillingene som er utformet omhandler de nevnte temaene.

## 2.3 Problemstilling

Det overordnede målet med oppgaven er å få kunnskap om prosessen med dyrking av mikroalger i laboratorium, for å fremstille biomasse. Det er tiltenkt at biomassen skal kunne brukes til energiformål. Gjennom forsøket skal en også se på løsningen ved å bruke mikroalger til rensing av avløpsvann. Ved å dyrke mikroalgen *Chlorella Vulgaris* i avløpsvann fra settefiskanlegg, vil en se om algen tar opp næring fra vannet, og slik få til en naturlig rensingsprosess. Dyrkingen vil foregå uten annen næring enn den som allerede finnes i avløpsvannet. Videre i oppgaven vil potensialet til mikroalger som ressurs i Norge bli presentert og drøftet.

Med bakgrunn i dette vil problemstillingene i oppgaven være:

- I. *Hvordan er veksten til Chlorella Vulgaris ved dyrking i avløpsvann fra settefiskanlegg, ved optimal temperatur og lysintensitet?*
- II. *Hvordan påvirkes veksten til Chlorella Vulgaris ved dyrking i avløpsvann fra settefiskanlegg, ved begrenset temperatur og lysintensitet?*
- III. *Hva er potensiale for mikroalger som en ressurs i bioøkonomien i Norge?*

Da oppgaven er todelt vil problemstillingene løses med to ulike fremgangsmåter.

De to første problemstillingene vil løses med bakgrunn i en naturvitenskapelig forskningsmetode, mens den siste problemstillingen vil løses med en litteraturbasert tilnærming.

## 3. Oppbygning av forsøk, materiale og metode

### 3.1 Oppbygning av forsøk

Formålet med forsøket var å undersøke hvordan veksten til *Chlorella Vulgaris* ville utarte seg ved dyrking i avløpsvann fra settefiskanlegg, ved optimal temperatur og lysintensitet. Forsøket skulle videre se på hvordan veksten utartet seg ved dyrking i begrenset temperatur og lysintensitet. For å gjennomføre dette ble det lagt opp til at tre forsøk skulle utføres, der hvert forsøk varte i 13 dager. I forsøk 1 ble algene dyrket i optimal temperatur og lysintensitet. Forsøk 1 ble videre brukt som et grunnlag for sammenligning for de videre forsøkene. I forsøk 2 ble lysintensiteten begrenset, og i forsøk 3 ble temperaturforhold begrenset. Før forsøkene kunne starte ble det gjort rede for hvilken alge som skulle dyrkes og hvilke vekstforhold den skulle dyrkes i. Disse faktorene blir fremstilt i gjeldende delkapittel, samt presentert i Tabell 1. Kunnskapen som ble innhentet ved gjennomføring av forsøkene, og kunnskapen som ble presentert i kapittel 2. *Bakgrunn* ble siden brukt som grunnlag for besvarelse av problemstilling tre. Den omhandler potensiale for mikroalger som en ressurs i bioøkonomien i Norge.

Ved valg av vekstmedium til dyrking av mikroalger, ble det bestemt at mediet skulle være fra avløpsvann fra settefiskanlegg. Settefiskanlegg er en del av akvakulturnæringen. Det er derfor interessant å undersøke om det er mulig å bruke avløpsvannet som et vekstmedium for algedyrking, og slik spare ressurser samtidig som en kan forhindre forurensing av kystområder. I perioder av driften ved et settefiskanlegg er det tilført saltvann i karene for at fisken skal få en gradvis tilvenning fra ferskvann til saltvann. Siden det var ønskelig å bruke ferskvann som vekstmedium i dette forsøket, ble det valgt ut et anlegg som oppfylte dette kravet. Avløpsvannet som er brukt ble derfor hentet fra Osland Havbruk AS sitt settefiskanlegg ved hovedlokaliteten Sørebo. Selskapet har en konsesjon på produksjon av 3,5 mill smolt, hvor produksjonen foregår i lukkede systemer på land (Osland Settefisk, 2016, 10.06). I epost fra Sverrir Valdemarrson ved Osland Havbruk (2017, 31.03) ble det opplyst at prøven ble tatt fra et kar med volum på 1272 m<sup>3</sup>. Det er et resirkuleringsanlegg, hvor karet har en utskiftningstid på 40 min. Det vil si ca. 31800 L/min som sirkulerer i anlegget, av dette er ca. 1-2% av vannet nytt. Vannprøven ble tatt fra utløp etter filter (trommelfilter på 0,6mm) og er dermed representativ for vannet som blir sluppet ut i fjorden. Ved å ta prøve av vannet etter filter, unngår en også slam i prøven.

I forsøket skulle det ikke tilføres mer næring enn det som allerede var i avløpsvannet. Algekulturen som skulle dyrkes måtte dermed tåle et dyrkingsmiljø som ikke har det helt ideelle næringsinnholdet. Mikroalgen *Chlorella Vulgaris*, som er en grønnalge systematisert under planteriket (underrike: Viridiplantae) (Guiry, 2012) ble derfor valgt. *Chlorella Vulgaris*, heretter omtalt som *C. Vulgaris*, har tidligere blitt dyrket i avløpsvann, både fra kommunale avløpsanlegg, og fra fiskeoppdrett (Guerrero-Cabrera, Rueda, García-Lozano, & Navarro, 2014). Sammenlignet med andre alger tar kulturen raskt opp nitrogen og fosfor (Converti, Casazza, Ortiz, Perego, & Del Borghi, 2009) (Ebrahimian, Kariminia, & Vosoughi, 2014, s. 502), en egenskap som gjør algen egnet til dyrking i avløpsvann. På bakgrunn av at *C. Vulgaris* virket som en robust algetype som tåler ulike vekstforhold, ble det bestilt seks prøver med 5 ml i hver prøve, av algekulturen *Chlorella Vulgaris* (CCAP 211/11B) fra *Culture Collection of Algae and Protozoa* i Skottland.

I forsøk 1 var det ønskelig å se om *C. Vulgaris* hadde gode vekstvilkår i avløpsvann fra settefiskanlegg. Optimal temperatur og lysintensitet for *C. Vulgaris* ble derfor undersøkt.

Det er i flere studier vist at den høyeste vekstraten for *C. Vulgaris* er oppnådd med en temperatur på rundt 25°C (Ho et al., 2012; Scragg, Illman, Carden, & Shales, 2002; Serra-Maia, Bernard, Gonçalves, Bensalem, & Lopes, 2016). Ved økning i temperatur fra 25-28 °C eller ved redusert temperatur fra 25-20 °C er det registrert nedgang i vekst, der sistnevnte har en større usikkerhet. (Serra-Maia et al., 2016, s. 355). Dette samsvarer med leverandøren CCAP sine anbefalinger om gode vekstvilkår ved temperaturer rundt 20-25 °C. Da temperaturinnstillingen ved klimarommet (dyrkingsrom, se figur 3), opererer med +/- 2 °C, ble optimal temperatur dermed satt til 22°C +/- 2 °C. Natt-temperaturen ble innstilt til 15°C +/- 2 °C i alle forsøkene.

I tidligere forsøk gjort ved dyrking av *C. Vulgaris* i avløpsvann (fiskeoppdrett, kunstig avløpsvann, og lignende industri) er valg av lysintensitet varierende. I følge Ebrahimian et al. (2014), som forsket på optimal lysintensitet ved dyrking av *C. Vulgaris*, er 7400 lx anbefalt verdi. I forsøk hvor optimalisering av vekst er i fokus, er lysintensiteten på et lavere nivå. Verdier 2250 lx og 3000 lx er brukt i blant annet forsøkene til Feng, Li, og Zhang (2011) og Lv, Cheng, Xu, Zhang, og Chen (2010). I forsøkene til Ho et al. (2012) og Mujtaba, Choi, Lee, og Lee (2012) er verdiene 4500 lx og 6000-7500 lx brukt som lysintensitet. CCAP anbefalte å dyrke *C. Vulgaris* ved en lysintensitet mellom 2000 lx -3000 lx. Da denne lysintensiteten også er blitt brukt i andre forsøk Feng et al. (2011) og Lv et al. (2010), ble optimal lysintensitet satt til 2400 lx. Med denne lysintensiteten kunne flaskene plasseres 10 cm fra lysrørene, som



anbefalt fra CCAP. Lys-syklusen ble innstilt til 16:8 timer, hvor 16 timer var lyst og 8 timer mørkt. Det etterligner en dag-natt syklus, og har blitt brukt i tidligere forsøk (Ho et al., 2012).

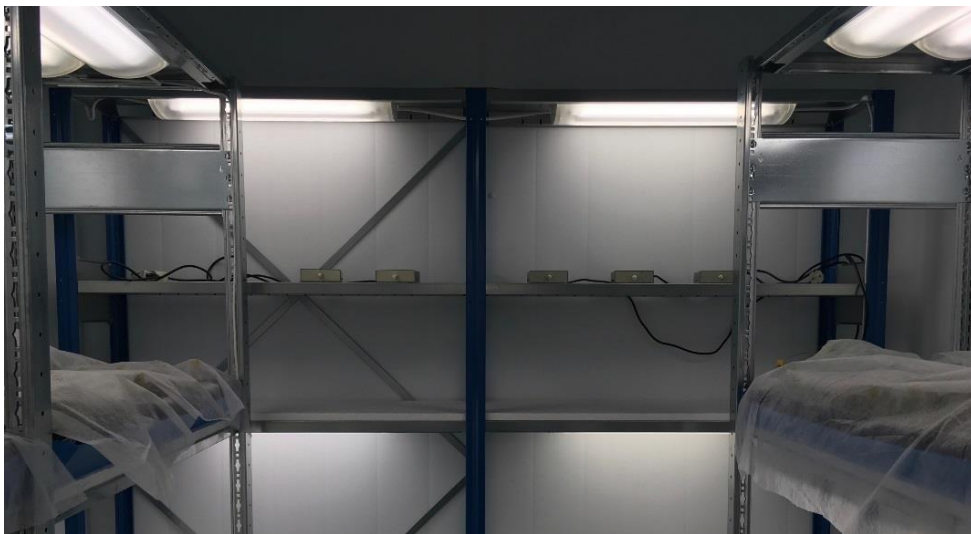
I forsøk 2 og 3 var det ønskelig å se hvordan veksten av *C. Vulgaris* i avløpsvann ble påvirket ved begrensede temperatur og lysintensitet. Ved å dyrke algene i begrensede forhold vil dette gi indikasjoner på hvordan algene vil bli påvirket i forhold som ikke er ideelle. Dette er et viktig scenario da det er vanskelig å imøtekomme vilkårene for optimale vekstforhold for mikroalger ved storskala produksjon (Silva & Reis, 2015). I forsøk 2 ble derfor lysintensiteten begrenset, og temperaturen ble satt til optimal for å unngå endringer i veksten grunnet temperatur. Ved valg av lysintensitet var det gunstig å velge en lysintensitet som var tydelig redusert fra optimale forhold. Det var samtidig også gunstig å velge en lysintensitet som var høy nok til å stimulere en viss grad av vekst hos algen. Derfor ble lysintensiteten halvert fra 2400 lx og satt til 1200 lx. I forsøk 3 ble temperaturen begrenset, og lysintensiteten ble satt til optimal for å unngå endringer i veksten grunnet lysintensitet.

I realiteten er det vanskelig å bestemme eksakt temperaturforhold, da det er lett for at temperaturen faller eller stiger (Silva & Reis, 2015). Da formålet er å undersøke vekstvilkårene i begrensede temperaturforhold vil det i forsøk 3 bli brukt en temperatur som er lavere enn 22°C +/- 2 °C. Det er samtidig ønskelig å bruke en temperatur som stimulerer vekst hos algene. I følge CCAP, vil en temperatur under 15 °C +/- 2 °C påvirke veksten negativt og kan føre til økt celledødelighet. En temperatur under 15 °C +/- 2 °C er derfor ikke gunstig. Temperaturen for kultivering av *C. Vulgaris* ved begrenset temperaturforhold ble derfor satt til 15 °C +/- 2 °C i forsøk 3.

Tabell 1: Viser valg av alge, lysintensitet, lys-syklus, temperaturer (dag/natt) for forsøk 1, 2 og 3, samt tidsperioden for når forsøkene ble gjennomført

| Forsøk   | Alge                      | Lysintensitet | Dag- og nattsyklus | Temperatur Dag | Temperatur Natt | Tidsperiode        |
|----------|---------------------------|---------------|--------------------|----------------|-----------------|--------------------|
| Forsøk 1 | <i>Chlorella Vulgaris</i> | 2400 lx       | 16:8               | 22°C +/- 2 °C  | 15 °C +/- 2 °C  | 13.-25. mars       |
| Forsøk 2 | <i>Chlorella Vulgaris</i> | 1200 lx       | 16:8               | 22°C +/- 2 °C  | 15 °C +/- 2 °C  | 24.mars – 5. april |
| Forsøk 3 | <i>Chlorella Vulgaris</i> | 2400 lx       | 16:8               | 15 °C +/- 2 °C | 15 °C +/- 2 °C  | 5.-17. april       |

For å regulere verdier for lys og temperatur ved forsøkene ble klimarom ved Høgskulen på Vestlandet (HVL) brukt som vekstlokasjon (Figur 3). Et klimarom er designet slik at lys og temperatur kan justeres til ønsket verdi. Rommet var innredet med hylleseksjoner hvor to lysrør av typen OSBRAM, LULUX Warm White, HE 14W/830 var installert over hver hylle. For å avgjøre lysintensiteten fra lysrørene ble en luxmåler av typen INS, DX-100, DIGITAL LUX METER brukt. Luxmåleren gjorde det mulig å fastsette avstanden mellom lysrørene og fremdyrket algekultur for å oppnå ønskede verdier for lysintensitet.



Figur 3: Klimarom

På utsiden av klimarommet var det plassert to styringssentraler for justering av temperatur. Det var slik mulig å justere temperaturen til ønsket nivå  $\pm 2$  °C. Temperaturen kunne justeres ved intervaller, og slik etterligne natt og dagtemperaturer. Styringssentralen for å kontrollere dagtemperaturen var en SmartCella av merke CAREL (Figur 4). Se vedlegg 1 for endring av innstilling. Styringssentralen for natttemperatur var av merket RIVA COLD (Figur 5). Se vedlegg 2 for endring av innstillinger.



Figur 4: SmartCella temperaturstyrer



Figur 5: RIVACOLD natttemperaturstyrer

Intervaller for lys-syklusen kunne justeres fra en styringssentral som var lokalisert på innsiden av klimarommet. På lik linje med temperatur kunne lys justeres til en dag-natt syklus. Styringssentralen var av typen MICROTIME, og kunne justere døgnsykluser og ukes-sykluser (Figur 6). Se vedlegg 3 for endring av innstillinger.



Figur 6: MICROTIME intervalljustering for lys-syklus

### 3.2 Materiale

Materialet som er brukt gjennom forsøket er presentert nedenfor.

|                                | Utstyr                              | Antall/Mengde/Str | Detaljer   |
|--------------------------------|-------------------------------------|-------------------|--|
| <b>Klimarom</b>                | Lux - måler                         | 1stk              | INS, DX-100, DIGITAL LUX METER   |
|                                | Lysrør                              | 4 stk             | OSBRAM, LULUX Warm White, HE 14W/830   |
| <b>Levering av vekstmedium</b> | Dunk (som vannprøven ble levert i)  | 25 L              | Tidligere brukt til: HG HYGI-DES, desinfeksjonsmiddel til akvakulturanlegg og transportenheter |
|                                | En-liters flasker                   | 15 stk            | Tidligere brukt til: Rektifisert sprit   |
|                                | En-liters flasker                   | 5 stk             | Tidligere brukt til: Rektifisert sprit, tilsatt 2 % metylisobutylketon                         |
|                                | Annet nyttig utstyr: Trakt, hansker |                   |  |

|  |  |                                       |  |
|--|--|---------------------------------------|--|
| <b>Oppbevaring av algekultur</b>                       | Lux-måler                                      |                                       | INS, DX-100, DIGITAL LUX METER             |
|  | Elvevann                                       | 2 L                                   | Fra mars måned                             |
|  | 500 ml beholder                                | 4 stk                                 |  |
|  | Aluminiumsfolie                                | 10 cm <sup>2</sup> x 4                |  |
| <b>Filtrering</b>                                      | Grovfilter                                     | 100 µm, 25 µm, 20 µm                  |  |
|  | maskestørrelse                                 |                                       |  |
|  | Millipore                                      | 1 stk                                 |  |
|  | filtrerings-oppsett                            |                                       |  |
|  | Whatman glass mikrofiberfilter, diameter 47 mm | Ca. 24 stk                            | Per forsøk                                 |
| Bøtter, 25 L   | 2 stk  | Oppbevaring under filtrering          |  |
| Annet nyttig utstyr: Hansker, tilgjengelig vask, beger |  |                                       |  |
| <b>Autoklaving</b>                                     | Trykkoker                                      | 1 stk                                 | CERTOclav A 4050 Traun                     |
|  | Destillert vann                                | 3L per forsøk                         | Batterivann, destillert og avionisert vann |
|  | Erlenmeyerflaske                               | 10 stk                                | 500 g per                                  |
|  | Oppvaskmaskin                                  | 1 stk                                 |  |
|  | Vekt   | 1 stk                                 | KERN, Ple                                  |
|  | Aluminiumsfolie                                | Ca 7 cm <sup>2</sup> , per flaske x 2 |  |
|  | Magnet rørepinne                               | 10 stk                                |  |

|   |  |  |
|---|--|--|
|   | Glassbeholder 1 stk  | Autoklaving av magnet rørepinner           |
|   | Annet nyttig utstyr: Saks, hansker, varmebeskyttende hansker |  |
| <b>Måling av næringsinnhold</b>                 | Måleutstyr for nitrogen og fosfor                            | Red Sea Algae Control PRO Test Kit         |
|   | Destillert vann 3-40 ml per måling                           | Batterivann, destillert og avionisert vann |
|   | Vekt   | KERN, Ple. d=0,01 g                        |
|   | Annet nyttig utstyr: Hansker                                 |  |
| <b>Måling av turbiditet</b>                     | Turbiditetsmåler, med tilhørende utstyr                      | HACH, RATIO TURBIDIMETER                   |
|   | Magnetrorer  |  |
|   | Pipette  |  |
|   | Annet nyttig utstyr: Papir                                   |  |
| <b>Måling av algevekt for dyrket algekultur</b> | Tørkeovn   | TERMAKS                                    |
|   | Vekt, til å veie filter                                      | OHAUS, ANALYTICAL Plus                     |
|   | Whatman glass mikrofiberfilter, diameter 47 mm 10 stk        | Per forsøk                                 |
|   | Millipore filtrerings-oppsett 1 stk                          |  |
|   | Vekt, til å veie dyrket algekultur 1 stk                     | KERN, Ple. d=0,01 g                        |
|   | Annet nyttig utstyr: Pinsett                                 |  |

### 3.3 Metode

I gjeldende delkapittel er metoden presentert slik at den skal være etterprøvbart, da dette er avgjørende for oppgavens reliabilitet. Siden oppgaven er en læringsprosess er den mest ideelle gjennomføringen av metoden beskrevet. Variasjoner innen gjennomføringen er presentert i tabeller, feilkilder eller vedlegg. Utførelsene som er beskrevet er gjennomført i tidsperioden 18. februar til – 17. april. Levering, generell behandling og oppbevaring av materiale ble tatt hånd om fortløpende. Forberedelser til hvert enkelt forsøk ble derimot gjort rett før oppstart, ettersom forsøkene ble gjennomført til ulik tid.

#### 3.3.1 Vekstmedium

Vannprøven fra Osland settefiskanlegg ble tatt den 17. februar 2017, og ble levert samme dag. Den ble fryst ned fortløpende etter levering da forsøket ikke var klart til oppstart. Ved nedfrysing ble en eventuell algevekst i vannet forhindre før forsøket startet. Eventuell algevekst vil redusere næringsinnholdet i vannet, og gi utslag på resultatet av algedyrkingen. Vannprøven ble levert i en dunk på 25 liter, og ble videre fordelt på 20 en-liters flasker (Figur 7). Resterende vann ble ikke brukt. Flaskene var tidligere brukt til oppbevaring av rektifisert sprit. De ble derfor skylt før bruk. Ved fordeling ble vannet godt blandet slik at vannkvaliteten var tilnærmet lik i alle flaskene. Vann utvider seg ved nedfrysning, flaskene ble derfor fylt med 0,9 L vann hver.



*Figur 7: Flaskene som ble brukt for oppbevaring av vekstmedium ved nedfrysing.*

Vekstmediet kan inneholde større partikler, algearter og bakterier, det er derfor nødvendig å filtrere vannet før start av forsøket.

- Ca. 6 liter av vekstmediet ble tatt opp til tining dagen før oppstart av forsøket. Det var her beregnet med svinn under filtrering, og ved fordamping av vannet. Se vedlegg 4 for beregninger av mengde vekstmedium som ble tatt opp for tining ved hvert forsøk.
- Etter opptining ble vannet filtrert gjennom grovfilter med maskestørrelse på 100 $\mu$ m, 25 $\mu$ m og til sist 20 $\mu$ m for filtrering av større partikler og uønskede algearter (Figur 8). Det ble brukt to 25 L bøtter til oppbevaring av vannet.
- For finere filtrering av mikroalger, og bakterier større enn 0,7  $\mu$ m, ble det brukt et Whatman glass mikrofiber filter med diameter på 47 mm. I filtreringsprosessen ble filteret plassert i et *Millipore filtrerings-oppsett*. Oppsette var tilkoblet en vannkran for å danne vakuum (Figur 9).



Figur 8: Filtrering av vekstmedium gjennom filter med maskestørrelse 25 $\mu$ m



Figur 9: Filtrering av vekstmedium gjennom Millipore filtrerings-oppsett

For å sterilisere vekstmediet ble vannprøvene autoklavert i en CERTOclav A 4050 Traun trykkoker (Figur 10). Ved å øke trykket vil koketemperaturen til vann stige. Dette gjør det mulig å koke vannprøvene på 120°C, gjenværende bakterier og mikroalger vil da destrueres.

- Ti erlenmeyer flasker ble vasket i oppvaskmaskin på 70°C i 2 timer. Flaskene ble så skylt for å fjerne eventuelle såperester.

- Når flaskene var tørre ble de veid på en vekt av typen KERN, Ple (Figur 11).
- Tilførte 525 g filtrert vekstmedium til hver flaske og dekket flaskeåpningen med aluminiumsfolie. Ved å dekke åpningen ble partikler fra luften hindret fra å blande seg i vannet. Det ble laget et lite hull på toppen av folien ettersom fordamping av prøvene ville forekomme.
- Trykkokeren ble fylt med vann i bunnen. Vannet bestod av  $\frac{2}{3}$  destillert vann og  $\frac{1}{3}$  springvann. Da vann vil fordampe er det nødvendig med etterfylling etter hver autoklaving.
- Flaskene ble plassert i autoklaven, to om gangen, på 120°C i 15 minutter. 10 magnet rørepinner plassert i en glassbeholder fylt med vann, ble autoklavert samtidig som to av flaskene.
- For å hindre variasjon i næringsinnhold i hver flaske, ble det autoklaverte vannet samlet i en 6 L rundbunnet kolbe.
- Når vannet var romtemperert ble 500g fordelt tilbake til de ti erlenmeyer flaskene. Flasketuten ble så tildekket med aluminiumsfolie.



Figur 10: Trykkoker til autoklaving av vekstmedium



Figur 11: Vekt brukt under autoklaving av vekstmedium



For å få et nøyaktig mål på næringsinnholdet i vekstmediet før oppstart, ble to prøver sendt til SognLab. SognLab utfører kjemiske og mikrobiologiske laboratorieanalyser, og holder til i Sogndal.

- To prøveglass på 100ml ble levert fra SognLab, prøveglassene ble fylt med behandlet vekstmedium fra oppstartsfasen ved forsøk 1.
- Prøveglassene ble så levert til SognLab for undersøkelse av nitrogen og fosforinnhold.

### 3.3.2 Algekultur

De seks prøvene fra CCAP bestod av 5 ml algekultur (Figur 12) og ankom 10 mars. Forsøkene var beregnet å vare i en periode på 5 uker tilsammen. I følge leverandøren var det nødvendig med mellom-dyrking av kulturen ved bevaring i mer enn 1-2 uker. Anbefalt oppbevaringsmedium fra CCAP for *C. Vulgaris* er et 1:1 forhold av *Egluena gracilis Medium* og *Jaworski's medium* (3N-BBM+V; EG:JM; Axenic) (Vedlegg 5). Grunnet begrensede økonomiske ressurser var det ikke mulig å anskaffe dette mediet. Alternativ oppbevaring ble gjennomført der elvevann ble brukt som erstatning for mediet. Elvevann i mars måned er rikt på næringsalter og ble derfor valgt. Blandingsforholdet var 5 ml algekultur utblandet i 500 ml elvevann. Den utblandete kulturen ble oppbevart i 500 ml glassbeger med aluminiumsfolie som lokk. For å begrense veksten til kulturen slik at næringsaltene ikke ble oppbrukt ble kulturen tildekket med papir. Hver dag ble papiret tatt bort et par timer slik at algene fikk nok lys til å drive fotosyntese. For å unngå at kulturen skulle skille seg ble hvert glass plassert på en magnetrører i ca. 20 minutter hver dag. Spesifikke oppbevaringsforhold for algekulturen i tidsrommet fra den ble levert til den ble brukt i forsøkene er presentert Tabell 2.

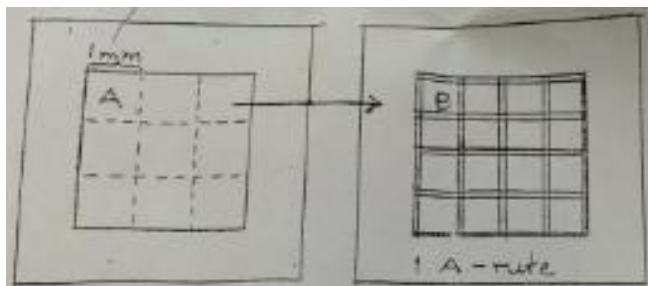


Figur 12: De seks beholderne med 5 ml algekultur i hver, ved levering

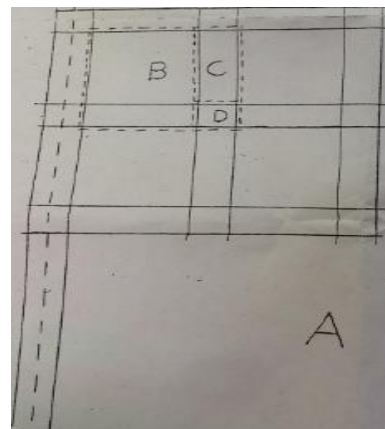
Tabell 2: Viser oppbevaringsforholdene til algekulturen

| Antall dager med oppbevaring av kultur etter levering | Oppbevaringsforhold til algekultur etter levering                                       | Oppbevaring lokasjon             | Uttak av algekultur til forsøk                            |
|---|---|----------------------------------|---|
| 3 dager   | Grader: 20 +/- 2°C, 500 lx  | Klimarom                         | Forsøk 1: Uttak etter 3 dager                             |
| 2 dager   | 25 grader +/- 2°C, 100 lx   | Klimarom                         |   |
| 15 dager  | Utblandet med elvevann<br>5 ml algekultur: 500 ml elvevann<br>20 grader +/- 5°C, 500 lx | Laboratorium<br>(Våtlab ved HVL) | Forsøk 2: Uttak etter 10 dager med oppbevaring i elvevann |

For at konsentrasjonen av celler som ble tilført i hvert forsøk skulle være lik ble antall levende celler per ml telt i alle forsøkene. Slik ble mengden celler som ble tilført i forsøk 1 brukt som ett utgangspunkt for hvor mye algekultur som skulle tilføres i forsøk 2 og 3. For å beregne antall levende celler i kulturen per ml, ble det brukt et *Bürker Tellekammer* og mikroskopet *Leitz Wetzlar*. Et *Bürker Tellekammer* er en glassplate med to inngraverte rutenett, som brukes til å undersøke celledensiteter. Ved å plassere en dråpe fra den konsentrerte algekulturen på hver av rutenettene og videre plassere en glassplate over dem igjen, ble det dannet et volum. Slik kan en regne ut verdien i  $\text{mm}^3$ . En kan telle A, B, C eller D - ruter. En A- rute består av flere B - ruter som igjen består av C og D - ruter (Figur 13 og Figur 14). Hva som egner seg best er avhengig av hvor tykk kulturen er. Kulturen som ble tilsatt i forsøk 1 var tykk, med mange celler. Det var derfor nødvendig å bruke et forstørrelses-objektiv på 40x, og telle D - ruter som er den minste overflaten en kan telle. For å få et nøyaktig gjennomsnitt ble det talt 10D- ruter. Gjennomsnittet var 24,2 celler per D- rute.



Figur 13: Viser en A-rute, som igjen består av flere B-ruter



Figur 14: Viser hvordan en C- og D-rute er en del av en B-rute

Formelen som blir brukt for å regne ut antall celler i  $\text{mm}^3$ :

$$D = \frac{1}{4000} \text{mm}^3$$

Eksempel på utregning av antall celler/ml:

*Gjennomsnitt 10 D ruter = 24,2celler*

$$D = \frac{1}{4000} \text{mm}^3$$

$$\frac{1\text{mm}^3}{x} = \frac{1/4000 \text{mm}^3}{24.2\text{celler}}$$

$$x = \frac{24,2 \text{ celler} \times 1}{4000\text{mm}^3}$$

$$\begin{aligned} x &= 24,2\text{celler} \times 4000\text{mm}^3 \\ &= 9\,680\,000 \text{ celler}/\text{mm}^3 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{cm}^3 &= \text{mm}^3 \times 1000 \\ &= 9\,680\,000 \text{ celler}/\text{mm}^3 \times 1000 \\ &= 96\,800\,000 \text{ celler}/\text{cm}^3 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{cm}^3 &= \text{ml} \\ &= 96\,800\,000 \text{ celler}/\text{ml} \end{aligned}$$

1 ml av kulturen som ble tilsatt inneholdt 96 800 000 celler. I forsøk 1 ble det tilsatt 1 ml av ren algekultur i hver av de 10 erlenmeyer flaskene med 500 g vekstmedium. Flaskene ble så plassert i klimarom på en magnetrører, som holder væsken i konstant bevegelse. Ved forsøk 2 og 3, der algekulturen var utblandet, måtte vi regne ut hvor mange ml som skulle tilsettes slik at det tilsvarte 96 800 000 celler, likt som i forsøk 1. Når kulturen var utblandet var det færre celler i hver rute. I forsøk 2 ble det derfor telt C - ruter.

Formelen for å regne ut  $\text{mm}^3$  fra C ruter er:

$$C = \frac{1}{1000} \text{mm}^3$$

Ved forsøk 3 var det enda færre celler per rute. Cellene hadde samlet seg i klumpete forekomster, en måtte dermed telle mange ruter for å få et representativt antall for rutene. Talte da 40 B - ruter.

Formelen for å regne ut  $\text{mm}^3$  fra B ruter er:

$$B = \frac{1}{250} \text{mm}^3$$

### 3.3.3 Gjennomføring av forsøk og datainnsamling

Etter at erlenmeyer flaskene var plassert i klimarom med gitt temperatur og lysintensitet, ble det gjort en vurdering av når første flaske skulle tas ut for innsamling av data. Mikroalger har en eksponentiell vekst, det var derfor nødvendig å daglig undersøke veksten slik at første flaske ble tatt ut når det var tydelig tegn til vekst. Denne observasjonen ble gjort i forsøk 1 på dag 3. For å videre kunne sammenligne resultatene fra forsøkene, ble dag 3 konsekvent valgt som første dag for uttak av flaske. Videre ble en flaske tatt ut til samme tid hver dag i ti dager. Innsamlede data bestod av måling av turbiditet, vekt og næringsinnhold. Ut i fra målingene kunne vi registrere veksten gjennom forsøket, og se på hvor stor mengde næring algekulturen kan fjerne fra vekstmediet.

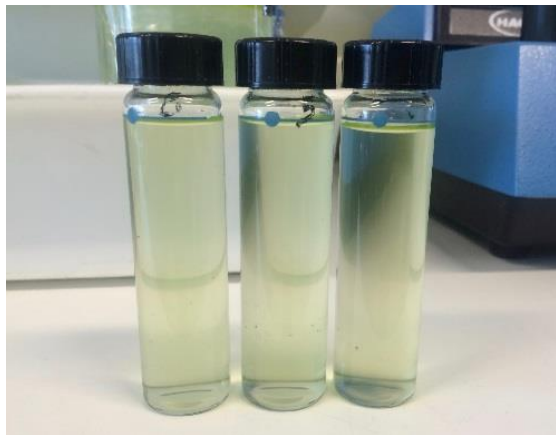
Ved å måle mengden finpartikulært materialet vekstmediet består av, kan verdien brukes som indikasjon på veksten til algene gjennom forsøkene. Uklarheten kan måles ved bruk av en turbiditetsmåler. Måleenheten til turbiditet er FNU. Turbiditetsmåler av typen HACH, RATIO TURBIDIMETER ble brukt (Figur 16). Det ble gjort en måling av turbiditet før algene ble tilsatt i vekstmediet (utførelse er beskrevet i de 3 siste punktene nedenfor). Videre ble det gjort turbiditetsmålinger for hver flaske for å beregne veksten av fremdyrket algekultur. Rådata for måling av turbiditet er vist i Vedlegg 6.

- Flasken ble først plassert på en magnetrørepinne for at algekulturen ikke skulle skille seg fra vekstmediet.
- Videre ble det brukt en pipette til å overføre den dyrkede kulturen fra erlenmeyer flasken til 3 glassflasker som tilhørte turbiditetsmåleren Figur 15.
- Glassflaskene ble pusset med papir for å unngå fingermerker, ettersom turbiditetsmåleren bruker lysspredning til å måle mengden finpartikulært materiale.
- Vendte så glassflasken før den ble plassert i turbiditetsmåleren.
- Verdien kunne leses av på skjermen. Gjentok prosessen for de to resterende glassflaskene for å kunne beregne gjennomsnitt.

$$\text{Turbiditet gjennomsnitt} = \frac{T1 + T2 + T3}{3}$$



Figur 15: Turbiditets måler av typen HACH, RATIO TURBIDIMETER



Figur 16: Dyrket algekultur fordelt på tre glassflasker for måling av turbiditet

I starten av hvert forsøk ble 10 filter tørket i en TERMAKS tørkeovn i to timer på 105 °C, og videre veid på en HAUS, ANALYTICAL Plus vekt. Dette ble gjort for å vite den eksakte vekten av filteret uten påvirkning av fuktighet fra luften (tørrvekt). For å unngå at filtrene tok til seg fuktighet ble de plassert i en eksikator (Figur 18). Filtrene skulle brukes en for hver dag til å filtrere ut algene fra vekstmediet. Rådata for høstet algemasse er vist i vedlegg 7.

- Glassfiberfilter ble satt på *Millipore filtrering- oppsett* som beskrevet i *Forberedelser til forsøket*, seksjon *Filtrering av vekstmedia*. Glassfiberfilteret vil filtrere ut partikler ned til 0,7µm. Algen *C. Vulgaris* har en diameter på 2-10µm, de fremdyrkede algene vil dermed forbli på filteret mens vekstmediet vil bli filtrert.
- Filtrerte 200 g fremdyrket algekultur gjennom glassfiberfilteret (Figur 17).
- Vekstmediet ble så satt til side.
- Glassfiberfilteret med filtrerte alger ble tørket igjen i TERMAKS tørkeovn i to timer på 105 °C (Figur 19).
- Veide så filteret på en HAUS, ANALYTICAL Plus vekt.
- Fant dagens algevekt ved å ta vekten av tørket glassfiberfilter med alger, og trekke fra vekten av tørket glassfiberfilter (Figur 20).



Figur 17: Filtrering av alger gjennom glassfiberfilter

*Vekt biomasse = vekt tørket filter m. alger – vekt tørket filter*



Figur 18: Eksikator for oppbevaring av glassfiberfilter



Figur 19: TERMAKS tørkeovn som ble brukt til tørking av glassfiberfilter



Figur 20: Vekt av typen HAUS, ANALYTICAL Plus

Et av formålene med forsøket var å finne ut hvor mye næringsinnhold algene tok opp fra vekstmediet gjennom dyrkingsprosessen. For å gjennomføre dette ble det brukt et Red Sea Algae Control PRO Test Kit for måling av nitrogen og fosfor (Figur 21).



Figur 21: Red Sea Algae Control PRO Test Kit

Det ble gjort en måling før algene ble tilført i vekstmediet. Videre ble det gjort målinger for hver flaske som ble tatt ut av klimarommet i alle forsøkene. Disse målingene ble gjort av vekstmediet som ble satt til siden etter filtrering. Se vedlegg 8 og 9 for rådata fra måling av nitrogen og fosfor. Destillert vann ble brukt for utblanding da næringsinnholdet i vekstmediet var for høyt i forhold til utstyrets måleevne. Blandingsforholdet ble justert i forhold til hvor høyt næringsinnholdet var. Derfor ble forsøket gjennomført med ulike forhold. Forholdet er presentert som filtrert vekstmedium: destillert vann.

Måling av nitrogen (forhold, 0, 2:15,8 g)

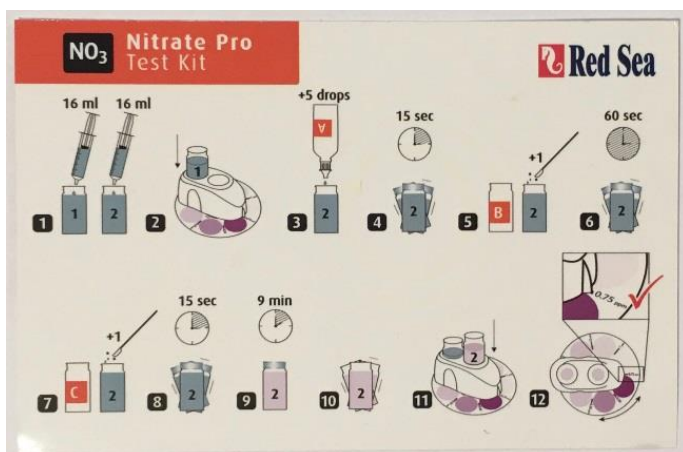
- 16 g filtrert vekstmedium ble tilført i en glassflaske(1) som tilhører kitet. Flasken ble plassert i beholderen som vist i Figur 22.
- 0,2 g filtrert vekstmedium og 15,8 g destillert vann ble så tilsatt i en identisk glassflaske(2). Dette forholdet ble brukt for å utvanne blandingen da verdiene for nitrogen var høye.
- I glassflaske(2) ble det tilsatt 5 dråper av flaske A, NO<sub>3</sub>, glassflasken ble så ristet i 15 sek. Videre ble det tilført 1 skje av flaske B, NO<sub>3</sub>, glassflasken ble så ristet i 60 sek. Til slutt ble det tilført 1 skje av flaske C, NO<sub>3</sub>, glassflasken ble så ristet i 15 sek. Blandingens skulle så hvile i 9 min for så å ristes lett før den ble plassert i beholderen, som vist i Figur 22.
- I beholderen ble glassflaske(1) justert rundt på skiven til den fargeverdien som var likest fargen i glassflaske(2). Fra dette kunne man lese av verdien for nitrogen i ppm (Figur 23).
- Når verdien ble avlest ble det gjort utregninger ut ifra hvilke forholdstall som ble brukt.

Eksempel på utregning

Forsøk 1: Forhold, 1:15 g

$$1g : 15g = 4ppm$$

$$4ppm \times 16 = 64ppm$$



Figur 22: Testing av nitrogen med Nitrate Pro Test Kit



Figur 23: Avlesing av nitrogenkonsentrasjon

Måling av fosfor (forhold, 1:16 g)

Måling av fosfor ble gjennomført på lik måte som ved målinger av nitrogen med noen variasjoner:

- 17 g filtrert vekstmedium ble tilført i glassflaske(1) som tilhører kittet (Figur 24).
- 1 g filtrert vekstmedium og 16 g destillert vann ble tilsatt i en identisk glassflaske(2).
- I glassflaske(2) ble det tilsatt 10 dråper av flaske A, PO<sub>4</sub>, glassflasken ble så ristet i 10 sek deretter ble det tilført 2 dråper av flaske B, PO<sub>4</sub>. Glassflasken ble ristet, plassert i beholderen som vist i Figur, og ble hvilende i 6 min før fargen ble avlest (Figur 24).
- Glassflaske(1) ble så plassert i beholderen som vist i (Figur 25) for å avgjøre verdien
- Når verdien ble avlest ble det gjort utregninger med forholdstallet (1:16).



Forsøk 1: Forhold, 2:15 g

Forsøk 2 og 3: Forhold, 1:16 g

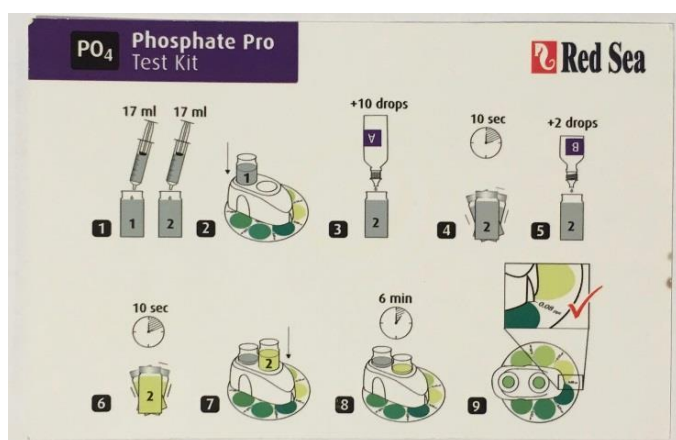
$$2g: 15g = 0,08 \text{ ppm}$$

$$1g: 16g$$

$$0,20\text{ppm} \times 17 = 3,4\text{ppm}$$

$$\frac{0,08\text{ppm}}{2} = 0,04 \text{ ppm}$$

$$0,04\text{ppm} \times 17 = 0,68 \text{ ppm}$$



Figur 24: Testing av fosfor med Phosphate Pro Test Kit



Figur 25: Avlesing av fosforkonsentrasjon

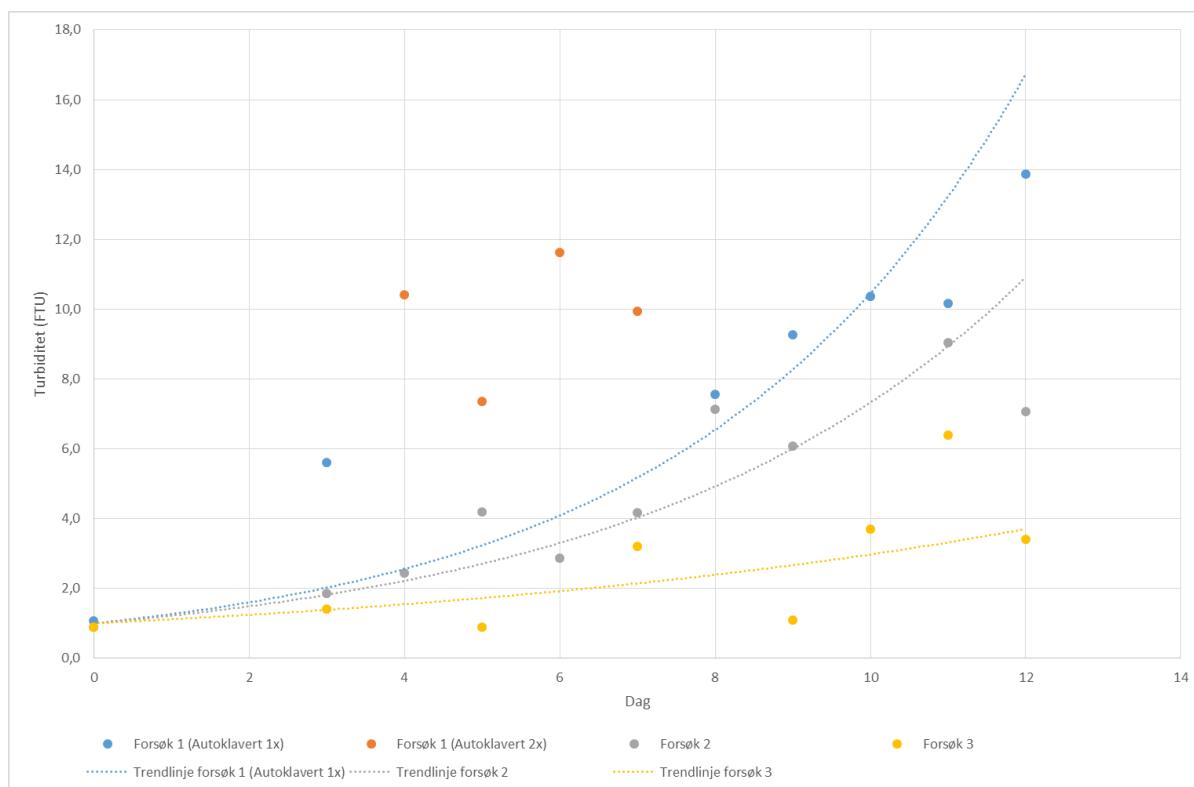
## 4. Resultater og observasjoner

I dette kapitlet blir resultatene og observasjonene fra forsøkene presentert. Stort format av figurene er lagt ved som vedlegg 10. Grafene som viser verdier for høstet algemasse og turbiditet presenterer utviklingen av vekst hos algene gjennom forsøkene. Grafen for fosfor konsentrasjon viser hvor stor mengde fosfor algene greide å ta opp. Gjennom forsøket ble det gjort en rekke observasjoner ved dyrking, oppbevaring av algekulturen, og ved innsamling av data. Nevnte observasjoner er presentert i gjeldende kapittel. Resultater og observasjoner vil siden bli drøftet i diskusjon.

### 4.1 Resultater

I Figur 24, er verdier for målt turbiditet ved forsøk 1, 2 og 3 presentert. For å vise utviklingen av målte turbiditetsverdier gjennom forsøket er det brukt en trendlinje. I forsøk 1 er det en jevn økning i turbiditet med unntak av noen av verdiene fra flaskene som ble autoklavert to ganger. Disse verdiene er spesielt høye. I forsøk 2 er turbiditeten lavere og verdiene er noe varierende. Det er likevel en tydelig økning i turbiditet fra start til slutt i forsøket. I forsøk 3 er verdien lavest. Det er store variasjoner i verdiene, noe som kan indikere en svak trend ved vektøkning. Den høyeste verdien som ble målt var i forsøk 1, dag 12. Turbiditeten var da målt til 13,9 FTU. I Tabell 3 er de spesifikke målte verdiene for turbiditet presentert.

Figur 24: Turbiditet for forsøk 1,2 og 3

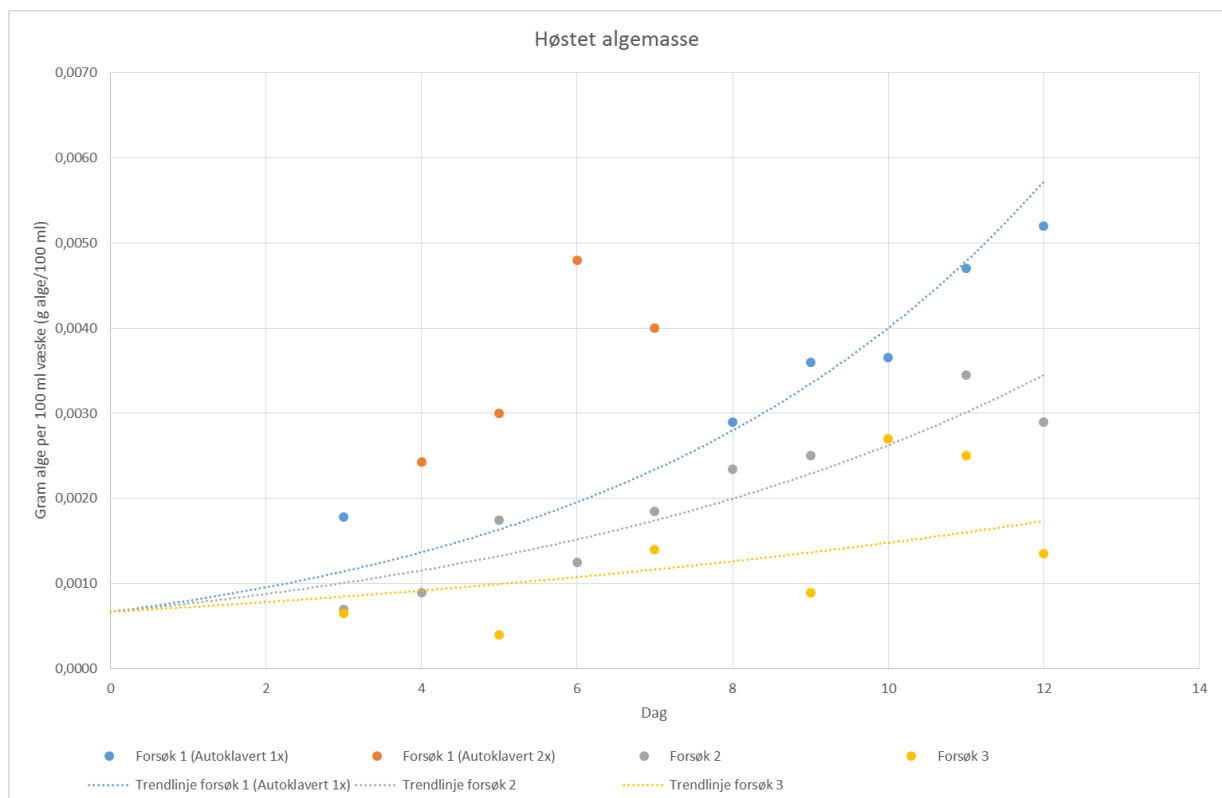


Tabell 3: Spesifikke verdier for punktene i figuren som presenterer Turbiditet

| Forsøk/Dag | 0   | 3   | 4    | 5   | 6    | 7   | 8   | 9   | 10   | 11   | 12   |
|------------|-----|-----|------|-----|------|-----|-----|-----|------|------|------|
| Forsøk 1   | 1,1 | 5,6 | 10,4 | 7,4 | 11,6 | 9,9 | 7,6 | 9,3 | 10,4 | 10,2 | 13,9 |
| Forsøk 2   | 0,9 | 1,9 | 2,4  | 4,2 | 2,9  | 4,2 | 7,1 | 6,1 | 2,7  | 9,0  | 7,1  |
| Forsøk 3   | 0,9 | 1,4 | –    | 0,9 | –    | 3,2 | –   | 1,1 | 3,7  | 6,4  | 3,4  |

Figur 25, Høstet algemasse, viser verdier for målt algevekt fra 100 g av det totale innholdet i flasken på 500 g. For å presentere utviklingen av vekten gjennom forsøket er det brukt en eksponentiell trendlinje. I Forsøk 1 ble fire av flaskene autoklavert to ganger. Nevnte flasker er presentert i grafen med oransje punkter. Verdiene fra forsøket viser en jevnt økende vekt for høstet algemasse fra flaskene som ble autoklavert en gang, og en høyere vekt for flaskene som ble autoklavert to ganger. Verdiene for flaskene som var autoklavert to ganger ble derfor ekskludert i trendlinjen. I forsøk 2 var vekten lavere enn i forsøk 1 og forholdsvis jevn. Den laveste vekten forekom i forsøk 3, hvor det på samme tid var størst variasjon i verdiene. Trendlinjen er her presentert ut fra 7 verdier da det var gjort 7 innsamlinger av data for forsøk 3. Den høyeste oppnådde mengden var målt i flaske 10 i forsøk 1 (dag 12), med en høstet algemasse på 0,0052 g for 100 g vekstmedium. I er de spesifikke målte verdiene for høstet algemasse presentert.

Figur 25: Gram høstet algemasse fra forsøk 1, 2 og 3 per 100 g vekstmedium

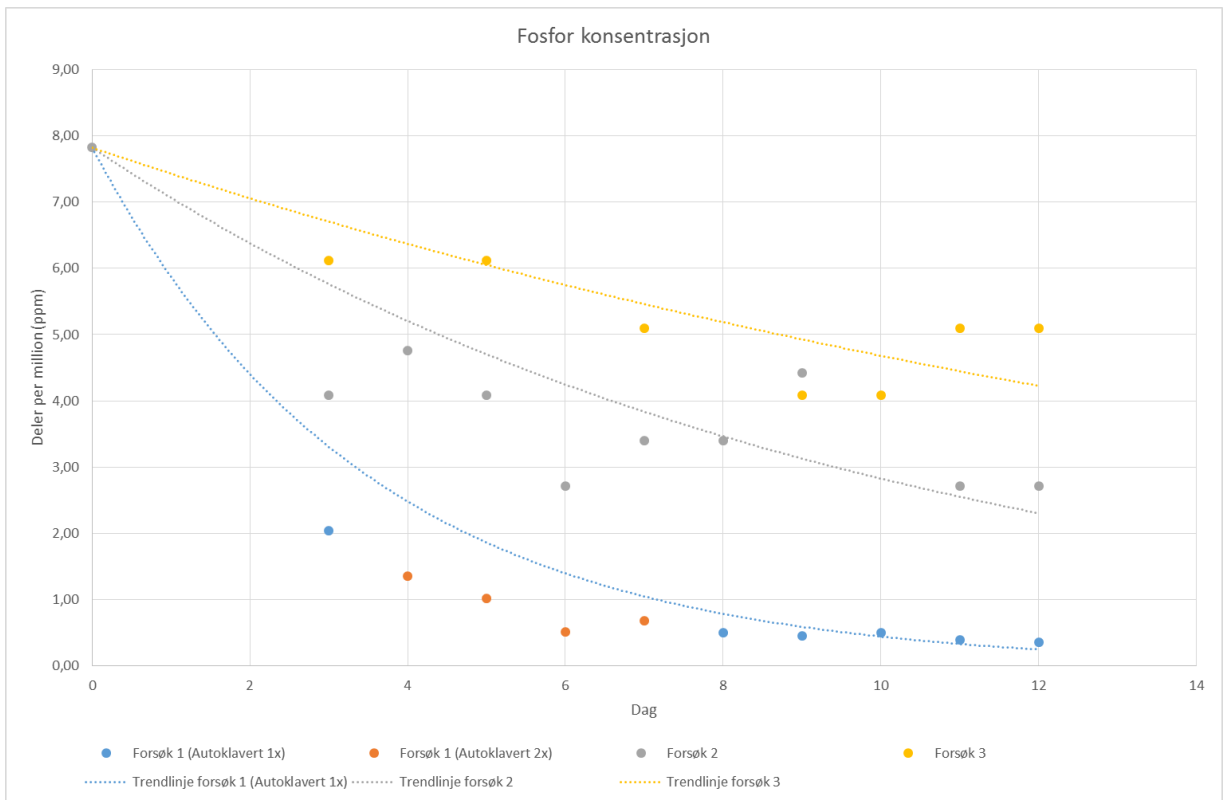


Tabell 4: Spesifikke verdier for punktene i figuren som presenterer høstet algemasse

| Forsøk/Dag | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      | 10     | 11     | 12     |
|------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Forsøk 1   | 0,0018 | 0,0024 | 0,0030 | 0,0048 | 0,0040 | 0,0029 | 0,0036 | 0,0037 | 0,0047 | 0,0052 |
| Forsøk 2   | 0,0007 | 0,0009 | 0,0018 | 0,0012 | 0,0019 | 0,0024 | 0,0025 | 0,0011 | 0,0034 | 0,0029 |
| Forsøk 3   | 0,0007 | –      | 0,0004 | –      | 0,0014 | –      | 0,0009 | 0,0027 | 0,0025 | 0,0014 |

Figur 26, Fosfor konsentrasjon, viser målte verdier av fosfor i vekstmediet gjennom forsøkene. For å presentere utviklingen for konsentrasjonen gjennom forsøket er det brukt en trendlinje. Dag 0 er representativ for fosforverdiene i vekstmediet før algene ble tilført. Den var på 7,82 ppm. I forsøk 1 er det en tydelig reduksjon av fosfor gjennom forsøket. Det er ingen markant variasjon mellom flaskene som ble autoklavert en og to ganger. Utviklingen som er presentert i trendlinjen samsvarer med verdiene som er målt. I forsøk 2 er det større variasjoner mellom verdiene. Det er likevel tydelig at det har vært en nedgang i fosfor, men at den har vært svakere enn i forsøk 1. Den svakeste nedgangen er i forsøk 3, med lik variasjon i verdiene som i forsøk 2. Den laveste verdien som ble målt var i forsøk 1, dag 12 med en verdi på 0,36 ppm. Prosentvis reduksjon i fosfor fra målt utgangspunktverdi på 7,82 ppm til laveste målt verdi ved forsøk 1 var 95,4 %. Ved forsøk 2 var målt nedgang i fosfor 65,22 %, og i forsøk 3 var det en reduksjon på 34,78 %. I Tabell 5 er de spesifikke målte verdiene for fosfor konsentrasjon presentert.

Figur 26: Konsentrasjon av fosfor i vekstmedium ved forsøk 1, 2 og 3



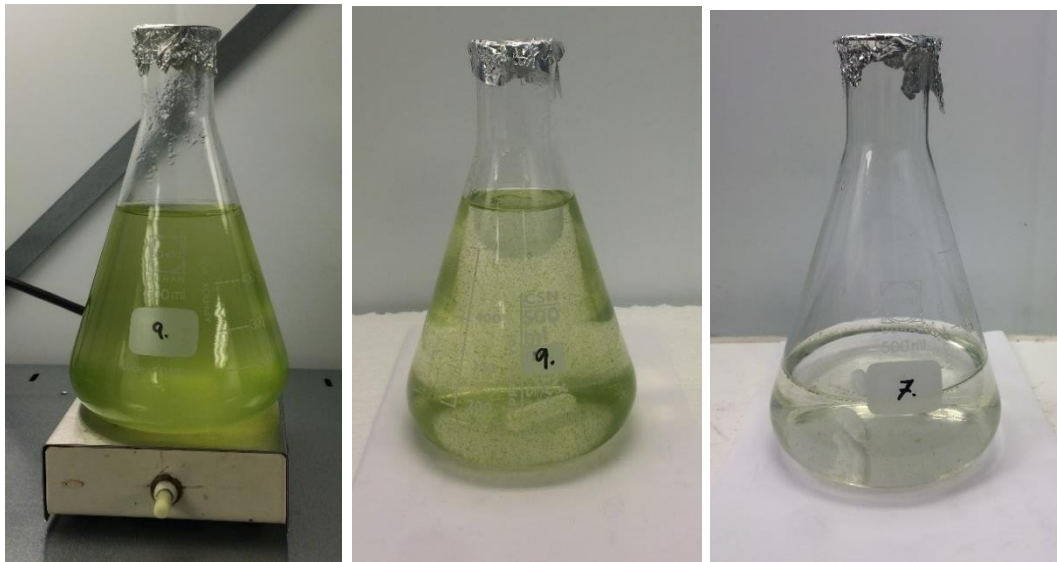
Tabell 5: Spesifikke verdier for punktene i figuren som presenterer fosfor konsentrasjon

| Forsøk/Dag | 0    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   |
|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Forsøk 1   | –    | 2,04 | 1,36 | 1,02 | 0,51 | 0,68 | 0,50 | 0,45 | 0,50 | 0,40 | 0,36 |
| Forsøk 2   | 7,82 | 4,08 | 4,76 | 4,08 | 2,72 | 3,40 | 3,40 | 4,42 | 3,23 | 2,72 | 2,72 |
| Forsøk 3   | –    | 6,12 | –    | 6,12 | –    | 5,10 | –    | 4,08 | 4,08 | 5,10 | 5,10 |

## 4.2 Observasjoner

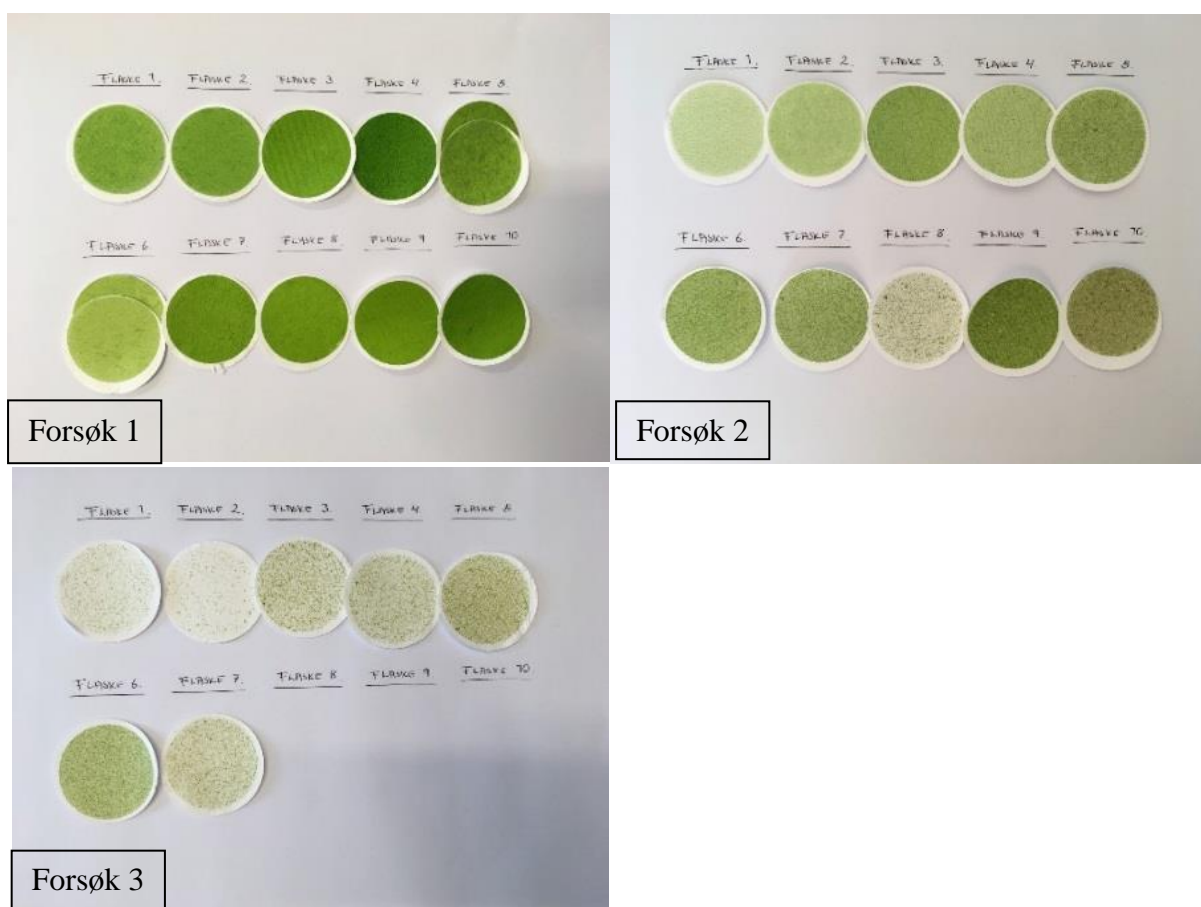
Det var observert flere visuelle variasjoner mellom forsøkene.

I forsøk 1 var algene jevnt fordelt i vekstmediet. I Forsøk 2 og 3 var algene samlet i små sammenkomster, hvor sammenkomstene var tydeligere i forsøk 3 enn i forsøk 2. Dette er illustrert i Figur 27, der forsøk 1 er til venstre, forsøk 2 i midten og forsøk 3 til høyre. I forsøk 1 ble det observert en tydelig fargeutvikling gjennom forsøket, denne utviklingen var svakere i forsøk 2 og 3. Dette blir vist i Figur 27 der forsøk 1 har grønnere farge ved dag 10 enn forsøk 2 og 3. I forsøk 3 er fargen tydelig svakere enn i forsøk 2 og 3.



*Figur 27: Viser hvordan algekulturen har utviklet seg frem til dag 10 i forsøk 1, 2 og 3. (fra venstre)*

Det var også en variasjon i grønn fargen som utviklet seg. Det første forsøket hadde en skarp grønn nyanse i flaskene, mens i det andre forsøket var det en svakere grønn nyanse hvor det gradvis utviklet seg et svakt brunskjær. Dette er illustrert ved å se på fargeutviklingen på filterne (Figur 28). Det er illustrert en tydelig svakere fargeutvikling i forsøk 2 og 3 enn i forsøk 1. I forsøk 2 og 3 er det også en svak brun nyanse, og gradvis utvikling av brunskjær mot slutten.



Figur 28: Glassfiberfilter med algekultur som viser fargeutviklingen gjennom forsøk 1, 2 og 3



Det var fargevariasjoner mellom flaskene observert på samme dag. Dette er illustrert i Figur 29, der en ser tydelig fargeforskjell mellom flaske 8 og 9, der begge flaskene er fra forsøk 2 dag 10.

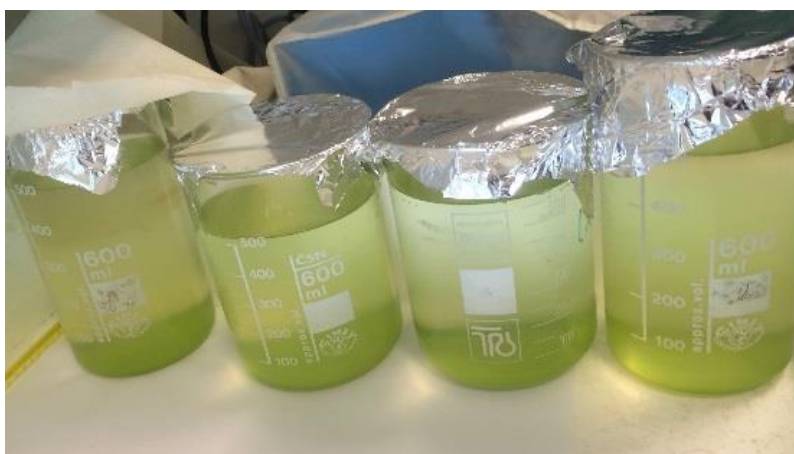


*Figur 29: Tydelig fargevariasjon mellom flaske 8 og 9 ved dag 10. forsøk 2*

Når algekulturen ble blandet i ellevann for oppbevaring, startet noen av algene gradvis å skille seg fra vannet. Når algene ble plassert på en magnetrører ble algene og ellevannet igjen en jevn væske, og grønnskjæret i vannet ble slik opprettholdt.

Etter oppbevaring i 15 dager startet grønn fargen å falme, og en brun-grønn farge utviklet seg. Algene og vannet blandet seg da også dårligere når glasset ble plassert på magnetrører.

Fargeutviklingen er illustrert ved Figur 30 som viser algekulturen etter 2 dager og Figur 31. som viser algekulturen etter 15 dager.



*Figur 30: Viser algekultur som er utblandet i ellevann etter 2 dager*



*Figur 31: Viser algekultur som er utblandet i ellevann etter 15 dager*

## 5. Diskusjon

### 5.1 Diskusjon av resultatene

Resultatene av veksten til *C. Vulgaris* dyrket i avløpsvann med en lysintensitet på 2400 lx og en temperatur på 22°C +/- 2 °C ble tolket ved å analysere grafene opp mot observasjoner. I forsøk 1 hvor lysintensiteten og temperaturen var optimal var veksten størst, og det er i grafen vist en tydelig eksponentiell vekst. Ved dag 12 var det målt en turbiditet på 13,9 FTU, og produsert 0,0052 g biomasse av 100 g vekstmedium. Mengde fosfor i vekstmediet var målt til 0.36 ppm, som tilsier en reduksjon på 95.4 %. Målingene for turbiditet og vekt av høstet algemasse indikerer vekstutvikling hos algene. Reduksjonen i fosfor er videre en indikasjon på vekst hos *C. Vulgaris* da alger tar opp fosfor for å vokse. Nedgangen i fosfor samsvarer med resultatene for turbiditet og høstet algemasse. Gjennom forsøket var det observert en utvikling i grønnfarge (Figur 27), som tydelig var sterkere fra dag til dag (Figur 28). Denne observasjonen bekrefter tolkningen av resultatene. Ved tolkning av resultat og observasjoner kan en si at *C. Vulgaris* har forutsetninger for vekst i avløpsvann fra settefiskanlegg med optimale temperatur og lysintensitet. Det er et resultat som var ventet ut i fra litteratur (Ho et al., 2012; Scragg et al., 2002; Serra-Maia et al., 2016).

I forsøk 2 var lysintensiteten redusert med 50 % fra optimale forhold (1200 lx), og temperaturen var optimal. Den høyeste verdien for turbiditet var registrert på dag 11 til 9,0 FTU. Høyeste vekt for høstet algemasse var også målt til dag 11 med en produksjon på 0,0034 g av 100 g vekstmedium. Resterende mengde fosfor etter forsøket var 2.72 ppm. Målingene for fosforkonsentrasjon viste da en reduksjon på 65.2% gjennom forsøket. Resultatene for turbiditet, høstet algemasse og fosforkonsentrasjon samsvarer med hverandre. Veksten som er presentert for begrenset lysintensitet er tydelig svekket sammenlignet med resultatene som ble presentert for optimal lysintensitet. Observasjonene av fargeutviklingen i forsøk 2 vurdert opp mot fargeutviklingen i forsøk 1, samsvarer med tolkningen av resultatene (Figur 27). Man kan fra dette si at *C. Vulgaris* har forutsetninger for vekst i avløpsvann med begrenset lysforhold, men veksten er redusert sammenlignet med optimale forhold.

Med bakgrunn i valg av begrenset lysintensitet og viktigheten av lysforhold og vekstutvikling (Singh & Singh, 2015) var det ventet at veksten ville bli redusert sammenlignet med veksten i optimale forhold (forsøk 1).

I forsøk 3 hvor temperaturen var begrenset til 15 °C +/- 2 °C var veksten lav. For turbiditet ble høyeste verdi målt ved dag 11 på 6,4 FTU. Høyeste vekt for høstet algemasse var ved dag 10, med en produksjon på 0,0027 g biomasse av 100 g vekstmedium. Konsentrasjonen av fosfor var gjennom forsøket redusert med 34,78 %. Resterende mengde fosfor i vekstmediet var da 5.10 ppm. Veksten i begrenset temperaturforhold er tydelig svekket sammenlignet med veksten i optimale temperaturforhold. Dette samsvarer med fargeutviklingen som ble observert i forsøk 3, da den var tydelig svakere enn fargeutviklingen i forsøk 1. Ut ifra det kan man si at *C. Vulgaris* har begrenset forutsetninger for vekst i avløpsvann fra settefiskanlegg ved begrenset temperaturforhold. Med bakgrunn i valg av begrenset temperatur, samt viktigheten av temperaturen for vekstutvikling (Singh & Singh, 2015) var det ventet at veksten ville bli redusert sammenlignet med veksten i optimale forhold (forsøk 1). Hvor stor reduksjon som ville være reelt, både ved begrenset lys og temperatur, er ikke vurdert da oppgaven ikke gir tilstrekkelig grunnlag for å besvare dette.

I forsøk 2 og 3 var det indikasjoner på en redusert vekst mot slutten av forsøkene. Bakgrunnen for dette kan være relatert til dyrkingsforholdet. Mediet EG: JM som ble anbefalt av CCAP for dyrking av stammen 211/11B, besto av nitrogen (NO<sup>3</sup>) og fosfor (PO<sup>4</sup>) i ulike former (Tabell 6). I tillegg til disse næringsstoffene består mediet EG: JM også av Jern (Fe), Mangan (Mn), Molybden (Mo), som ifølge Yeh og Chang (2011) er viktige sporstoffer. Spencer (1957) anbefaler også at vekstmediet inneholder kobber (Cu), sink (Zn) og kobolt (Co). Sammensetningen av disse stoffene utgjør et ideelt forhold for å stimulere vekst hos *C. Vulgaris*. Vekstmediet som ble brukt i forsøket bestod av høye konsentrasjoner av nitrogen og fosfor, og et ukjent nivå av andre næringsstoffer og sporstoffer. Fra egne målinger var det bare reduksjon av nitrogen og fosfor som kunne måles. Reduksjon av andre næringsstoffer og sporstoffer ville derfor ikke bli registrert. I følge Spencer (1957) vil tilgjengeligheten av essensielle sporstoffer være avgjørende for vekst hos encellede alger. Det kan regulere veksthastigheten, mengden total biomasse som blir produsert, eller begge deler. For at algen lettere skal kunne utnytte sporstoffene er en avgjørende faktor hvilken form og mengde sporstoffene er tilgjengelig i. I følge Spencer (1957) er det grunn til å tro at reduksjonen i vekst som forekommer mot slutten av forsøkene skyldes mangel av uvisst sporstoff. Teorien er støttet av marinbiolog Dale (2017).

Tabell 6: Nitrogen og fosfor i ulike former i mediet EG:JM

|   |   |
|---|---|
| EG:JM besto av nitrogen ( $\text{NO}^3$ ) og fosfor ( $\text{PO}^4$ ) i ulike former.<br>(g per 200 ml avionisert vann) |   |
| $\text{NO}^3$ i form av:  | 4,2 g $\text{Ca}(\text{NO}^3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$<br>16, g $\text{NaNO}^3$           |
| $\text{PO}^4$ i form av:  | 2,48 g $\text{KH}_2\text{PO}^4$<br>7,2 g $\text{Na}_2\text{HPO}^4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ |

## 5.2 Gradering av usikkerheter

Gjennom forsøket ble det gjort rede for usikkerheter som kan ha innvirkning på validiteten av oppgaven. Altså i hvilken grad det kan bli trukket gyldige slutninger mellom forsøkets formål og endelig resultat. Videre blir disse usikkerhetene presentert, drøftet og gradert ut i fra hvor stor påvirkning de har på sluttresultatet. Gradene er satt til liten grad, medium grad eller stor grad og er presentert i tabell Tabell 8.

(5.2.1) I forberedelsene til forsøk 1 ble flaske 2-5 autoklavert to ganger. Første gang ble det ikke oppnådd en temperatur på  $120\text{ }^\circ\text{C}$  som ønsket. Da deler av vekstmediet vil fordampe under autoklaving vil det forekomme en økt konsentrasjon av næringssalter i flaskene som ble autoklavert to ganger. I forsøk 1 ser en tydelig forskjell mellom flaskene som ble autoklavert en og to ganger, da sistnevnte har høyere verdier. Dette er illustrert spesielt i Figur 24 og Figur 25, men er ikke like fremtredende i Figur 26. Da verdiene for flaskene som er autoklavert to ganger skiller seg ut fra resterende verdier i forsøk 1, ble de markert i figurene som presenterer resultatene (er vist med oransje farge). Det er også verdt å nevne at hvis en ser vekk fra flaskene som er autoklavert to ganger, viser både Figur 24 og Figur 25 en jevn økende trend. Fra denne informasjonen er det grunn til å si at flaskene som ble autoklavert to ganger ble påvirket av dette i stor grad. Likevel har denne påvirkningen i liten grad gitt utslag ved endelig resultater.

(5.2.2) I forsøk 1 ble tørrvekten av filtrere veid samme dag som flasken ble tatt ut. Selv om filtrere hadde vært oppbevart i en eksikator i mellomtiden, er det usikkert hvorvidt glassfiberfiltrere tok opp fuktighet fra luften før de ble veid. Filteret som ble brukt dag 10 vil da kunne være mer påvirket enn filteret som ble brukt dag 9, osv. Dette kan gi utslag på vekt ved høstet algemasse. Denne usikkerheten er vurdert til å i liten grad ha innvirkning på resultatet.

(5.2.3) Vekten som ble brukt i forberedelsene til forsøkene ble byttet ut etter forsøk 1. Denne vurderingen ble tatt når den første vekten sluttet å fungere optimalt. Vekten som ble brukt i forsøk 1 var en SAUTER, R3000 og i forsøk 2 og 3 ble vekten KERN, Ple brukt. Da ulike vekter kan gi marginale variasjoner ved avlesning, er bytte av vekt en usikkerhet som er vurdert til å påvirke resultatene i liten grad.

(5.2.4) Testing av næringsinnhold ble gjennomført av begge forfatterne. Ettersom avlesningen av næringsinnholdet var fargekodet vil det være variasjoner innen tolkningen av fargene for ulike personer. Da det er snakk om en svak reduksjon i fosfor (se Figur 26) vil denne feilmarginen kunne gi en innvirkning på resultatet. I forsøk 2 og 3 da reduksjonen i fosfor var marginal er verdiene tydelig varierende. Det er en indikasjon på at denne usikkerheten kan ha påvirket resultatene i stor grad.

(5.2.5) Ved telling av celler i mikroskop i forsøk 2 og 3 hadde kulturen samlet seg i klumpete forekomster. Partiet som ble telt i mikroskopet kan da være mindre representativt for kulturens helhet enn om kulturen hadde vært jevnt fordelt i vekstmediet. Dette kan resultere i at mengden algekultur som blir tilført i forsøk 1 sammenlignet med forsøk 2 og 3 er ulik. I forsøk 2 ble det observert fargevariasjoner mellom flaskene gjort på samme dag. Dette indikerer at veksten er varierende i de ulike flaskene. Observasjonen er illustrert i Figur 29. Det er sannsynlig at usikkerheten kan ha påvirket forsøk 2 i medium grad. I Forsøk 3 var fargeutviklingen for svak til å observere en endring mellom flaskene (Figur 27 viser fargen i forsøk 3 ved dag 10. Figur 28 viser fargeutviklingen illustrert med høstet algemasse på glassfiberfilter i forsøk 3). Det er likevel sannsynlig at usikkerheten kan ha påvirket resultatene i samme grad som i forsøk 2.

(5.2.6) Ved tilførsel av algekultur i forsøk 3 var det ikke nok resterende kultur for å tilsette 96 800 000 celler i ti flasker. Syv flasker ble derfor fylt med 250 g vekstmedium og 48 400 000 celler. Det var derfor mulig å hente ut resultater fra 7 dager (Tabell 7).

Da forholdet mellom mengde vekstmedium og mengde tilsatt algekultur var likt i forsøk 3 som i forsøk 1 og 2 vil denne usikkerheten påvirke resultatene i liten grad.

Tabell 7: Hvilken dag flaskene ble tatt ut fra klimarom ved forsøk 3

|                    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
|--------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| Dag                | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| Uttak av flaske nr |   |   |   | 1 |   | 2 |   | 3 |   | 4 | 5  | 6  | 7  |

(5.2.7) Algekulturen som ble tilført i forsøk 2 var blitt mellomlagret i forhold som ikke var optimale. Utslaget av oppbevaringen blir derfor vurdert opp mot observasjoner, da resultatene som er presentert kan være begrenset av faktorene som ikke er målt. Usikkerheten er relatert til tre faktorer: (1) Algekulturen som ble brukt i forsøk 2. (2) Utvikling av kulturen gjennom forsøk 2. (3) Videre utvikling av hovedkultur. (1) I algekulturen som ble tilført i forsøk 2 var deler av algene samlet i mindre klumpete formasjoner. (2) Denne utviklingen fortsatte etter at forsøk 2 var startet, der formasjonene ble større utover i forsøket. Det er viktig å ta med i betraktningen at selv om kulturen fremstod annerledes i forsøk 2 enn i forsøk 1, var fargeutviklingen fortsatt god. Fargeutviklingen er illustrert ved Figur 28 som viser glassfiberfilter med høstet algemasse. Deler av kulturen var samlet i klumpete formasjoner, og noe av kulturen var jevnt fordelt i vekstmediet (Klumpete sammenkomster i forsøk 2 og fargeforskjell mellom forsøk 1 og 2 ved dag 10 er illustrert i Figur 27). (3) I tidsrommet etter at deler av kulturen var tilført i forsøk 2, ble det observert en endring i hovedkulturen. Dette er illustrert i Figur 31. Denne utviklingen hos algekulturen gir indikasjoner på at oppbevaringen i elvevann var ugunstig, og at kulturen bestod av mangler. Det er uvisst i hvilken grad eventuelle mangler påvirket kulturen i forsøk 2 og da tilhørende resultater. En eventuell påvirkning vil medføre at veksten som er presentert i resultatene vil være begrenset av andre faktorer enn lys. Potensialet for dyrking av alger i begrenset lysforhold kan derav være høyere enn hva resultatene indikerer. Da kulturen viste god vekst og fargeutvikling, til tross for mulige mangler er usikkerheten vurdert til liten grad av påvirkning på resultatene i forsøk 2.

(5.2.8) For å kunne gjennomføre forsøk 3 ble resterende væske fra forsøk 2 spart, og dyrket videre i klimarom under samme forhold som forsøk 2. Da kulturen hadde vært dyrket i et forsøk tidligere med begrenset lys, er det trolig at begrenset lysintensitet, og mangler som er diskutert i avsnitt (5.2.7), se punkt (1) og (3), kan ha hatt en innvirkning på utviklingen av kulturen. I

Figur 24, Figur 25 og Figur 26 er det vist en tydelig reduksjon i vekst fra forsøk 2 til forsøk 3. Dette samsvarer med observasjonen gjort i Figur 27 der fargen i forsøk 3 er tydelig svakere enn i forsøk 2 (dag 19). Trolig har da usikkerheten rundt mellomagringsforholdet av algekulturen påvirket forsøk 3 i stor grad. På bakgrunn av usikkerheten rundt validiteten av resultatet, er det ikke mulig å si noe om hvor stor grad reduksjon i vekst hos *C. Vulgaris* er påvirket av begrenset temperatur sammenlignet med optimale forhold og begrenset lysintensitet. Til tross for usikkerheten rundt de spesifikke verdiene, er det vist en trend som indikerer at veksten hos *C. Vulgaris* reduseres ved senket temperaturforhold. Denne trenden er i samsvar med ventet resultat ut i fra litteratur Serra-Maia et al. (2016, s. 355) og CCAP.

Tabell 8: Gradering av usikkerheter ved gjennomføring av metode

| Nummer: | Usikkerhet omhandler:                                     | Enkel forklaring   | Gradering for påvirkning av sluttresultat |
|---------|---|--|---|
| 5.2.1   | Forsøk 1: Autoklaving av flaske 2-5 to ganger             | Større konsentrasjon av næringssalter i flaske 2-5, ettersom mer vann fordampet da flaskene ble autoklavert to ganger            | Liten grad                                |
| 5.2.2   | Forsøk 1: Tørrvekt av glassfiberfilter                    | Filtrene kan ha tatt opp luftfuktighet da tørrvekt ble veid etter oppbevaring i eksikator  | Liten grad                                |
| 5.2.3   | Forsøk 1: Bytte av vekt mellom forsøk 1 og forsøk 2 og 3. | Byttet vekten som ble brukt i forberedelsene til forsøkene fra en SAUTER, R3000 til KERN, Ple, da førstnevnte sluttet å fungere. | Liten grad                                |
| 5.2.4   | Forsøk 2 og 3: Testing av fosfor                          | Menneskelig feil ved avlesing av fosfor, da målinger ble gjennomført av begge forfatterne.                                       | Stor grad                                 |
| 5.2.5   | Forsøk 2 og 3: Telling av algekultur                      | Kulturen bestod av klumpete formasjoner ved forsøk 2 og 3, en tilstand som ikke var  | Medium grad                               |

|       |   |  |            |
|-------|---|--|------------|
|       |   | tilstedeværende i forsøk 1   |            |
| 5.2.6 | Forsøk 3: Tilførsel av algekultur                 | På grunn av begrenset mengde algekultur ble det brukt 7 flasker istedenfor 10. De inneholdt mindre vekstmedium, men samme forholdstall mellom algekultur og vekstmedium. | Liten grad |
| 5.2.7 | Forsøk 2: Oppbevaringsforhold til hovedalgekultur | Påvirkning av oppbevaringsforhold til algekultur før forsøket  | Liten grad |
| 5.2.8 | Forsøk 3: Oppbevaringsforhold til hovedalgekultur | Påvirkning av oppbevaringsforhold til algekultur før forsøket  | Stor grad  |

### 5.3 Rensing av avløpsvann

Ved å bruke avløpsvann som vekstmediet til dyrking av mikroalger, benytter en seg av mikroalgers mange potensialer. Ønsket om å rense avløpsvann fra settefiskanlegg er relatert til akvakulturens store utslipp av næringssalter til norske marine områder (Selvik & Høgåsen, 2016). På samme tid som for stor tilførsel av næringssalter kan føre til forurensning (Svåsand et al., 2017) er det også en sløsing av ressurser, da tilgjengeligheten til nitrogen og spesielt fosfor er begrenset (Richlefs & Freeman, 1990, s. 223). Fra resultatene i forsøkene er det gode indikasjoner på at konsentrasjonen av fosfor i avløpsvann fra settefiskanlegg, kan reduseres betraktelig ved dyrking av *C. Vulgaris*. Resultatet samsvarer med funn i følge Dalrymple et al. (2013), hvor mer enn 85 % av fosforen ble fjernet (*Chlorella* sp. og *Scenedesmus* sp.)

I dag utvinnes fosfor fra fosforstein som er en ikke-fornybar ressurs, og i motsetning til fossilt drivstoff er det heller ingen alternative kilder for å utvinne fosfor. Fosfortoppen er estimert å være rundt år 2035, og global fosfor sikkerhet kan ifølge Cordell, Rosemarin, Schröder, og Smit (2011) bli en av de største utfordringene ved det 21 århundre. Det kan trolig unngås hvis en får en mer bærekraftig utnyttelse, og reduserer dagens sløsing.



Før algene ble tilsatt ble verdien for nitrogen i avløpsvannet målt til 25 ppm (SognLab) Denne verdien samsvarte dårlig med målte verdier fra *Red Sea Algae Control PRO Test Kit*. Gjennom egne målinger ble det målt en nitrogenkonsentrasjon på først 64 ppm og så 128 ppm med utblandet vekstmedium. Dette tilsier at nitrogennivået var høyere en 128 ppm gjennom hele forsøket. Da måleutstyret ikke kunne måle høyere verdier ble reduksjon i nitrogen ikke påvist gjennom forsøket. Da det er påvist vekst hos kulturen i alle forsøkene vil denne veksten likevel være en indikasjon på reduksjon i nitrogen. Reduksjonen i nitrogen vil være høyest i forsøk 1 der veksten var størst, og minst i forsøk 3 der veksten var lavest. Fra dette kan vi påvise reduksjon i nitrogen for dyrking av *C. Vulgaris* i avløpsvann, men en har ikke grunnlag for å påvise i hvor stor grad *C. Vulgaris* kan rense avløpsvann fra settefiskanlegg for nitrogen. Forøvrig gjennomførte Dalrymple et al. (2013) et lignende forsøk med dyrking av *Clorella* sp. og *Scenedesmus* sp. i nitrogenrik avløpsvann, hvor 60% av nitrogenet ble tatt opp.

Da nitrogen er avgjørende for vekstforholdene til alger (Wang et al., 2008) er det viktig å undersøke hvordan nitrogenrikt avløpsvann påvirker vekstvilkårene. Ved å begrense mengden nitrogen i vekstmedium, er det registrert økt mengde lipider, og da økt energiinnhold (Wang et al., 2008). Da det i avløpsvannet var antatt å være store mengder nitrogen, vil kulturen ikke bli utsatt for stress i den grad at de produserer optimal mengde lipider. Samtidig vil stresset resultere i en negativ innvirkning på celledeling og reproduksjon av kulturen, og være en avgjørende faktor for produksjon av biomasse (Wang et al., 2008). Sett opp mot hverandre vil gunstige forhold (høy konsentrasjon av nitrogen) som resulterer i høy grad av celledeling, gi større utbytte enn nitrogenfattige vekstforhold som øker konsentrasjonen av lipider i hver celle. Dette resulterer i at den høye konsentrasjonen av nitrogen i avløpsvannet, ikke har en avgjørende begrensende innvirkning på produksjon av nyttbar biomasse til biodrivstoff.

## 5.4 Mikroalger som ressurs i bioøkonomien

Dyrking i avløpsvann har et stort potensiale for bedre utnyttelse av næringsstoffer som allerede er i omløp (Cordell et al., 2011). Næringsstoffer i omløp har de også gjort nytte av på Mongstad, hvor det brukes fanget CO<sub>2</sub> for å dyrke mikroalger. Ved dyrking av mikroalgene blir mengder av avfallet tatt vare på, istedenfor og slippes rett ut i luften (Aadland, 2016, 18.04). Samtidig som en kan spare ressurser, kan det også være en faktor for å bedre det økonomiske potensiale for produksjon av biodrivstoff. Det er blitt argumentert for at produksjon av biodrivstoff i forbindelse med rensing av avløpsvann, over kort tid vil øke potensialet (Brennan & Owende, 2010).

I følge Chew et al. (2017) er det økonomiske potensialet for mikroalger som biodrivstoff ikke konkurransedyktig med fossile energikilder. Likevel vil mikroalger på sikt kunne være konkurransedyktig, ettersom en må finne nye miljøvennlige måter å produsere energi på. Utvikling av ny teknologi, potensielt høyere priser på fossil energi, og omstilling til et fossilt-slankt samfunn, vil kunne gjøre kostnadene lavere. Ved å se på mulighetene mikroalger kan tilføre i allerede tilstedeværende produksjoner kan en øke mikroalgene sin økonomiske posisjon. Ved å anvende prinsippet om bioraffineri og se på mikroalger som en ressurs for å utvinne biodrivstoff og verdifulle co-produkter, vil lønnsomheten av produksjonen kunne øke (Chew et al., 2017). Dette støttes av Brennan og Owende (2010) som viser til at ved å oppnå høy avkastning av både lipider og biomasse, kombinert med produksjon av co-produkter kan den økonomiske posisjonen til alger som biodrivstoff styrkes. Eksempelvis er det i dag økonomisk gunstig å dyrke mikroalger for anvendelse i legemiddelindustrien (lukkede fotobioreaktorer med kunstig lys) (Patil, Tran, & Giselrød, 2008). Et bruksområdet som gir muligheter for å redusere kostnader ved produksjon av biodrivstoff fra mikroalger (Patil et al., 2008). Forskningsprosjekter på dyrking av mikroalger er ikke nytt, men har foregått i lengre tid.

Forskningen gjort ved *Aquatic Species Program* hadde viktige funn som har ført til ny videre forskning på området. Det viser at teknologiutvikling ofte krever tid og ressurser før en oppnår gjennombrudd i forskningen. Det virker nå som tiden er mer moden for satsing på dyrking av mikroalger, og det er stor fokus på slike prosjekter. SINTEF som blant annet forsker på dyrking av mikroalger har annonsert at de mener de vil ha en løsning for å etablere en stabil og økonomisk bærekraftig produksjon i nær fremtid. Konseptet om bioraffineri vil være en viktig

brikke for å få det til (SINTEF, 2013, 13.02). På samme tid har forskningsprogrammet AlgaeParc også hatt fremgang i sine forskningsprosjekt. De har på to år klart å få til en 50 % reduksjon i kostnader for produksjon av mikroalger (AlgaePARC, 2017, 10.05) .

For å få utnyttet potensialet til mikroalger er det viktig at forskningen som blir utført videreføres til storskala produksjonsforhold. I følge Silva og Reis (2015) er gode resultater som er oppnådd i laboratoriet vanskelig å opprettholde i storskala produksjon over et lengre tidsrom. En sammensatt forklaring er at ved optimal produksjon er en avhengig av kontrollerte forhold for biomassens dyrkingsareal- og tetthet under spesifikke tidsintervaller. Faktorene må videre undersøkes for hver enkelt art, lokasjon og for hvilken sesong på året som er relevant (Silva & Reis, 2015). I forsøkene som ble gjennomført i denne oppgaven, ble dyrking av alger i begrensede forhold gjennomført. Det var for å etterligne aktuelle begrensninger. Svekket temperatur og lysforhold kan være reelle i storskala produksjonsforhold. utfordringer relatert til storskala produksjon er en grunn til at videre forskning og flere storskala prosjekter er etterspurt hos forskere på feltet. En trenger mer kunnskap og kontinuerlig videreutvikling av ny teknologi for å kunne øke tilgjengeligheten og gjøre mikroalger som råstoff til bioenergi kommersielt (Brennan & Owende, 2010). I tillegg til forskere trengs investorer og grundere som tenker langsiktig, og ser muligheter og løsninger for fremtiden (Biokraft, 2016). Med biodrivstoff som nytt satsingsfelt, er en også avhengig av at politikere gir gode rammevilkår for bedrifter, slik at de kan lykkes med produksjon. Dette har ifølge Fevolden og Klitkou (2016), ikke vært tilfellet i Norge hvor regjeringens mangel på pålitelig- og forutsigbar politikk har fått deler av skylden for at biodrivstoff produksjon er ikke er så utviklet som denne kunne ha vært til nå. Eksempelvis da regjeringen i 2009 uventet stoppet skattefritak på biodiesel. Det førte til at bedrifter som produserte biodiesel måtte stenge, og hindret andre bedrifter i å investere i nye storskala prosjekt.

I november 2016 kom imidlertid regjeringen med en bioøkonomistrategi. Målet er økt verdiskaping, sysselsetting og reduserte klimagassutslipp. Det skal en gjøre ved å fremheve kunnskap og teknologi som kan bruke fornybare biologiske ressurser fra ulike næringer, som igjen kan brukes i ulike industrier. Noen av tiltakene er å styrke innsatsen på forskning, teknologiutvikling, opptrapping av bruk av biodrivstoff frem mot 2020, og utvikle bedre forvaltning for utnytting av marine ressurser (Nærings- og fiskeridepartementet, 2016).

På samme tid gav Norges forskningsråd, Norsk senter for plankton teknologi støtte til å bygge opp et nytt laboratorium hvor industri og forskere sammen skal utvikle konsepter. Målet er å bygge opp en ny biomarin industri i Norge. Dette er et forskningsprosjekt som blir ledet av SINTEF og NTNU, og vil vare over ti år. Tanken er at de nye løsningene kan bli kommersialisert (SINTEF, 2016, 11.11). Det er trolig ikke tilfeldig at dette kom på samme tid som regjeringen lanserte bioøkonomistrategien. På denne måten kan det virke som de ønsker å sende et tydelig signal på at oppbygging av en ny bioindustri tas på alvor.

Selv om regjeringen har lansert bioøkonomistrategien, etterspør selskapet Biokraft likevel nye politiske grep. Biokraft åpner november 2017 verdens største produksjonsanlegg for LBG, og ser på finansieringen av industrielle satsinger innenfor bioøkonomien som en hovedutfordring. Selskapet er tydelig på at en trenger en forutsigbar politikk, slik at en får rammebetingelser som motiverer til økt satsing på produksjon av miljøvennlige produkter. Uten det vil omstilling og utvikling av bioøkonomien bli vanskelig.

Hvis en omstilling av det norske samfunnet skal være innen rekkevidde, vil endringer i transportsektoren være nødvendig. Nesten all olje og gass som produseres på norsk sokkel blir eksportert. Av oljen og gassen som ikke blir eksportert, går tre fjerdedeler til transportsektoren. I 2015 var transportsektorens energibruk på 58 TWh. Foruten 4,1% fra biodiesel, biogass og strøm var resten petroleumsprodukter (SSB, 2016, 18.10). I dag har Norge et omsetningskrav hvor 7% av drivstoffet som blir solgt til veitransport skal være biodrivstoff. Imidlertid gikk Stortinget i desember 2016 inn for å øke andelen til 20% innen 2020, hvor 8 % skal være fra andre generasjon biodrivstoff (Miljødirektoratet, 2017, 23.02). På tross av dette har allerede Klima- og miljøminister Vidar Helgesen varslet at det ikke er sikkert at satsingen vil bli gjennomført, da beregninger har vist at bruk av første generasjon biodrivstoff kan føre til negative miljøkonsekvenser (Strand, Granviken, Bentzrød, & Lewis, 2017, 08.03).

Selv om det meste av CO<sub>2</sub>- utslippet fra petroleumsindustrien ikke skjer på norsk sokkel, kan en stille spørsmål om Norge har et moralsk ansvar for utslippene. At den norske regjeringen ikke viser tegn til å ville slutte "*oljeeventyret*", og har åpnet for 93 nye blokker i Barentshavet har fått mange til å reagere. Blant annet partier som SV og Miljøpartiet de Grønne, men og miljøorganisasjoner som Bellona, Natur og Ungdom og Greenpeace (Lorentzen & Framstad, 2017, 14.03). Det har ført til at Greenpeace og Natur og Ungdom har gått til søksmål mot staten for brudd på Grunnloven §112 (Greenpeace, 2016). Det er en miljølov som skal sikre at naturen

og miljøet blir tatt vare på i dag, men også i fremtiden (Grl, 2016). Miljøorganisasjonene mener staten kan være i ferd med å hindre kommende generasjoner rett til et levelig klima. Regjeringen på sin side vil ha en sterk norsk olje og gassnæring i fremtiden for å sikre arbeidsplasser og velferd for kommende generasjoner (Regjeringen, 2015, 03.06).

Istedenfor å sette petroleumsindustrien opp mot bioindustrien burde en søke samarbeid og utvikle løsninger på tvers av sektorer. Det er viktig å ikke glemme at det norske samfunnet har tjent godt med penger fra petroleumsindustrien, og stilt Norge i en god posisjon for utvikling av kunnskap og teknologi i en årrekke. Med denne kompetansen bør en trappe ned utvinningen av olje og gass, utvikle mer bærekraftige løsninger. Når Norge på 60-tallet utviklet en helt ny næringsvirksomhet med oljen, tok en lærdom fra skipsindustri og vannkraftutbygging (Hillestad, Knudsen, Dalen, & Qvenild, 2015). På samme måte burde bioindustrien ta lærdom av oljeindustrien. Mye av teknologien som brukes i dag kan med fordel anvendes i en ny industri. Like fullt vil en omstilling ta lang tid. Det er dermed nødvendig å være en del av utviklingen av fremtidens løsninger. Det er en global anerkjennelse at verdens forbruk av olje, kull og gass må reduseres. I Følge Marius Holm i Miljøstiftelsen ZERO (2013, 12.11) vil norsk økonomi være sårbar hvis den hovedsakelig baserer seg på arbeidsplasser innenfor denne sektoren. Det er derfor viktig at Norge fortsetter å utvikle industri som baserer seg på fornybare ressurser, slik at en ikke henger etter når verden kutter bruken av fossil energi.

Norge har forutsetninger for å klare å omstille samfunnet. En har kunnskap, teknologi og ressurser som trengs for å lykkes med bioøkonomien. Selv om bioenergi har stort potensiale både i Norge og verden, og blir forvaltet riktig, vil den alene ikke være løsningen på verdens klimaproblem. En trenger et fellesskap av mange løsninger. Da er forskning, og storskala prosjekter sentralt for å utvikle nye teknologier, som sammen kan være veien til et fossilfritt samfunn. Det kreves også en endring i tankegang og handling blant både forskere, økonomer, ingeniører og politikere, men først og fremst kanskje hos befolkningen. Politikerne er avhengig av velgere for å få gjennom sin politikk, og uten en befolkning som er engasjert og endringsvillig, vil politikerne neppe fremme en politikk som kan føre til flukt av velgere. For å få flere til å ønske endring, er det viktig at kunnskapen om klimaendringer og dens opphav, konsekvenser og alvorlighetsgrad blir formidlet tydelig. Klimaendringer er et globalt samfunnsproblem som en trenger kollektivt samarbeid for å stoppe. Hvis flere hadde vært klar over de alvorlige konsekvensene og hva endringene trolig vil forårsake både for naturen og mennesker, må en håpe at flere hadde etterspurt mer handling.

## 6. Konklusjon

Formålet med oppgaven var å få mer kunnskap om dyrking av mikroalger, og undersøke hvilke potensial de har i utviklingen av en bioøkonomi i Norge. Problemstillingene for oppgaven var derfor:

- I. *Hvordan er veksten til Chlorella Vulgaris ved dyrking i avløpsvann fra settefiskanlegg, ved optimal temperatur og lysintensitet?*
- II. *Hvordan påvirkes veksten til Chlorella Vulgaris ved dyrking i avløpsvann fra settefiskanlegg, ved begrenset temperatur og lysintensitet?*
- III. *Hva er potensiale for mikroalger som en ressurs i bioøkonomien i Norge?*

Ved dyrking av *C. Vulgaris* i avløpsvann fra settefiskanlegg med optimal temperatur og lysintensitet er det forutsetninger for vekst. Ved begrenset lysintensitet er forutsetningen for vekst fortsatt gjeldende, men svekket i forhold til optimale forhold. Ved begrenset temperaturforhold er forutsetningene for vekst redusert, og veksten er betydelig svekket i forhold til optimale forhold. Forsøket i oppgaven viste at mikroalgen *C. Vulgaris* er mulig å dyrke i avløpsvann fra settefiskanlegg, uten tilsetning av mer næring enn det som allerede er tilstede i vannet. Det er og forutsetninger for rensing av fosfor i avløpsvann fra settefiskanlegg.

For at mikroalger sitt potensiale som en ressurs skal lykkes i bioøkonomien i Norge, er en avhengig av flere faktorer. Et av bruksområdene som har fått mye fokus er bruken av mikroalger for å produsere biodrivstoff. En barriere for en slik produksjon fra mikroalger er å lage bærekraftige produkter. Både produksjon av ulike produkter fra mikroalger i et biorafineri, dyrking av mikroalger i avløpsvann, og CO<sub>2</sub>-rensing vil være med å styrke den økonomiske lønnsomheten. En annen viktig faktor for å lykkes i bioøkonomien, er økt satsing på nye storskala prosjekter for videre forskning. Bedrifter som jobber med utvikling av bioøkonomien etterspør en forutsigbar politikk, slik at det er mulig å starte produksjon av nye miljøvennlige produkter.

## 7. Refleksjon rundt eget arbeid

Det å stille seg kritisk til hvorvidt informasjonen oppgitt i kilder er pålitelig, er viktig ved innsamling av kunnskap. Det er en tidskrevende prosess og avgjørende for kvaliteten av oppgaven. Det har blitt brukt et stort antall kilder og vi har, i den grad det har vært mulig, prøvd å finne primærkilder. Vi har brukt fagfelleverderte kilder for å oppnå høy pålitelighet. For noen av temaene var det likevel ikke mulig, og kilder av mindre pålitelighet ble brukt. For disse kildene har vi vært spesielt kritisk, og videre undersøkt om informasjonen støttes av flere kilder. Vi har også sett på om forfatteren eller institusjonen er kjent for sin troverdighet i publiserte tekster.

Arbeidet med bacheloroppgaven har vært en lærerik og interessant prosess. Det har vært en bratt læringskurve, hvor vi sitter igjen med mye kunnskap. Da vi bestemte oss for tema, var vi klar over at dette ville innebære en stor arbeidsmengde. Dyrking av mikroalger var en spennende og fremtidsrettet oppgave, som ville kreve en god del fagkunnskap som vi ikke hadde fra før. Mye av tiden i starten av oppgaven gikk dermed med til tilegning av kunnskap om temaer som omhandlet økologi og biologi. Oppgaven innebar også temaer som vi var god kjent med fra tidligere emner på HVL, som energi og miljøpolitikk, bærekraftig utvikling og klimaendringer.

Mye tid gikk også med til utforming av en god metode for gjennomføring av forsøket. Vi ser i ettertid at det mest ideelle hadde vært å gjennomføre alle tre forsøkene samtidig for å unngå variasjoner i gjennomføring. Likevel fikk en ved forsøkene etter hverandre, muligheten til å rette opp i små feil, og forbedre utførelsen til neste forsøk. Det har gjort at metoden har blitt forbedret. Ved gjennomføring av et liknende forsøk, vil et alternativ være å anskaffe et ideelt vekstmedium til mellomdyrking av algekulturen.

## 8. Referanseliste

- Aadland, C. (2016, 18.04). Nå starter byggingen av pilotanlegg for alger. SYSLA. Hentet 14.05, 2017, fra <http://sysla.no/fisk/na-starter-byggingen-av-pilotanlegg-for-alger/>
- Alaswad, A., Dassisti, M., Prescott, T., & Olabi, A. G. (2015). Technologies and developments of third generation biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 51, 1446.
- Alfsen, K. H., Hessen, D. O., & Jansen, E. (2013). *Klimaendringer i Norge*: Universitetsforlaget.
- AlgaePARC. (2017, 10.05). Our research. Hentet 10.05, 2017, fra <http://www.algaeparc.com/our-research>
- Bellona. (2017, 10.05). OCEAN FOREST. Hentet 20.05, 2017, fra <http://bellona.no/prosjekter/ocean-forest>
- Biokraft. (2016). BOKRAFT AS - Årsrapport 2016 Hentet fra [http://biokraft.no/wp-content/uploads/2017/05/Biokraft\\_2016\\_lavoppl.pdf](http://biokraft.no/wp-content/uploads/2017/05/Biokraft_2016_lavoppl.pdf)
- Borregaard. (2017). Verdens ledende bioraffineri. Hentet 11.05, 2017, fra <http://www.borregaard.no/Miljoe-og-samfunn/Det-groenne-rommet/Verdens-ledende-bioraffineri>
- Boyle, G. (2012). *Renawable Energy*: Oxford University Press.
- Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 557-577. doi: 10.1016/j.rser.2009.10.009
- Brundtland, G. H., & Dahl, O. (1987). *Vår felles framtid*. Oslo: Tiden norsk forlag.
- Cherubini, F. (2010). The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*, 51(7), 1412-1421. doi: 10.1016/j.enconman.2010.01.015
- Chew, K. W., Yap, J. Y., Show, P. L., Suan, N. H., Juan, J. C., Ling, T. C., . . . Chang, J.-S. (2017). Microalgae biorefinery: High value products perspectives. *Bioresource Technology*, 229, 53-62. doi: 10.1016/j.biortech.2017.01.006
- Converti, A., Casazza, A. A., Ortiz, E. Y., Perego, P., & Del Borghi, M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering & Processing: Process Intensification*, 48(6), 1146-1151. doi: 10.1016/j.cep.2009.03.006
- Cordell, D., Rosemarin, A., Schröder, J. J., & Smit, A. L. (2011). Towards global phosphorus security: A systems framework for phosphorus recovery and reuse options. *Chemosphere*, 84(6), 747-758. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.02.032
- Dalrymple, O. K., Halfhide, T., Udom, I., Gilles, B., Wolan, J., Zhang, Q., & Ergas, S. (2013). Wastewater use in algae production for generation of renewable resources: a review and preliminary results. *Aquatic Biosystems*, 9, 2-2. doi: 10.1186/2046-9063-9-2
- Dannevig, P., & Harstveit, K. E. (2017). Klima. Hentet 12.02, 2017, fra <https://snl.no/klima>
- Ebrahimian, A., Kariminia, H.-R., & Vosoughi, M. (2014). Lipid production in mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* in a mixture of primary and secondary municipal wastewater. *Renewable Energy*, 71, 502-508. doi: 10.1016/j.renene.2014.05.031
- EU. (2009). *DIRECTIVE 2009/28/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL*



- of 23 April 2009. Hentet fra <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ%3AL%3A2009%3A140%3A0016%3A0062%3AEN%3APDF>.
- Eurostat. (2017). Share of energy from renewable sources in gross final consumption of energy, 2004-2015 %. T1 Newpng.png. Hentet 13.03, 2017, fra [http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/File:Share\\_of\\_energy\\_from\\_renewable\\_sources\\_in\\_gross\\_final\\_consumption\\_of\\_energy\\_2004-2015\\_%25\\_T1\\_Newpng.png](http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/File:Share_of_energy_from_renewable_sources_in_gross_final_consumption_of_energy_2004-2015_%25_T1_Newpng.png)
- Eurostat. (2017, 15.03). Energy from renewable sources. Hentet 12.05, 2017, fra [http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Energy\\_from\\_renewable\\_sources#Further Eurostat information](http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Energy_from_renewable_sources#Further_Eurostat_information)
- Feng, Y., Li, C., & Zhang, D. (2011). Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. *Lipid production of Chlorella vulgaris cultured in artificial wastewater medium*, 102(1), 101-105.
- Fevolden, A. M., & Klitkou, A. (2016). A fuel too far? Technology, innovation, and transition in failed biofuel development in Norway.
- FN-Sambandet. (2016, 04.04). Hva er bærekraftig utvikling. Hentet 22.02, 2017, fra <http://www.fn.no/Tema/Baerekraftig-utvikling/Hva-er-baerekraftig-utvikling>
- FN-sambandet. (2016a). Stoppe klimaendringene. Hentet 22.02, 2017, fra <http://www.fn.no/Tema/FNs-baerekraftsmaal/Stoppe-klimaendringene>
- FN-Sambandet. (2016b). Ren energi for alle. Hentet 22.02, 2017, fra <http://www.fn.no/Tema/FNs-baerekraftsmaal/Ren-energi-for-alle>
- FN-Sambandet. (2016c). Bærekraftige byer og samfunn. Hentet 22.02, 2017, fra <http://www.fn.no/Tema/FNs-baerekraftsmaal/Baerekraftige-byer-og-samfunn>
- Greenpeace. (2016). Arktis smelter. Hentet 23.05, 2017, fra <http://www.greenpeace.org/norway/no/kampanjer/Arktis/>
- Grl. (2016). *Kongeriket Norges Grunnlov*. Hentet fra [https://lovdata.no/dokument/NL/lov/1814-05-17/KAPITTEL\\_5#KAPITTEL\\_5](https://lovdata.no/dokument/NL/lov/1814-05-17/KAPITTEL_5#KAPITTEL_5).
- Guerrero-Cabrera, L., Rueda, J. A., García-Lozano, H., & Navarro, A. K. (2014). Cultivation of *Monoraphidium* sp., *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. algae in Batch culture using Nile tilapia effluent. *Bioresource Technology*, 161, 455-460. doi: 10.1016/j.biortech.2014.03.127
- Guiry, M. D. (2012). HOW MANY SPECIES OF ALGAE ARE THERE? *Journal of Phycology*, 48(5), 1057-1063. doi: 10.1111/j.1529-8817.2012.01222.x
- Harstveit, K. E. (2009, 14.02). klimanormal. Hentet 12.02, 2017, fra <https://snl.no/klima>
- Hillestad, M. E., Knudsen, J. K., Dalen, K., & Qvenild, M. (2015). Oljen som inspirasjon for bioøkonomien
- Prosjekt Fossilfritt landbruk innen 2030. Hva kan vi AgriAnalyse & SINTEF (Eds.), Hentet fra <http://www.agrianalyse.no/file=3559>
- Ho, S.-H., Huang, S.-W., Chen, C.-Y., Hasunuma, T., Kondo, A., & Chang, J.-S. (2012). Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E. *Bioresource Technology*. doi: 10.1016/j.biortech.2012.10.100
- IEA. (2016). Key world energy statistics Hentet fra [https://drive.google.com/drive/folders/OB18H6VMb\\_RsqMEZjbEhhMEhJOVU](https://drive.google.com/drive/folders/OB18H6VMb_RsqMEZjbEhhMEhJOVU)



- Norsk Polarinstitut. (2014, 04.03). Klima og klimaendringer. Hentet 20.02, 2017, fra <http://www.npolar.no/no/tema/klima/>
- Norway INDC. (2015, 24.03 ). *Submission by Norway to the ADP Norway's Intended Nationally Determined Contribution*. UNFCCC Hentet fra <http://www4.unfccc.int/submissions/INDC/Published%20Documents/Norway/1/Norway%20INDC%2026MAR2015.pdf>.
- Nærings- og fiskeridepartementet. (2016). Kjente ressurser – uante muligheter *Regjeringens bioøkonomistrategi* Hentet fra [https://www.regjeringen.no/contentassets/32160cf211df4d3c8f3ab794f885d5be/nfd\\_bioekonomi\\_strategi\\_uu.pdf](https://www.regjeringen.no/contentassets/32160cf211df4d3c8f3ab794f885d5be/nfd_bioekonomi_strategi_uu.pdf)
- Osland Settefisk. (2016, 10.06). Osland settefisk. Hentet 09.02, 2017, fra <http://osland.no/osland-settefisk/>
- Patel, C. K. (1992). Industrial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(3), 798. doi: 10.1073/pnas.89.3.798
- Patil, V., Tran, K.-Q., & Giselrød, H. R. (2008). Towards Sustainable Production of Biofuels from Microalgae. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(7), 1188-1195. doi: 10.3390/ijms9071188
- Regjeringen. (2015, 03.06). Norges viktigste næring. *Olje- og energidepartementet*. Hentet 23.05, 2017, fra <https://www.regjeringen.no/no/tema/energi/olje-og-gass/verdiskaping/id2001331/>
- Regjeringen. (2016, 29.12a). Kyotoprotokollen. Hentet 05.05, 2017, fra <https://www.regjeringen.no/no/tema/klima-og-miljo/klima/internasjonale-klimaforhandlinger/innsiktsartikler-klimaforhandlinger/kyotoprotokollen/id2453693/>
- Regjeringen. (2016, 29.12b). Parisavtalen – en ny global klimaavtale. Hentet 05.05, 2017, fra <https://www.regjeringen.no/no/tema/klima-og-miljo/klima/internasjonale-klimaforhandlinger/innsiktsartikler-klimaforhandlinger/forhandlingene-om-ny-klimaavtale-i-paris/id2457656/>
- Richlefs, R. E., & Freeman, W. F. (1990). *Ecology (3rd edition)*.
- Scragg, A. H., Illman, A. M., Carden, A., & Shales, S. W. (2002). Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor. *Biomass and Bioenergy*, 23(1), 67-73. doi: 10.1016/S0961-9534(02)00028-4
- Seaweed from Norway. (2017, 30.05). Seaweed from Norway. Hentet 30.05, 2017, fra <http://www.seaweedfromnorway.no/seaweed-from-norway/>
- Selvik, J. R., & Høgåsen, T. (2016). Kildefordelte tilførsler av nitrogen og fosfor til norske kystområder i 2015 - tabell, figur og kart *NIVA Rapport L.NR. 7106-2017* Hentet fra <http://www.miljodirektoratet.no/Documents/publikasjoner/M662/M662.pdf>
- Serra-Maia, R., Bernard, O., Gonçalves, A., Bensalem, S., & Lopes, F. (2016). Influence of temperature on *Chlorella vulgaris* growth and mortality rates in a photobioreactor. *Algal Research*, 18, 352-359. doi: 10.1016/j.algal.2016.06.016
- Sheehen, J., Dunahay, T., Benemann, J., & Roessler, P. (1998). A Look Back at the U.S Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae *NREL/TP-580-24190* Hentet fra <http://www.nrel.gov/docs/legosti/fy98/24190.pdf>
- Silva, T. L. d., & Reis, A. (2015). Scale-up Problems for the Large Scale Production of Algae. In D. das (Red.), *Algae Biorefinery: An Integrated Approach* (Reprint Edition). Hentet [https://www.researchgate.net/publication/294285318\\_Scale-up\\_Problems\\_for\\_the\\_Large\\_Scale\\_Production\\_of\\_Algae](https://www.researchgate.net/publication/294285318_Scale-up_Problems_for_the_Large_Scale_Production_of_Algae). doi: 10.1007/978-3-319-22813-6\_6

- Singh, S. P., & Singh, P. (2015). Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 50, 431.
- SINTEF. (2013, 13.02). Mikroalger- En allsidig ressurs. Hentet 14.05, 2017, fra <http://www.sintef.no/siste-nytt/mikroalger-en-allsidig-ressurs/>
- SINTEF. (2015, 28.01). Marine mikroalger - Tiden er inne for å utnytte flere biomarine ressurser, og bygge næringer som kan gi verdiskaping i mange år fremover. Hentet 01.05, 2017, fra <http://www.sintef.no/fiskeri-og-havbruk-as/fisk-blogg/poster/marine-mikroalger/>
- SINTEF. (2016, 11.11). Alger og plankton – den nye oljen? Hentet 06.05, 2017, fra <http://www.sintef.no/siste-nytt/alger-og-plankton-den-nye-oljen/>
- SINTEF. (2017, 02.05). Her dyrkes nyttige alger i avløpsvann - Fôr til oppdrettsfisk kan bli mangelvare om noen år. Forskere tror løsningen kan finnes i et avfallsprodukt. Hentet 13.05, 2017, fra <http://www.sintef.no/fiskeri-og-havbruk-as/fisk-blogg/poster/marine-mikroalger/>
- Sjøtun, A. K., Christie, H., Dalen, T., Skjoldal, H. R., Husa, V., & Olsen, Y. (2011). Vurdering av eutrofieringssituasjonen i kystområder, med særlig fokus på Hardangerfjorden og Boknafjorden E. o. a. F.-o. k. i. s. med & Miljøverndepartementet (Eds.), Hentet fra <http://www.imr.no/filarkiv/2011/12/eutrofirapporten.pdf/nb-no>
- Sonnenberg, A., Baars, J., & Hendrickx, P. (2009). *IEA Bioenergy Task 42 Biorefinery*. Hentet fra [http://www.iea-bioenergy.task42-biorefineries.com/upload\\_mm/5/8/2/a47bd297-2ace-44d0-92bb-cb7cc02f75de\\_Brochure\\_Totaal\\_definitief\\_webs.pdf](http://www.iea-bioenergy.task42-biorefineries.com/upload_mm/5/8/2/a47bd297-2ace-44d0-92bb-cb7cc02f75de_Brochure_Totaal_definitief_webs.pdf)
- Spencer, C. P. (1957). Utilization of Trace Elements by Marine Unicellular Algae. 282-285.
- SSB. (2016, 18.10). Produksjon og forbruk av energi, energibalanse, 2014-2015, endelige tall. Hentet 10.02, 2017, fra <https://www.ssb.no/energi-og-industri/statistikker/energibalanse>
- Steen, H. (2009). Kyst og havbruk 2009: 2.11 Stortare.: Havforskningsinstituttet.
- Strand, T., Granviken, S., Bentzrød, S. B., & Lewis, H. Ø. (2017, 08.03). Åpner for å skrote vedtaket om biodrivstoff, *Aftenposten*, s. 6-8. Hentet fra [https://drive.google.com/drive/folders/OB18H6VMb\\_RsgeVJFYW55NGdEMWM](https://drive.google.com/drive/folders/OB18H6VMb_RsgeVJFYW55NGdEMWM)
- Svåsand, T., Grefsrud, E. S., Karlsen, Ø., Kvamme, B. O., Glover, K. S., Husa, V., & Kistiansen, S. T. (2017). Rissikorapport norsk fiskeoppdrett 2017. *Fisken og havet Særnr. 2-2017* Hentet fra [https://www.imr.no/filarkiv/2017/05/risikorapport\\_2017.pdf/nn-no](https://www.imr.no/filarkiv/2017/05/risikorapport_2017.pdf/nn-no)
- Svåsand, T., Karlsen, Ø., Kvamme, B. O., Stien, L. H., Taranger, G. L., Boxaspen, K. K., & (red). (2016). Risikovurdering av norsk fiskeoppdrett 2016 Havforskningsinstituttet (Ed.) *Fisken og havet, særnr. 2-2016* Hentet fra [https://www.imr.no/filarkiv/2016/04/risikovurdering\\_2016.pdf/nn-no](https://www.imr.no/filarkiv/2016/04/risikovurdering_2016.pdf/nn-no)
- United nation. (2015). Parice agreement.
- Wang, B., Li, Y., Wu, N., & Lan, C. (2008). CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(5), 707-718. doi: 10.1007/s00253-008-1518-y
- Yeh, K.-L., & Chang, J.-S. (2011). Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Bioresource Technology*. doi: 10.1016/j.biortech.2011.11.103

## 9. Vedlegg

### Vedlegg 1: Temperaturjustering med SmartCella styringsentral (Dagtemperatur)

Fremgangsmåte for å justere dagtemperatur til ønsket verdi:

1. Ved å holde inne *SET- knappen* i et par sekunder får man opp hva dagtemperaturen er innstilt på.
2. Ved så å trykke på *PA- knappen* kan en justere temperaturen opp, og ved *AUX-knappen* justerer en temperaturen ned.
3. Trykk på *SET-knappen* når en har funnet ønsket temperatur.

### Vedlegg 2: Temperaturjustering med RIVA COLD styringsentral (Natt-temperatur)

Fremgangsmåte for å justere natt-temperatur til ønsket verdi:

1. Først dobbeltrykk på *SET- knappen* for å få oppgitt den innstilte temperaturen.
2. Trykk så på *opp- knappen* (bildet av snøkrystall) og *ned- knappen* (lyspære) for å justere temperaturen opp eller ned.
3. Trykk på *SET-knappen* når en har funnet ønsket temperaturinnstilling.

## Vedlegg 3: Døgn- og ukessyklus justering med MICROTIME

Fremgangsmåte for å justere døgnsykulusen og ukessyklusen til ønsket verdi:

1. Kontroller først at innstillingene på displayet viser klokkeslett og dato
2. Trykk så på "M", en vil da få frem "program" i displayet
3. Trykk "OK" og "New Program" vil vises i displayet
4. Trykk "OK" og "CH A" vil vises i displayet
5. Trykk "OK" og "Night off" vil vise i displayet.
6. Trykk "OK".

For å gjennomføre innstillinger for hver dag i uken:

7. Trykk "OK" syv ganger, displayet skal da vise et klokkeslett.
8. En kan da videre stille inn når på døgnet lyset skal slå seg av og på. Bruk «+» og «-» tastene for denne innstillingen.
9. Trykk "OK" og gjør den samme prosedyren for å stille inn minuttene.
10. Trykk "OK". Lysene er da innstilt til det klokkeslettet det skal slå seg av. Displayet viste "Night Switch".
11. Trykk "OK", "Night On" viste i displayet.
12. For å stille inn når lysene skulle slå seg på igjen, følg samme prosedyre som for punkt 6- 10.
13. Trykk så på "M" til det samme displayet som en startet med viste.

## Vedlegg 4: Beregning av mengde vekstmedium til forsøkene

Vedleggstabell 1: Viser beregning av mengde vekstmedium til hvert forsøk. Mengden svinn og fordamping av vekstmediet under fordeling, og autoklaving ble beregnet for å unngå at for lite/mye vekstmedium ble tatt opp til tining. (F=Flaske)

| Beregning av mengde vekstmedium til tining     | Forsøk 1                                       | Forsøk 2                                      | Forsøk 3  |
|--|--|---|---|
| Beregnet mengde til forsøket                   | 5 L  | 5 L   | 5 L   |
| Beregnet mengde til SognLab                    | 0,2 L  | 0 L   | 0 L   |
| Beregnet mengde til svinn                      | 0,25 L   | 0,051 L                                       | 0,5 L   |
| Beregnet mengde til fordamping                 | 0,25 L   | 0,052 L                                       | 0,5 L   |
| Antall flasker (Hver flaske besto av ca 0,9 l) | = 5,7 L / 0,9 L per/F $\approx$ 6,3<br>Flasker | 5,13 L / 0,9 L per/F $\approx$ 5,7<br>Flasker | 6 L / 0,9 L per /F $\approx$ 6,7<br>Flasker<br>$\approx$ 7<br>Flasker |
| Vurdering                                      | Marginal mengde vann                           | For lite vann                                 | Ideell mengde vann  |

## Vedlegg 5: *Egluena gracilis* Medium og *Jaworski's* medium

## EG:JM

### Medium

1:1 mixture

See separate recipes. Mix then autoclave at 15 psi for 15 minutes.

## EG (Euglena gracilis Medium)

Freshwater algae and protozoa

| Stock  | per litre |
|--|-----------|
| (1) CaCl <sub>2</sub> stock solution:<br>CaCl <sub>2</sub> | 1.0 g     |

| Medium                               | per litre |
|--------------------------------------|-----------|
| Sodium acetate trihydrate            | 1.0 g     |
| "Lab-Lemco" powder (Oxoid L29) *     | 1.0 g     |
| Tryptone (Oxoid L42) *               | 2.0 g     |
| Yeast extract (Oxoid L21)*           | 2.0 g     |
| CaCl <sub>2</sub> stock solution (1) | 10.0 ml   |

Add constituents above and make up to 1 litre with deionized water. For agar add 15 g per litre Bacteriological Agar (Oxoid L11)\*. Autoclave at 15 psi for 15 minutes.

### Supply

\* Unipath Ltd, Wade Road, Basingstoke, Hants RG24 0PW, UK





## JM (Jaworski's Medium)

Freshwater algae

| <b>Stocks</b>   | <b>per 200 ml</b> |
|---|-------------------|
| (1) $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$            | 4.0 g             |
| (2) $\text{KH}_2\text{PO}_4$  | 2.48 g            |
| (3) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$                       | 10.0 g            |
| (4) $\text{NaHCO}_3$  | 3.18 g            |
| (5) EDTAFeNa  | 0.45 g            |
| EDTANa <sub>2</sub>   | 0.45 g            |
| (6) $\text{H}_3\text{BO}_3$   | 0.496 g           |
| $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$                           | 0.278 g           |
| $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 0.20 g            |
| (7) Cyanocobalamin  | 0.008 g           |
| Thiamine HCl  | 0.008 g           |
| Biotin  | 0.008 g           |
| (8) $\text{NaNO}_3$   | 16.0 g            |
| (9) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$            | 7.2 g             |

| <b>Medium</b>         | <b>per litre</b> |
|-----------------------|------------------|
| Stock solutions 1 - 9 | 1 ml each        |

Make up to 1 litre with deionized water. For agar, add 15.0 g per litre of Bacteriological Agar (Oxoid L11)\*. Autoclave at 15 psi for 15 minutes.

### Supply

\* Unipath Ltd, Wade Road, Basingstoke, Hants, RG24 0PW, UK

## Vedlegg 6: Rådata for turbiditet

Vedleggstabell 2: Viser målingene gjort for turbiditet i forsøk 1, 2 og 3. De faktiske målingene for tre prøver er presentert, og et gjennomsnitt som videre er brukt i resultater. Feltet som er merket med gul, viser verdiene for høstet algemasse fra flaskene som ble autoklavert to ganger.

| Dag | Flaske | Forsøk 1                              |              | Forsøk 2        |     | Forsøk 3        |     |
|-----|--------|---------------------------------------|--------------|-----------------|-----|-----------------|-----|
|     |        | Faktiske målte verdier for tre prøver | Gjennomsnitt |                 |     |                 |     |
| 0   |        | 1,06                                  | 1,06         |                 | 0,9 |                 |     |
| 1   |        |                                       |              |                 |     |                 |     |
| 2   |        |                                       |              |                 |     |                 |     |
| 3   | 1      | 5,6                                   | 5,6          | 0,9 – 1,2 – 0,6 | 1,9 | 0,9 – 2,2 – 1,2 | 1,4 |
| 4   | 2      | 10,4                                  | 10,4         | 1,8 – 2 – 1,8   | 2,4 |                 |     |
| 5   | 3      | 7,4 – 7,4 – 7,3                       | 7,4          | 4,4 – 4,3 – 3,9 | 4,2 | 1 – 0,9 – 0,8   | 0,9 |
| 6   | 4      | 11,7 – 11,5 – 11,7                    | 11,6         | 2,7 – 2,9 – 3   | 2,9 |                 |     |
| 7   | 5      | 9,9 – 9,9 – 10                        | 9,9          | 4,4 – 4,2 – 3,9 | 4,2 | 2,5 – 3,6 – 3,4 | 3,2 |
| 8   | 6      | 7,6 – 7,5 – 7,6                       | 7,6          | 7,1 – 6,7 – 7,6 | 7,1 |                 |     |
| 9   | 7      | 9,3 – 9,2 – 9,3                       | 9,3          | 5,4 – 6,1 – 6,5 | 6,1 | 1,3 – 1 – 1     | 1,1 |
| 10  | 8      | 10,3 – 10,4 – 10,4                    | 10,4         | 3,2 – 2,8 – 2,1 | 2,7 | 4,1 – 3,7 – 3,4 | 3,7 |
| 11  | 9      | 10 – 10,3 – 10,2                      | 10,2         | 9 – 9,9 – 8,2   | 9,0 | 6,2 – 6,6 – 6,4 | 6,4 |
| 12  | 10     | 13,8 – 13,9 – 13,9                    | 13,9         | 7,8 – 6,2 – 7,2 | 7,1 |                 | 3,4 |

## Vedlegg 7: Rådata for høstet algemasse

Vedleggstabell 3: Presenterer hvor mye algemasse som ble høstet, og høstet algemasse per 100 g vekstmediet i forsøk 1, 2 og 3. Denne verdien er videre brukt som grunnlag for resultatene som er presentert i oppgaven. For å komme frem til vekten for høstet algemasse ble «filtervekt» trukket fra «filtervekt med alge». Det ble også notert hvor mange gram vekstmedium som ble filtrert gjennom filteret. Feltet som er merket med gul viser verdiene for høstet algemasse fra flaskene som ble autoklavert to ganger.

| Forsøk   | Dag | Flaske | Filtervekt | Vekstmedium i gram filtrert gjennom filter | Filtervekt med alge | Høstet algemasse i gram | Høstet algemasse per 100g mediet |
|----------|-----|--------|------------|--|---------------------|-------------------------|----------------------------------|
| Forsøk 1 | 0   |        |            |  |                     |                         |                                  |
|          | 1   |        |            |  |                     |                         |                                  |
|          | 2   |        |            |  |                     |                         |                                  |
|          | 3   | 1      | 0,1798     | 550  | 0,1896              | 0,0098                  | 0,0018                           |
|          | 4   | 2      | 0,2681     | 559  | 0,2817              | 0,0136                  | 0,0024                           |
|          | 5   | 3      | 0,0882     | 200  | 0,0942              | 0,0060                  | 0,0030                           |
|          | 6   | 4      | 0,0882     | 200  | 0,0978              | 0,0096                  | 0,0048                           |
|          | 7   | 5      | 0,1759     | 200  | 0,1839              | 0,0080                  | 0,0040                           |
|          | 8   | 6      | 0,1769     | 200  | 0,1827              | 0,0058                  | 0,0029                           |
|          | 9   | 7      | 0,0873     | 200  | 0,0945              | 0,0072                  | 0,0036                           |
|          | 10  | 8      | 0,0892     | 200  | 0,0965              | 0,0073                  | 0,0037                           |
|          | 11  | 9      | 0,0892     | 200  | 0,0986              | 0,0094                  | 0,0047                           |
|          | 12  | 10     | 0,0875     | 200  | 0,0979              | 0,0104                  | 0,0052                           |
| Forsøk 2 | 0   |        |            |  |                     |                         |                                  |
|          | 1   |        |            |  |                     |                         |                                  |
|          | 2   |        |            |  |                     |                         |                                  |
|          | 3   | 1      | 0,0891     | 200  | 0,0905              | 0,0014                  | 0,0007                           |
|          | 4   | 2      | 0,0894     | 200  | 0,0912              | 0,0018                  | 0,0009                           |
|          | 5   | 3      | 0,0894     | 200  | 0,0929              | 0,0035                  | 0,0018                           |
|          | 6   | 4      | 0,0884     | 200  | 0,0909              | 0,0025                  | 0,0012                           |

|                 |    |    |        |     |        |        |        |
|-----------------|----|----|--------|-----|--------|--------|--------|
|                 | 7  | 5  | 0,0895 | 200 | 0,0932 | 0,0037 | 0,0019 |
|                 | 8  | 6  | 0,0890 | 200 | 0,0937 | 0,0047 | 0,0024 |
|                 | 9  | 7  | 0,0884 | 200 | 0,0934 | 0,0050 | 0,0025 |
|                 | 10 | 8  | 0,0901 | 200 | 0,0922 | 0,0021 | 0,0011 |
|                 | 11 | 9  | 0,0884 | 200 | 0,0953 | 0,0069 | 0,0034 |
|                 | 12 | 10 | 0,0885 | 200 | 0,0943 | 0,0058 | 0,0029 |
| <b>Forsøk 3</b> | 0  |    |        |     |        |        |        |
|                 | 1  |    |        |     |        |        |        |
|                 | 2  |    |        |     |        |        |        |
|                 | 3  | 1  | 0,0899 | 200 | 0,0912 | 0,0013 | 0,0007 |
|                 | 4  |    |        |     |        |        |        |
|                 | 5  | 2  | 0,0887 | 200 | 0,0895 | 0,0008 | 0,0004 |
|                 | 6  |    |        |     |        |        |        |
|                 | 7  | 3  | 0,0890 | 200 | 0,0918 | 0,0028 | 0,0014 |
|                 | 8  |    |        |     |        |        |        |
|                 | 9  | 4  | 0,0900 | 200 | 0,0918 | 0,0018 | 0,0009 |
|                 | 10 | 5  | 0,0879 | 200 | 0,0933 | 0,0054 | 0,0027 |
|                 | 11 | 6  | 0,0901 | 200 | 0,0951 | 0,0050 | 0,0025 |
|                 | 12 | 7  | 0,0887 | 200 | 0,0914 | 0,0027 | 0,0014 |

## Vedlegg 8: Rådata for nitrogenmålinger

Vedleggstabell 4: Viser konsentrasjonen i nitrogen oppgitt i ppm. Utblandingsforholdet som ble brukt for å gjennomføre målingene er også presentert. Det er oppgitt hvilke målinger som er gjennomført med Red Sea Algae Control PRO Test Kit (Red Sea Kit) og hvilke målinger som ble gjort av SognLab. Dag 0 viser målinger som ble gjennomført før algene ble tilført i vekstmediet. Feltet som er merket med gul, viser verdiene for høstet algemasse fra flaskene som ble autoklavert to ganger.

|   | Dag | Flaske   | Forsøk 1   |                                 | Forsøk 2   |                                 | Forsøk 3   |                                 |
|---|-----|----------|--|---------------------------------|--|---------------------------------|--|---------------------------------|
|   |     |          | Utblandingsforhold (filtrert vekstmedium: destillert vann) | Konsentrasjon av nitrogen (ppm) | Utblandingsforhold (filtrert vekstmedium: destillert vann) | Konsentrasjon av nitrogen (ppm) | Utblandingsforhold (filtrert vekstmedium: destillert vann) | Konsentrasjon av nitrogen (ppm) |
| SognLab   | 0   |          |  | 25                              |  |                                 |  |                                 |
| R<br>E<br>D<br><br>S<br>E<br>A<br><br>K<br>I<br>T | 0   |          |  |                                 | 0,5:15,5   | 4                               |  |                                 |
|   | 1   |          |  |                                 |  |                                 |  |                                 |
|   | 2   |          |  |                                 |  |                                 |  |                                 |
|   | 3   | 1        | 1:15   | 64                              | 0,5:15,5   | 4                               | 0,2:15,8   | 1                               |
|   | 4   | 2        | 1:15   | 64                              | 0,2:15,8   | 1                               |  |                                 |
|   | 5   | 3        | 1:15   | 64                              | 0,2:15,8   | 1                               | 0,2:15,8   | 1,5                             |
|   | 6   | 4        | 1:15   | 64                              | 0,2:15,8   | 1,5                             |  |                                 |
|   | 7   | 5        | 1:15   | 64                              | 0,2:15,8   | 1,5                             | 0,2:15,8   | 1,5                             |
|   | 8   | 6        | 1:15   | 64                              | 0,2:15,8   | 1,5                             |  |                                 |
|   | 9   | 7        | 0,5:15,5   | 128                             | 0,2:15,8   | 1,2                             | 0,2:15,8   | 1,5                             |
|   | 10  | 8        | 0,5:15,5   | 128                             | 0,2:15,8   | 1,2                             | 0,2:15,8   | 1,5                             |
|   | 11  | 9        | 0,5:15,5   | 128                             | 0,2:15,8   | 1,3                             | 0,2:15,8   | 1,5                             |
| 12  | 10  | 0,5:15,5 | 128  | 0,2:15,8                        | 1,3  | 0,2:15,8                        | 1,5  |                                 |

## Vedlegg 9: Rådata for fosformålinger

Vedleggstabell 5: Viser konsentrasjonen i fosfor oppgitt i ppm. Utblandingsforholdet som ble brukt for å gjennomføre målingene er også presentert. Det er oppgitt hvilken målinger som er gjennomført med Red Sea Algae Control PRO Test Kit (Red Sea Kit) og hvilken målinger som ble gjort av SognLab. Dag 0 viser målinger som ble gjennomført før algene ble tilført i vekstmediet. Feltet som er merket med gul, viser verdiene for høstet algemasse fra flaskene som ble autoklavert to ganger.

|   | Dag | Flaske | Forsøk 1   |                               | Forsøk 2   |                               | Forsøk 3   |                               |
|---|-----|--------|--|-------------------------------|--|-------------------------------|--|-------------------------------|
|   |     |        | Utblandingsforhold (filtrert vekstmedium: destillert vann) | Konsentrasjon av fosfor (ppm) | Utblandingsforhold (filtrert vekstmedium: destillert vann) | Konsentrasjon av fosfor (ppm) | Utblandingsforhold (filtrert vekstmedium: destillert vann) | Konsentrasjon av fosfor (ppm) |
| SognLab   |     |        |  | 0,53                          |  |                               |  |                               |
| R<br>E<br>D<br><br>S<br>E<br>A<br><br>K<br>I<br>T | 0   |        |  |                               |  | 0,46                          |  |                               |
|   | 1   |        |  |                               |  |                               |  |                               |
|   | 2   |        |  |                               |  |                               |  |                               |
|   | 3   | 1      | 2:15   | 2,04                          | 1:16   | 3,84                          | 1:16   | 5,76                          |
|   | 4   | 2      | 2:15   | 1,36                          | 1:16   | 4,48                          |  |                               |
|   | 5   | 3      | 2:15   | 1,02                          | 1:16   | 3,84                          | 1:16   | 5,76                          |
|   | 6   | 4      | 2:15   | 0,51                          | 1:16   | 2,56                          |  |                               |
|   | 7   | 5      | 2:15   | 0,68                          | 1:16   | 3,2                           | 1:16   | 4,80                          |
|   | 8   | 6      | 17:0   | 0,5                           | 1:16   | 3,2                           |  |                               |
|   | 9   | 7      | 17:0   | 0,45                          | 1:16   | 4,16                          | 1:16   | 3,84                          |
|   | 10  | 8      | 17:0   | 0,5                           | 1:16   | 3,04                          | 1:16   | 3,84                          |
|   | 11  | 9      | 17:0   | 0,4                           | 1:16   | 2,56                          | 1:16   | 4,8                           |
|   | 12  | 10     | 17:0   | 0,36                          | 1:16   | 2,56                          | 1:16   | 4,8                           |

## Vedlegg 10: Stort format av figurer som viser turbiditet, høstet algemasse og fosfor konsentrasjon

