

Mikrolevien kasvattaminen kalankasvattamon jätevesissä

LAHDEN
AMMATTIKORKEAKOULU
Tekniikan ala
Ympäristötekniikka
Ympäristönsuojelutekniikka
Opinnäytetyö
Kevät 2018
Reetta Eskola

Lahden ammattikorkeakoulu
Ympäristötekniologia

ESKOLA, REETTA:

Mikrolevien kasvattaminen kalankasvattamon jätevesissä

Ympäristönsuojelutekniikan opinnäytetyö, 38 sivua, 2 liitesivua

Kevät 2018

TIIVISTELMÄ

Ympäristön pilaantuminen on noussut yhdeksi tämän päivän pääpuheenaiheeksi. On alettu miettimään, kuinka voitaisiin elää ympäristöä kunnioittavasti, ilman että nykyajan mukavuuksista tarvitsisi luopua. Esimerkiksi jäteveden puhdistusmenetelmiä on kehitetty entisestään. Mikrolevät ovat mikroskooppisen pieniä kasviplanktonleviä, joita pystytään hyödyntämään monipuolisesti, esimerkiksi jäteveden puhdistuksessa ja ravitsemuksessa. Ne sisältävät tarvitsemiamme monityydyttymättömiä rasvahappoja.

Tässä opinnäytetyössä tutkittiin *Selenastrum sp.*- ja *Euglena gracilis* -mikrolevien kasvua kiertovesitekniikalla toimivan kalankasvattamon jätevesissä sekä ravinteiden poistumista jätevedestä leväkasvatuksen aikana. Kokeen aikana käytettiin neljää erilaista kasvatusalustaa: kissakalan kasvatusaltaan vettä, kissakalan lietteellä rikastettua kissakalan kasvatusaltaan vettä, kuhan kasvatusaltaan vettä sekä kuhan lietteellä rikastettua kuhan kasvatusaltaan vettä. Kasvatukset olivat sekaviljelmiä.

Kokeen aikana kasvatuksista otettiin näytteitä, joista tehtiin kuivapaino- ja ravinneanalyysit. Ravinneäytteistä mitattiin kokonaistyyppi-, kokonaisfosfori-, ammoniumtyppi- ja ortofosfaattipitoisuudet sekä kemiallinen hapenkulutus. Lisäksi tutkittiin, olisiko kuivapainoanalyysit mahdollista korvata optisen tiheyden mittauksilla.

Kuivapainoanalyysien tulokset osoittavat, että levien kasvu oli tehokkainta kasvatuksissa, joissa oli käytetty kuhan kasvatusaltaan vettä ja jotka oli rikastettu puhdistusprosessista saadulla kuhan lietteellä. Lisäksi optisen tiheyden mittausten tulokset osoittivat, että menetelmää voidaan hyödyntää kasvuvaiheen seurannassa jatkossakin. Ravinteista kokonaistyyppiä kului kasvatusten aikana kaikista eniten, ja sen poistotehokkuus kaikkien kasvatusten kesken oli 23,5-34,2 mg/l.

Kokeen tulosten perusteella kalankasvatuslaitos voisi hyödyntää mikroleviä syntyvien jätevesien puhdistuksessa. Menetelmää kannattaa tutkia lisää, mm. arvioida prosessin taloudellista kannattavuutta.

Asiasanat: *Selenastrum sp.*, *Euglena gracilis*, jäteveden puhdistus, kuivapaino, ravinneanalyysit, kalankasvattamo

Lahti University of Applied Sciences
Degree Programme in Environmental Technology

ESKOLA, REETTA:

Growth of microalgae in the
wastewater of a fish farm

Bachelor's Thesis in Environmental Engineering 38 pages, 2 pages
of appendices

Spring 2018

ABSTRACT

Environmental degradation is one of the biggest concerns nowadays. Therefore, people have started to think how we can live like before and respect the nature at the same time. For example wastewater treatment has been further improved. Microalgae are microscopic small algae, which can be used in wastewater treatment and nutrition. Microalgae have polyunsaturated fats, which are needed in the nutrition of humans.

This thesis explored whether it is possible to use the wastewater of a fish farm in the growth of the microalgae. Microalgae called *Selenastrum* sp. and *Euglena gracilis* were used in the experiment. The microalgae were grown in the water of the tanks, where either catfish or zander grew. Some of these waters were concentrated by using the sludge of the catfish or the zander, which comes from the wastewater treatments of a fish farm. The algae were grown together.

Dry weight samples and nutrient samples were taken during the tests. Total nitrogen, total phosphorus, ammonia nitrogen, orthophosphate and the COD were analyzed from the nutrient samples. In addition, it was tested whether the dry weight measurements could be replaced by measuring the optical density of the samples.

The best growth of the algae was in the water of the tanks where zander grew, and which was concentrated by using the sludge of the zander. In addition, the results of the optical density showed that it is possible to use this method instead of the dry weight measurement. Total nitrogen was the most consumed nutrient in these treatments. The consumption of total nitrogen was 23.5-34.2 mg/l.

The results of the test indicate that the fish farm should use this method. It is worth to explore this method more, for example, to find out how much its use might cost.

Key words: *Selenastrum* sp., *Euglena gracilis*, waste water treatment, dry weight, nutrient analyzes, fish farm

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	1
2	MIKROLEVÄT	3
2.1	Viherlevät, <i>Chlorophyta</i>	3
2.2	Silmälevät, <i>Euglenophyta</i>	4
2.3	Jäteveden puhdistus	6
2.4	Ravitsemus	6
3	MIKROLEVIEN KASVATUSMENETELMÄT	8
3.1	Avoimet kasvatusjärjestelmät	8
3.2	Suljetut kasvatusjärjestelmät	10
4	KALAN KASVATUS JA JÄTEVEDEN PUHDISTUS KIERTOVIIVILJELYSSÄ	12
5	LEVÄN KASVATUSMENETELMÄ JA KASVATUSOLOSUHTEET	14
6	KASVATUSKOE	16
6.1	Levien esikasvatus	16
6.2	Kokeen aloittaminen	17
6.3	Näytteenotot, ravinneanalyysit ja kokeen lopettaminen	17
7	TULOKSET	20
7.1	Kasvatusten kuivapainot ja optinen tiheys	20
7.2	Ravinnenäytteet	23
7.3	Kemiallinen hapenkulutus (COD)	26
7.4	Kokeen aikana tapahtuneita virheitä	27
7.5	Johtopäätökset	28
8	YHTEENVETO	29
	LÄHTEET	31
	LIITTEET	38

1 JOHDANTO

Nykyään on olemassa monia ympäristöä kuormittavia tekijöitä, jotka ovat aiheuttaneet vesistöjen ja muun luonnon pilaantumista. Monesti unohdetaan, että ympäristön pilaantuminen ei hankaloita ainoastaan muiden eliöiden elämää, vaan se uhkaa myös ihmisten hyvinvointia. Tähän on jo herätty ja kehitetty menetelmiä, joiden avulla voimme pitää parempaa huolta ympäristöstämme ilman, että oma elintasomme muuttuisi huonompaan suuntaan. Esimerkiksi jäteveden puhdistusprosesseja kehitetään entisestään.

Mikrolevät ovat osoittautuneet hyödyllisiksi esimerkiksi jäteveden puhdistusprosessissa. Mikroleviä hyödynnetään myös ravitsemuksessa, sillä ne sisältävät mm. tarvitsemiamme monityydyttymättömiä rasvahappoja. Mikroleviä tutkitaan edelleen ja tulevaisuudessa niitä tullaan varmasti käyttämään entistä monipuolisemmin.

Tässä opinnäytetyössä tutkitaan, pystyykö kalankasvatuslaitos hyödyntämään kalankasvatusaltaan kiertovettä ja kiertoveden puhdistamiseen käytettävän laskeutustankin lietettä mikrolevien kasvattamisessa. Mikäli tämä on mahdollista, kalankasvatuslaitos pystyisi mahdollisesti hyödyntämään mikroleviä kalankasvattamon jätevesien puhdistamisessa.

Aihetta tutkittiin laboratoriokokeen avulla. Kasvatuksessa käytetyt mikrolevät olivat *Selenastrum sp.* ja *Euglena gracilis*. Kasvatukset olivat sekaviljelmiä, eli ne sisälsivät sekä *Selenastrum sp.*- että *Euglena gracilis* -mikroleviä. Kasvatuskokeessa käytettiin kissakalan ja kuhan kasvatusalaiden vettä sekä kasvattamoveden puhdistusprosessista saatua kissakalan ja kuhan kasvatusalaiden lietettä.

Kokeen aikana tutkittiin, kasvavatko levät paremmin kalankasvatusaltaan vesissä vai vesissä, joita oli rikastettu käytetyllä lietteellä, sekä kasvavatko mikrolevät paremmin kissakalan vai kuhan kasvatusaltaan vesissä. Lisäksi tutkittiin kasvatusten aikana tapahtuvaa ravinteiden poistoa, sekä voitaisiinko levien kasvun seurannassa käyttää kuivapainoanalyysien sijasta optisen tiheyden eli absorbanssin tuloksia.

Opinnäytetyö tehtiin osana EAKR-rahoitteista Levarbio-hanketta. Hankkeen tarkoituksena on edistää levien tuottamien arvojakeiden ja leväbiomassan hyödyntämistä monipuolisesti eri sovelluskohteissa. Näihin sovelluskohteisiin lukeutuvat elintarvike-, rehu-, energia- ja lannoitekäyttö. Hankkeessa ovat mukana Helsingin yliopisto, Suomen ympäristökeskus sekä Hämeen ammattikorkeakoulu. (LEVARBIO 2016.)

Kasvatuskokeessa käytettiin Clewer Oy:n yhteydessä toimivan kokeellisen kiertovesiviljelykalankasvattamon (Kalavesi konsultit Oy) kalankasvatusalaiden vettä ja puhdistusjärjestelmän laskeutusaltaan lietettä. Kalankasvattamo toimii Clewer Oy:n tiloissa. Clewer Oy on turkulainen ympäristöteknologia-alan yritys, joka on keskittynyt uudenlaisiin jätevesijärjestelmiin. Clewer Oy on kehittänyt ja patentoinut RBBR-bioreaktorin, jota käytetään jätevesien puhdistuksessa. Clewer-teknologiaa on käytetty monella toimialalla, kuten teollisuuden, auto- ja vaatepesuloiden sekä kylpylöiden jätevesien puhdistamiseen. (Clewer 2017, 3-4.)

2 MIKROLEVÄT

Mikrolevät, eli kasviplanktonlevät, kuuluvat nimensä mukaisesti mikroskooppisen pieniin leviin. Niiden etuna on se, että ne pystyvät elämään laajasta riippuen erilaisissa olosuhteissa. Ne viihtyvät hyvin lämpimissä vesissä, mutta myös kylmissä olosuhteissa. Lisäksi osa lajeista viihtyy happamissa olosuhteissa sekä suolaisissa vesissä. Niitä voi löytää myös luolista, ja osa lajeista elää loisina tai symbioosissa muiden eliöiden kanssa.

(Bruun, Leppänen, Rantajärvi & Salojärvi 2012, 144; Dumur, Filali, Lopes, Pareau & Tebbani 2014, 2.)

Suurin osa kasviplanktonlevistä kuuluu yhteyttäviin, eli autotrofisiin lajeihin. Autotrofiset lajit saavat tarvitsemansa energian yhteyttämällä. Osa lajeista on heterotrofisia. Heterotrofit hyödyntävät orgaanista ainesta saadakseen tarvitsemansa energian. Mikсотrofiset lajit puolestaan kykenevät sekä yhteyttämään että hyödyntämään orgaanisia yhdisteitä energiantuotannossaan. (Happonen, Holopainen, Sotkas, Tenhunen, Tihtarinen-Ulmanen & Venäläinen 2008, 154; Bruun ym. 2012, 144.)

2.1 Viherlevät, *Chlorophyta*

Viherlevien lajisto on runsas ja monipuolinen, lajeja löytyy yli 8000 (Rikkinen 1999, 84). *Selenastrum*-suvun mikrolevät, joita käytettiin myös tässä kokeessa, kuuluvat aitoviherlevien luokkaan, eli *Chlorophyceae*-luokkaan. Aitoviherleviä esiintyy suolattomissa ja vähäsuolaisissa rantavesissä. Esimerkiksi Itämerestä lajeja löytyy noin 250. Joitakin lajeja esiintyy myös merissä. (Guiry 1867; Rikkinen 1999, 95; Bruun ym. 2012, 146.)

Rakenteeltaan suurin osa viherlevistä on yksisoluisia. Suurimmalla osalla viherlevistä on selluloosaa sisältävä soluseinä. Vaihtoehtoisesti se voi koostua myös ksylaanista, glykoproteiinista tai mannaanista. Viherlevillä on myös plastideja, joilla tarkoitetaan kasvisoluissa ja levissä esiintyviä soluorganelleja eli soluelimiä. Niillä on myös yleensä kaksi solun kärkeen tai hieman sen alapuolelle kiinnittynyttä uintisiimaa. Viherlevillä olevat pigmentit ovat klorofylli ja karoteenit. (Rikkinen 1999, 84-85; Lewis & Mc-

Court 2004; SOLUNETTI 2006a; Borén 2015.) Klorofylleja ja karotenoideja tarvitaan fotosynteesissä. Fotosynteesissä karotenoidit toimivat apupigmenteinä sekä suojaavat solua valokemiallisilta vaurioilta. (Flores & Stan-ge 2012, 77.) Kuvassa 1 on esitelty *Selenastrum* -mikrolevä laji, *Selenastrum gracile*.



KUVA 1. *Selenastrum gracile* (Protist Information Server 2018b)

Viherlevät lisääntyvät pääasiassa suvuttomasti, mutta joskus myös suvullisesti. ”Suvullinen lisääntyminen voi olla isogamista, anisogamista tai oogamista” (Rikkinen 1999, 86). Isogamisten eliöiden sukusolujen välillä ei ole eroavaisuutta, mutta anisogamisilla eliöillä sukusolujen eroavaisuudet ovat selkeämmät. Oogamiassa sukusolut eroavat toisistaan kooltaan, ulkomuodoltaan ja toiminnaltaan. (Rikkinen 1999, 48.)

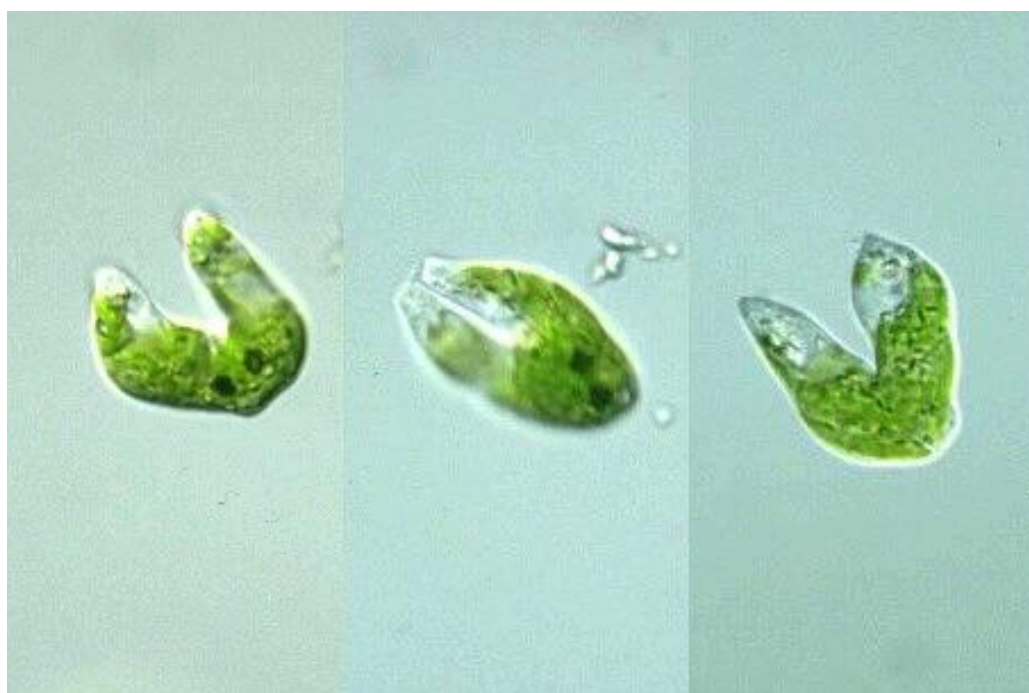
2.2 Silmälevät, *Euglenophyta*

Aiemmin silmälevien luokittelu on ollut vaikeaa, mutta nykyään tiedetään, että ne kuuluvat harvasiimaeliöiden kanssa samaan kehityslinjaan. *Euglena gracilis* -mikrolevät kuuluvat *euglena*-suvun mikroleviin, jotka kuuluvat silmälevien ryhmään. Monissa tutkimuksissa, joissa on tutkittu silmälevien

rakennetta ja elintoimintoja, on keskitytty tähän lajiin. Silmälevät tarvitsevat joidenkin bakteerien tuottamia vitamiineja, kuten B1- ja B12-vitamiineja. (Rikkinen 1999, 97-101; Guiry 2018.)

Pääasiassa silmälevälajeja esiintyy makeassa vedessä, mutta myös suolaisissa vesissä. Monet silmälevälajit viihtyvät myös hyvin esimerkiksi jätevesissä, ja ne sopeutuvat hyvin nopeisiin ympäristötilan muutoksiin. Itämerestä on löydetty noin 40 lajia. (Rikkinen 1999, 101; Bruun ym. 2012, 146.)

Rakenteeltaan silmälevät ovat yksisoluisia, siimallisia leviä. Ne elävät yksittäisinä soluina. Muodoltaan ne ovat soikeita tai sukkulamaisia. Silmälevillä ei ole soluseinää, vaan ohuen limakerroksen peittämä solukalvo, jonka alla on periplasti. Periplasti on proteiinipitoinen, ja se koostuu limittäisistä kierrepaksunnoksista. Periplasti voi olla joko ohut tai paksu ja jäykkä. Lisäksi näillä levillä on yleensä kaksi solun etupäässä olevaan syvennykseen kiinnittynyttä uintisiimaa. Silmälevillä oleva punainen silmätäplä sijaitsee aivan tämän syvennyksen vieressä. Kuvassa 2 on esitelty *Euglena gracilis* -mikroleväsoluja. (Tikkanen 1986, 157; Rikkinen 1999, 97-99; Bruun ym. 2012, 146.)



KUVA 2. *Euglena gracilis* (Protist Information Server 2018a)

2.3 Jäteveden puhdistus

Vesi on hitaasti uusiutuva luonnonvara, ja maailmalla juomakelpoisen veden määrä vähenee jatkuvasti. Huononevaan vesitilanteeseen vaikuttavat ilmastonmuutos ja saastuminen. Muita vaikuttavia tekijöitä ovat väestönkasvu, kaupungistuminen ja teollisuuden nopea kasvu. Kaikista maailman vesivaroista ainoastaan 2,5 % on makeaa vettä, josta 70 % kulutetaan maataloudessa. Muita veden käyttökohteita ovat teollisuus ja kotitaloudet. (Suomen YK-liitto 2017.)

Mikrolevät ovat tehokkaita jäteveden puhdistuksessa, koska ne poistavat tehokkaasti ravinteita jätevesistä. Lisäksi ne tuottavat fotosynteesituotteena happea, jolla jäteveden puhdistusprosessissa voitaisiin korvata osa ilmastukseen tarvittavasta hapestä ja siten ilmastukseen kulutettavasta energiasta. Jäteveden ilmastusprosessiin saattaa kuluu sähköenergiaa jopa 50 % jätevedenpuhdistamon kokonaisenergiasta. (Arashiro 2016.) Ilmastuksen aikana puhdistettavaan veteen syötetään pieniä ilmakuplia. Tätä vaihetta tarvitaan, jotta jätevedessä olevat eloperäistä ainesta kuluttavat bakteerit alkavat kasvaa ja lisääntyä. (HSY 2017.)

Vaasan yliopisto julkaisi internetsivullaan 6.7.2016 artikkelin, jossa kerrotaan levien hyödyntämisestä sekä tutkija Liandong Zhun mikroleviin liittyvästä tutkimuksesta. Tutkimuksessa kasvatettiin *Chlorella zofingiensis* -mikrolevää laimennetuissa sikaloiden jätevesissä. Artikkelissa Zhu toteaa viitaten aiempiin tutkimuksiinsa, että levän kasvatuksesta koituvia kustannuksia voidaan vähentää hyödyntämällä leväkasvatuksessa viemäriveredestä saatavia ravinteita ja että levä voi poistaa jäteveden typestä 84-92 % ja fosforista 59-74 %. (Vaasan yliopisto 2016.)

2.4 Ravitseminen

Mikroleviä voidaan hyödyntää ihmisten ja eläinten ravitsemuksessa. Osa mikrolevistä sisältää tarvitsemiamme pitkäketjuisia monityydyttymättömiä rasvahappoja, joista tärkeimmät ovat eikosapentaeenihappo (EPA) ja dokosaheksaeenihappo (DHA). Tällä hetkellä omega-3-rasvahappoja saa-

daan pääasiassa kalasta. (Adarme-Vega, Lim, Schenk, Timmins, Vernen, & Yan 2012; Schwab 2016.)

Omega-3-rasvahappojen saanti voi vähentää riskiä sairastua sydän- ja verisuonitauteihin. Lisäksi ne vaikuttavat positiivisesti myös aivojen toimintaan ja näköön. Tutkimukset ovat osoittaneet, että omega-3-rasvahapoilla olisi vaikutusta myös mielenterveyteen, astmaan ja nivelreumaan. Niillä on tärkeä tehtävä myös sikiön kehityksessä, sillä ne edistävät esimerkiksi aivojen, sydämen ja verkkokalvon oikeanlaista kehittymistä. (Voutilainen 2010; Block, Mousa & Swanson 2012; Adarme-Vega ym. 2012; Terve.fi 2017; VitaeLab 2017.)

Mikrolevät sisältävät myös karotenoideja, eli väriaineita. Karotenoidit jaetaan karoteeneihin ja ksantofylleihin. Karoteeneista beetakaroteeni on antioksidantti ja A-vitamiinin esiaste, ja sen avulla pystytään esimerkiksi parantamaan elimistön puolustuskykyä. Se on myös monissa kasveissa puna-oranssi väripigmentti. (Hammond 2013; Szalay 2015; Antioksidanttit.com 2016.)

On myös tutkittu, voidaanko mikroleviä käyttää kotieläinten ravitsemuksessa. Aihetta käsiteltiin 29.4.2016 julkaistussa Maaseudun tulevaisuuden artikkelissa. Artikkelissa kerrotaan tohtorikoulutettava Marjukka Lammisen syöttäneen työryhmänsä kanssa levävalkuaista lehmille. Artikkelissa Lamminen kertoo, että mikrolevät voisivat korvata soijarouheen käytön. Levien korkea hinta voi olla vielä esteenä niiden hyödyntämiselle. (Pulkkinen 2016.)

3 MIKROLEVIEN KASVATUSMENETELMÄT

Mikroleviä kasvatetaan joko suljetuissa tai avoimissa kasvatusjärjestelmissä, joista jälkimmäinen on yleisempi menetelmä. Lisäksi on olemassa hybridikasvatusjärjestelmiä, joissa käytetään sekä avointa että suljettua järjestelmää. Menetelmää valittaessa tulee huomioida mikrolevien biologia, maankäytöstä, energiasta ja ravintoaineista aiheutuvat kustannukset; veden saanti, ilmasto, lopullisten tuotteiden määrittely sekä työn intensiteetti. *”Intensiteetti kuvaa sitä, kuinka paljon energiaa säteily kuljettaa tietyn suuruisen pinnan läpi aikayksikössä”* (Hatakka, Saari, Sirviö, Viiri & Yrjänäinen 2009, 9). Mikrolevien kasvattamiseen tarvitaan hiilidioksidia, vettä, ravinteita ja valoenergiaa. Lopputuloksena syntyy biomassaa ja happea. (Antolli & Liu 2012, 7-22; All about algae.com 2017a; All about algae.com 2017b; Kunga & Vanags 2017, 3.)

3.1 Avoimet kasvatusjärjestelmät

Avoimissa kasvatusjärjestelmissä kasvatus tapahtuu luonnonvesissä tai keinotekoisissa altaissa tai säiliöissä. Yleensä ne koostuvat ympyrän muotoisista altaista (kuva 3) tai usein betoniin rakennetuista ”raceway”-altaista (kuva 4). Nimi ”raceway” tulee siitä, että altaat muistuttavat muodoltaan kilparataa. Altaat ovat matalia, mutta pinta-alaltaan ne voivat olla jopa useamman hehtaarin kokoisia. Ympyrän muotoisissa altaissa käytetään pyörivää sekoittajaa ja ”raceway”-altaissa tarvittava virtaus saadaan aikaan siipirattaan avulla. (Antolli & Liu 2012, 8; All about algae.com 2017b.)



KUVA 3. Pyöreän muotoinen kasvatusallas (Ando, Furuse, Kamiya, Komaki, Niwa, Tanaka, Yamashita 2011)



KUVA 4. "Raceway" -kasvatusjärjestelmä (Biodiesel from algae 2018)

Avoimien järjestelmien etuna on niiden helppokäyttöisyys, jonka lisäksi niiden rakentaminen on edullista. Suljettuihin järjestelmiin verrattuna ne kuluttavat vähemmän energiaa ja niiden kunnossapito on helpompaa. (Anttoli & Liu 2012, 7-8.)

Ne eivät kuitenkaan tuota yhtä tehokkaasti leväbiomassaa kuin suljetut kasvatusjärjestelmät. Tämä johtuu haihtumishäviöistä, lämpötilan vaihte-

luista, hiilidioksidirajoitteisuudesta, tehottomasta sekoittumisesta sekä riittämättömästä valaistuksesta. Lisäksi niissä on vaikeampaa hallita kasvatusten kontaminoitumista kuin suljetuissa järjestelmissä. (Antolli & Liu 2012, 8-9.)

3.2 Suljetut kasvatusjärjestelmät

Suljetut kasvatusjärjestelmät voidaan jakaa bioreaktoreihin, joissa leviä kasvatetaan heterotrofisesti ilman valaistusta, ja fotobioreaktoreihin, joita käytetään valoa vaativassa auto- tai miksotrofisessa kasvatuksessa. Niiden tarkoituksena on ratkaista avoimien järjestelmien ongelmat, kuten kasvatusten kontaminoituminen. Suljetuista järjestelmistä aiheutuu kuitenkin enemmän kustannuksia. (Antolli & Liu 2012, 4-8; All about algae.com 2017a.)

Fotobioreaktorissa mikrolevät kasvatetaan suljetussa systeemissä neste-faasissa. Lisäksi tarvitaan joko luonnon valoa tai keinovaloa, kaasun syöttöjärjestelmä (CO_2 ja ilma) sekä järjestelmä kaasun poistoon (Aoyagi, Uchiyama & Ugwu 2007, 2; Antolli & Liu 2012, 26). Käytettävän valaistuksen tulisi olla yhtenäinen, vähentää leväsolujen keskinäistä varjostusta sekä tarjota tehokas CO_2 :n ja O_2 :n massan siirto. Nämä asiat vaikuttavat käytettävän fotobioreaktorimallin valaistuksen tehokkuuteen. Fotobioreaktoreissa tulee olla mahdollista kasvattaa suuria määriä leväbiomassaa sekä erilaisia mikrolevälajeja, eikä reaktori saa likaantua. (Hee-Jeong, Prabuddha & Seung-Mok 2015, 2-3.)

Fotobioreaktoreita on kehitetty usean tyyppisiä, esimerkiksi putkimainen (kuva 5), "flat plate" (kuva 6) ja fermentorityyppinen, mutta fermentoreita ei käytetä eläin- ja kasvisolujen kasvattamiseen. (Aittomäki, Eerikäinen, Leisola, Ojamo, Suominen & Weymarn 2002, 29-30; Antolli & Liu 2012, 10.)



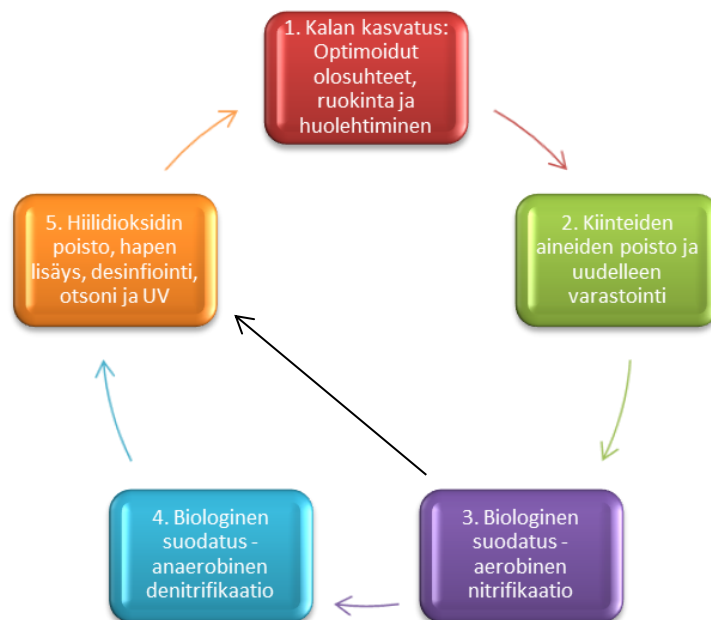
KUVA 5. Putkimainen fotobioreaktori (Flynn, Greenwell, Laurens, Lovitt & Shields 2009)



KUVA 6. Flat plate (Ojamäe 2011, 12)

4 KALAN KASVATUS JA JÄTEVEDEN PUHDISTUS KIERTOVISSIVILJELYSSÄ

Kuviossa 1 on esitelty tässä kokeessa käytetyn kalankasvatuslaitoksen kiertovesiallasviljelymenetelmä. Prosessin alussa, kasvatusaltaassa kasvatetaan kalaa ja huolehditaan niiden kasvuolosuhteista ja ruokinnasta. Vedenpuhdistusjärjestelmässä kalankasvatusvedestä poistetaan ensin kiintoaines. Kiintoaines ja samalla osa vedestä johdetaan jätevedenpuhdistamolle. Suurin osa vedestä kierrätetään eteenpäin puhdistusjärjestelmässä. Kolmannessa vaiheessa tapahtuu biologinen suodatus ja aerobinen nitrifikaatio. Nitrifikaatiossa typpiyhdisteet hapetetaan nitriitiksi ja nitraatiksi. Tästä siirrytään biologiseen suodatukseen ja anaerobiseen denitrifikaatioon. Denitrifikaation aikana anaerobiset denitrifikaatiobakteerit pilkkovat nitriittiä ja nitraattia, minkä lopputuloksena syntyy typpikaasua. Vaihtoehtoisesti vaiheesta 3 voidaan siirtyä suoraan viimeiseen vaiheeseen (vaihe 5), jossa hiilidioksidi poistetaan, lisätään happea ja vesi desinfioidaan. Veden desinfioinnissa käytetään sekä otsonia että UV-valoa. (Lahti & Rönkä 2006, 23; Arp, Klotz & Ward 2011, 13; Korvonen 2017.)



KUVIO 1. Kalankasvatusmenetelmä kiertovesikalankasvattamossa (Korvonen 2017)

Opinnäytetyön aikana oltiin yhteydessä Clewer Oy:n kanssa. Sieltä kerrottiin, että kyseessä on kiertovesilaitos, jossa veden kierrätysaste on korkea. Syntyvän kiintoaineksen kerääminen puolestaan tapahtuu tehokkaalla al-lashydrauliikalla, rumpusiivilällä ja flotaatiolla. (Korvonen 2017) Flotaation aikana puhdistettava jätevesi ja paineilma sekoitetaan keskenään (Solid-water 2017).

Clewer Oy:n yhteyshenkilö Pasi Korvosen (2017) mukaan vettä poistui systeemistä hieman esimerkiksi flotaation aikana sekä haihtumalla. Sama määrä vettä lisättiin altaaseen kasvatuksen aikana. Muutenkin vettä kulutettiin maltillisesti. Esimerkkinä hän kertoi, että 4036 kalakilon tuottamisessa veden kulutus oli 123 m^3 , eli noin $0,03 \text{ m}^3/\text{kg}$.

5 LEVÄN KASVATUSMENETELMÄ JA KASVATUSOLOSUHTEET

Kasvatukset suoritettiin kahden litran borosilikaattipulloissa, joita oli 16 kappaletta. Kuvassa 7 on esitetty koottu kasvatuspullo. Aluksi pullot, lasiset pipetit ja pullojen korkit pestiin. Korkkeihin oli aikaisemmin porattu kolme reikää, joista kahteen ujutettiin lasinen kahden millilitran pipetti ja kolmanteen reikään 20,5 cm pituinen poistoilmaletku. Toisen pipetin päähän laitettiin 20,5 cm pitkä näytteenottoletku ja toisen 30,5 cm pitkä ilmastusletku. Käytetyt letkut olivat silikoniletkuja. Kontaminoitumisen välttämiseksi, kaasun syöttö- ja poistoletkujen päihin laitettiin suodattimet.



KUVA 7. Kasvatuspullon rakenne

Kokeen aikana kasvatukseen syötettiin 0,5 l/min hiilidioksidia ja ilmaa sisältävää kaasuseosta. Kaasut sekoitettiin kosteuspullossa. Kosteuspullossa toimi kahden litran borosilikaattipullo, jossa oli tislattua vettä. Kosteuspulloon syötettiin ilmaa 10 l/min ja hiilidioksidia 0,2 l/min, eli hiilidioksidin osuus kaasuseoksessa oli 2 %.

Kasvatuskoe suoritettiin kasvatuskaapeissa (Sanyo Growth Cabinet & Versatile Environmental Test Chamber), joiden valaistus oli ajastettu siten, että niiden valot olivat 16 tuntia päällä ja 8 tuntia pois päältä. Lämpötila oli 20 °C. Ennen kokeen aloittamista mitattiin kasvatuskaappien valointensiteetit ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$). Kaappien valointensiteetit mitattiin kaappien ylä- ja alatasoista, mahdollisimman keskeltä. Käytetty valointensiteetti oli 250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s} \pm 8$. Lopuksi kasvatuspullot autoklavoitiin (40 minuuttia, 120 °C, 1 bar).

6 KASVATUSKOE

Kokeen aikana toteutetut kasvatukset olivat sekaviljelmiä. Tällä tarkoitetaan sitä, että kokeen aikana kasvatettiin kahta levälajia samassa kasvatuspullossa. Tässä kokeessa käytetyt levälajit olivat *Selenastrum sp.* ja *Euglena gracilis*. Käytettyjä kasvatusalustoja oli neljä ja jokaisella alustalla tehtiin neljä rinnakkaista kasvatusta kasvatuskaapeissa. Kuvassa 8 kasvatuskoe on käynnissä. Kuvassa 8 on vain yhdessä kasvatuskaapissa olevat kasvatukset.



KUVA 8. Käynnissä oleva kasvatuskoe

6.1 Levien esikasvatus

Ennen varsinaisen kasvatuskokeen aloittamista *Selenastrum sp.*- ja *Euglena gracilis* -mikrolevät esikasvatettiin autoklavoidussa EG-kasvatusalustassa, jonka ohjeet löytyvät liitteestä 1. Esikasvatukset tehtiin neljässä kasvatuspullossa. Pulloihin lisättiin 500 millilitraa EG-liuosta. Kas-

vatuspulloihin siirrostettiin joko *Selenastrum sp.* -mikrolevää (20 ml) tai *Euglena gracilis* -mikrolevää (10 ml). Kontaminaatioiden välttämiseksi siirrostukset tehtiin laminaari-ilmavirtauskaapissa.

6.2 Kokeen aloittaminen

Mikrolevät, kalankasvatusaltilaiden kiertovedet ja kokeessa käytetyt lietteet lisättiin kasvatuspulloihin vetokaapissa. Kasvatusalustan kokonaistilavuus oli 1,6 litraa. Kasvatusliuokset, jotka oli rikastettu joko kissakalan tai kuhan lietteellä, sisälsivät 43 millilitraa lietettä ja 1,557 litraa joko kissakalan tai kuhan kasvatusaltaan vettä. Näitä pulloja oli kahdeksan. Kahdessa muussa kasvatuksessa käytettiin ainoastaan joko kissakalan tai kuhan kasvatusaltaan vettä. Näiden kasvatusten kasvatuspulloihin laitettiin suoraan 1,6 litraa joko kissakalan tai kuhan kasvatusaltaan vettä, kasvatuksesta riippuen.

Lopuksi kasvatuspulloihin lisättiin aiemmin esikasvatetut mikrolevät. Kaikkiin kasvatuspulloihin *Selenastrum sp.* -mikrolevää lisättiin 50 millilitraa ja *Euglena gracilis* -mikrolevää 44 millilitraa. Ennen koetta valmistetuista esikasvatuksista otettiin kuivapainonäytteet, joiden avulla laskettiin, kuinka paljon mikroleviä kasvatukseen tuli lisätä, jotta molempia lajeja oli biomassaltaan sama määrä. Täysin tarkkaa tulosta ei saatu ja mikrolevien välillä oli eroavaisuutta 0,000363 g.

6.3 Näytteenotot, ravinneanalyysit ja kokeen lopettaminen

Kokeen aikana näytteitä otettiin kaikista kasvatuksista kolmesti viikossa kuivapainon, optisen tiheyden ja ravinnepitoisuuksien määrittämiseen. Näytteet otettiin aamuisin aina samaan aikaan. Kuivapainomääritysten ja optisen tiheyden mittausten avulla seurattiin mikrolevien biomassan kasvamista.

Kuivapainon määrittystä varten leväbiomassaa suodatettiin vähintään 10 ml esikuivattujen (105 °C:ssa yön yli) ja punnittujen suodattimien (GF/C, Ø 47 mm, Whatman) läpi Knf LAB LABOPORT-suodatinpumpun avulla.

Suodatusten jälkeen suodattimet kuivattiin uudelleen yön yli 105 °C:ssa. Seuraavana päivänä näytettä sisältävät suodattimet punnittiin.

Kun näistä tuloksista vähennettiin pelkkien kuivattujen suodattimien paino ja tulos suhteutettiin suodatettuun näytemäärään, saatiin määritettyä mikrolevien biomassat. Näissä laskuissa on käytetty kaavaa 1. Suodatettavan näytteen määrä muutettiin millilitroista litroiksi.

(1)

$$x = \frac{x_2 - x_1}{\left(\frac{x_3}{1000}\right)}$$

x = Syntyvä biomassa (g/l)

x_1 = Kuivatun suodattimen massa (g)

x_2 = Näytettä sisältävän kuivatun suodattimen massa (g)

x_3 = Suodatettavan näytteen määrä (ml)

Optisella tiheydellä, eli absorbanssilla, tarkoitetaan aineen kykyä taittaa valoa (Hatakka, Saari, Sirviö & Viiri 2013, 53). Optisen tiheyden mittaamisessa käytettiin UV-2401PC-spektrofotometriä. Spektrofotometrin toiminta perustuu siihen, että näyteliuosta valaistaan eri aallonpituuksilla (SOLUNETTI 2006c). Tämän kokeen aikana käytetyt aallonpituudet olivat WL550,0 ja WL650,0. Tässä tapauksessa määritettiin mikrolevien kasvua. Näytteen optinen tiheys kasvaa samalla, kun näytteen solutiheys kasvaa.

Suodattamisen aikana syntyneestä suodoksesta analysoitiin ravinnepitoisuudet ja kemiallinen hapenkulutus (COD). Ravinnenäytteistä analysoitiin kokonaistyyppi, kokonaisfosfori, ammoniumtyppi ja ortofosfaatti. Ravinteita tutkittiin kokeen aikana, koska ravinteiden poisto on jäteveden puhdistuksessa olennainen osa. Tämä tehtiin kasvatusten päättyttyä, minkä vuoksi suodos säilöttiin pakastimeen.

Ravinteet ja kemiallinen hapenkulutus analysoitiin kyveti- eli pikatestien avulla. Liitteeseen 2 on koottu kokeessa käytettyjen pikatestien kittien ni-

met ja pitoisuusvälit. Osa testeistä sisälsi poltto-osuuden (käytetyn laitteen merkki: HT200S-pikapolttohaude, Hach Lange).

Kasvatusten saavutettua stationäärivaiheen, leväbiomassat kerättiin talteen sentrifugoimalla. Leväviljelmässä stationäärivaihe alkaa, kun jokin tarvittavista ravintoaineista on loppunut ja / tai haitalliset aineenvaihduntatuotteet rajoittavat solujen lisääntymistä. Myös valon saatavuus voi rajoittaa kasvua. Stationäärivaihetta edeltää eksponentiaalisen kasvun vaihe, jonka aikana solut lisääntyvät tehokkaasti. (Solunetti 2006b.)

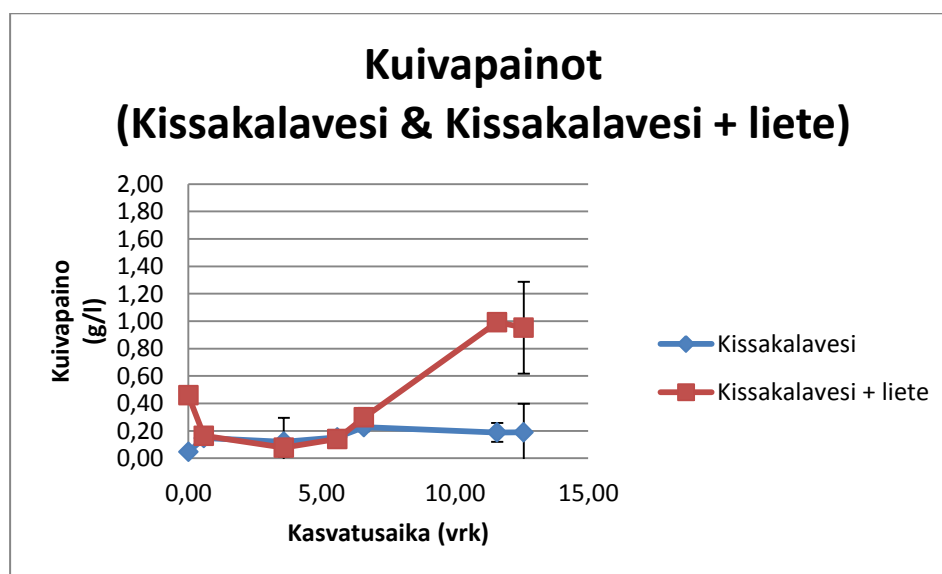
7 TULOKSET

Seuraavaksi käsitellään kuivapaino- ja ravinneanalyyysien sekä optisen tiheyden mittausten tuloksia. Tuloksissa esitetään rinnakkaisien analyysien keskiarvot ja keskihajonnat. Kuvioiden kaikissa pisteissä ei näy niiden keskihajontoja, koska saadut keskihajontatulokset ovat niin pieniä.

7.1 Kasvatusten kuivapainot ja optinen tiheys

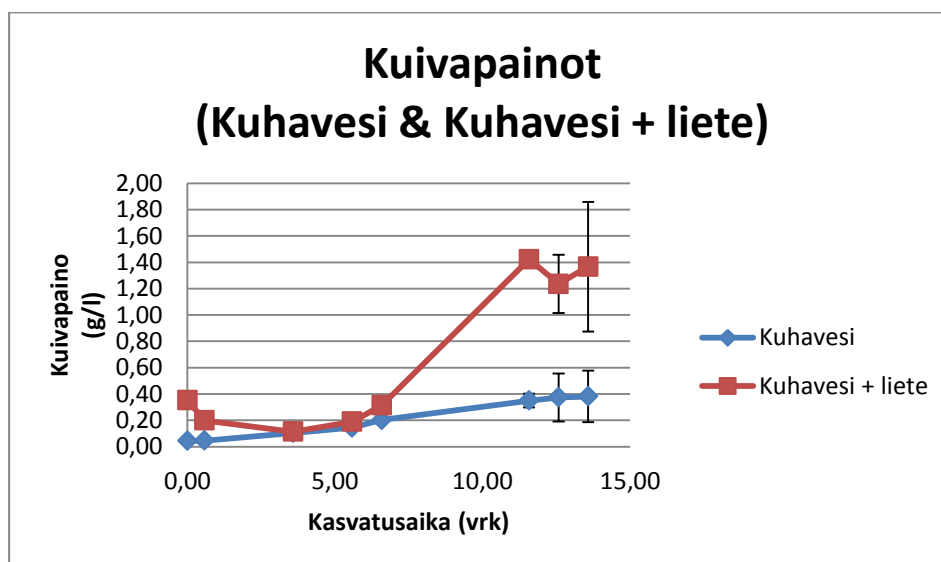
Kuvioissa 2 ja 3 on esitelty kasvatusten kuivapainokäyrät. Käyrät on piirretty siten, että yhdessä kasvualustassa tehtyjen rinnakkaiskasvatusten kuivapainotuloksista laskettiin kunkin kasvatuspäivän kohdalla näiden rinnakkaiskasvatusten keskiarvot.

Kuviossa 2 on esitelty niiden kasvatusten tulokset, joissa on käytetty kissakalan kasvatusaltaan vettä ja kissakalan lietteellä rikastettua kissakalan kasvatusaltaan vettä. Biomassan tuotto kissakalan lietteellä rikastetussa kissakalan kasvatusaltaan vedessä oli 0,95 mg/l ja kissakalan kasvatusaltaan vesissä tehdyissä kasvatuksissa se oli 0,19 mg/l.



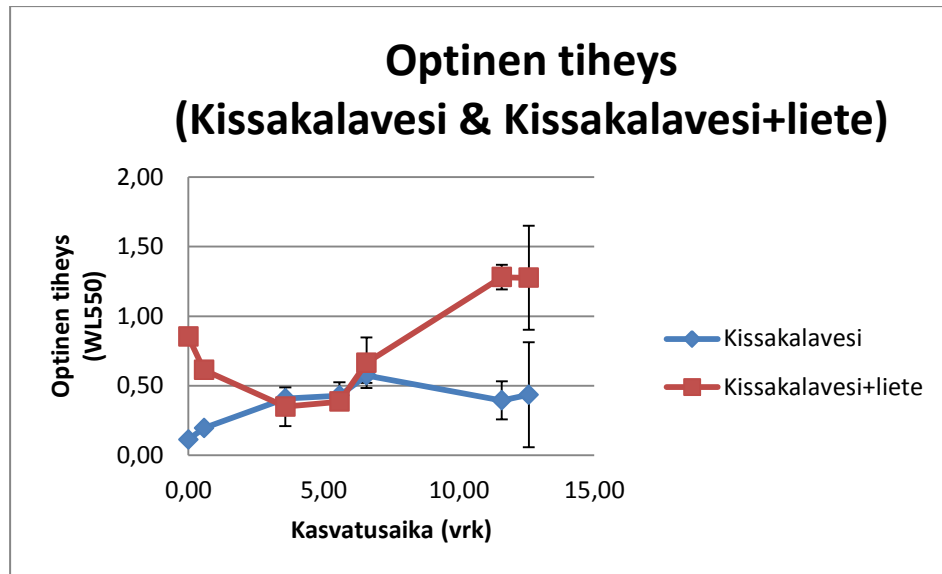
KUVIO 2. Kissakalan kasvatusaltaan vedessä ja kissakalan lietteellä rikastetussa kissakalan kasvatusaltaan vedessä tehtyjen kasvatusten kuivapainokäyrät

Niiden kasvatusten kuivapainokäyrät, joissa on käytetty kuhan kasvatusaltaan vettä ja kuhan lietteellä rikastettua kuhankasvatusaltaan vettä on esitelty kuviossa 3. Levien biomassan tuotto oli tehokkainta kasvatusalustassa, jossa oli käytetty kuhan lietteellä rikastettua kuhan kasvatusaltaan vettä (1,29 mg/l). Pelkästään kuhan kasvatusaltaan vesissä tehdyissä kasvatuksissa levän biomassan tuotto oli 0,38 mg/l.



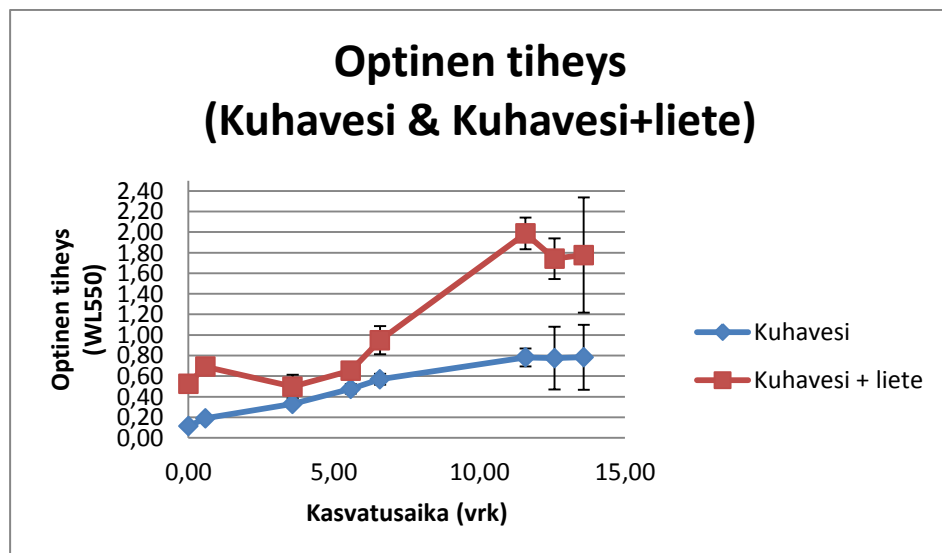
KUVIO 3. Kuhan kasvatusaltaan vedessä ja kuhan lietteellä rikastetussa kuhan kasvatusaltaan vedessä tehtyjen kasvatusten kuivapainokäyrät

Kuivapainomäärittysten lisäksi levien kasvua seurattiin mittaamalla optista tiheyttä. Kuvioissa 4 ja 5 on käytetty merkintöjä WL550 tai WL650. WL on lyhenne englanninkielisen sanasta *Wavelength*, mikä tarkoittaa aallonpituutta. Kuvion 4 tulokset, jotka on mitattu aallonpituudella 550, ovat leväviljelmistä, joissa leviä kasvatettiin kissakalan kasvatusaltaan vedessä ja kissakalan lietteellä rikastetussa kissakalan kasvatusaltaan vedessä. Kun näitä tuloksia verrataan kuvion 2 tulosten kanssa, huomataan että kuvaajien välillä ei ole suuria eroavaisuuksia. Aallonpituudella 650 mitatut tulokset olivat samankaltaisia.



KUVIO 4. Kissakalan kasvatusaltaan vettä sisältävien kasvatusten optiset tiheydet, mittauksessa on käytetty aallonpituutta 550

Molempien kuhan kasvatusaltaan vettä sisältävien kasvatusten optisen tiheyden tulokset aallonpituudella 550 on esitetty kuviossa 5. Tämän kuvion optisen tiheyden käyrät ovat vertailukelpoisia kuvion 3 tulosten kanssa. Aallonpituudella 650 mitatut tulokset olivat samankaltaisia.



KUVIO 5. Kuhan kasvatusaltaan vettä sisältävien kasvatusten optiset tiheydet, aallonpituus 550

7.2 Ravinneytyt

Kokeen alussa kokonaistypen pitoisuus kaikkien kasvatusten kesken oli 23,5-34,2 mg/l. Kokonaistyyppi sisältää myös ammoniumtyyppiä, jonka pitoisuudet kokeen alussa olivat välillä 4,88-9,72 mg/l. Kokonaisfosforin pitoisuudet olivat välillä 3,62-6,06 mg/l ja siihen sisältyvän ortofosfaatin pitoisuudet olivat 2,94-4,81 mg/l. Kokonaistypen, kokonaisfosforin ja ortofosfaatin pitoisuudet olivat kokeen alussa korkeimmillaan kasvatuksissa, joissa oli käytetty kuhan lietteellä rikastettua kuhan kasvatusaltaan vettä.

Ammoniumtyyppiä oli kokeen alussa eniten kasvatuksissa, joissa oli käytetty kissakalan lietteellä rikastettua kissakalan kasvatusaltaan vettä. Kaikista kasvatuksista on laskettu ravinteiden kulutus. Ravinteiden kulutusta laskettaessa käytettiin kaavaa 2:

(2)

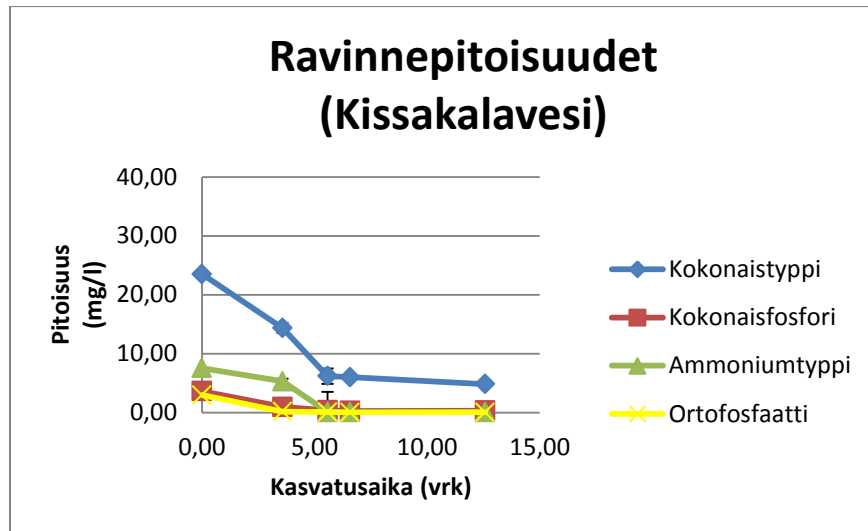
$$y = \left(\frac{y_1 - y_2}{y_1} \right) * 100 \%$$

y = Ravinteiden kokonaiskulutus (%)

y_1 = Ensimmäisen kasvatuspäivän pitoisuus (mg/l)

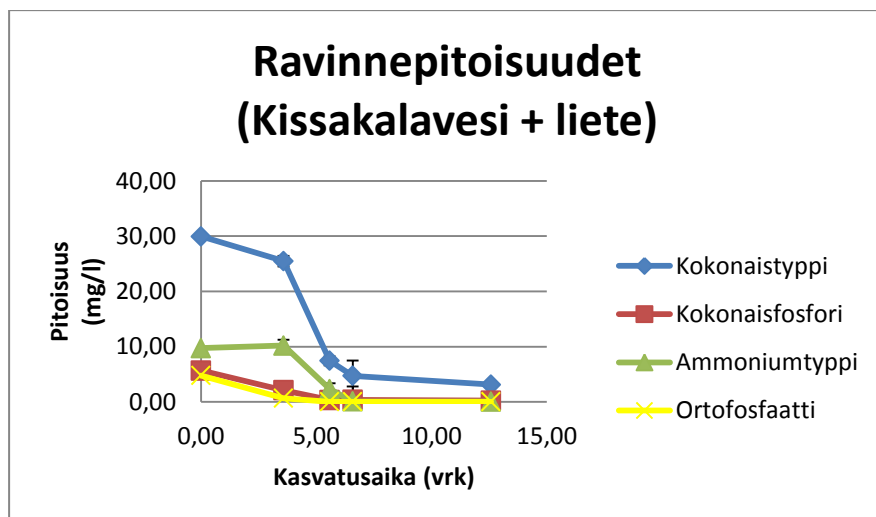
y_2 = Viimeisen kasvatuspäivän pitoisuus (mg/l)

Kissakalan kasvatusaltaan vedessä tehtyjen kasvatusten ravinnepitoisuudet kokeen aikana on esitelty kuviossa 6. Kokonaistyyppiä kasvatusten aikana kului noin 79,4 %, kokonaisfosforia 91,2 %, ammoniumtyyppiä 99,2 % ja ortofosfaattia 99,7 %.



KUVIO 6. Kissakalan kasvatusaltaan vedessä tehtyjen kasvatusten ravinnepitoisuudet

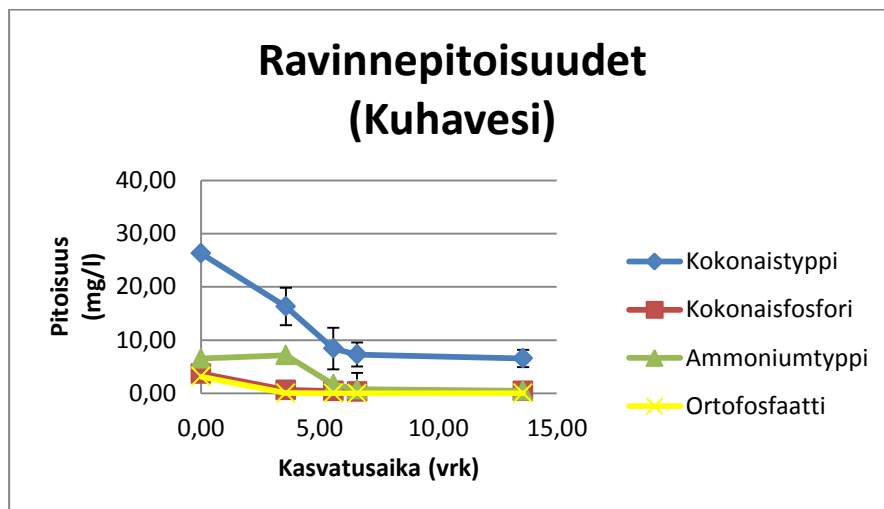
Kuviossa 7 on esitelty niiden kasvatusten ravinneanalyysoitujen tulokset, joiden kasvatusalustana on käytetty kissakalan lietteellä rikastettua kissakalan kasvatusaltaan vettä. Näissä kasvatuksissa kokonaistyyppiä kulutettiin 89,6 %, kokonaisfosforia 95,9 %, ammoniumtyppiä 99,5 % ja ortofosfaattia 99,8 %.



KUVIO 7. Kissakalan lietteellä rikastetussa kissakalan kasvatusaltaan vedessä tehtyjen kasvatusten ravinnepitoisuudet

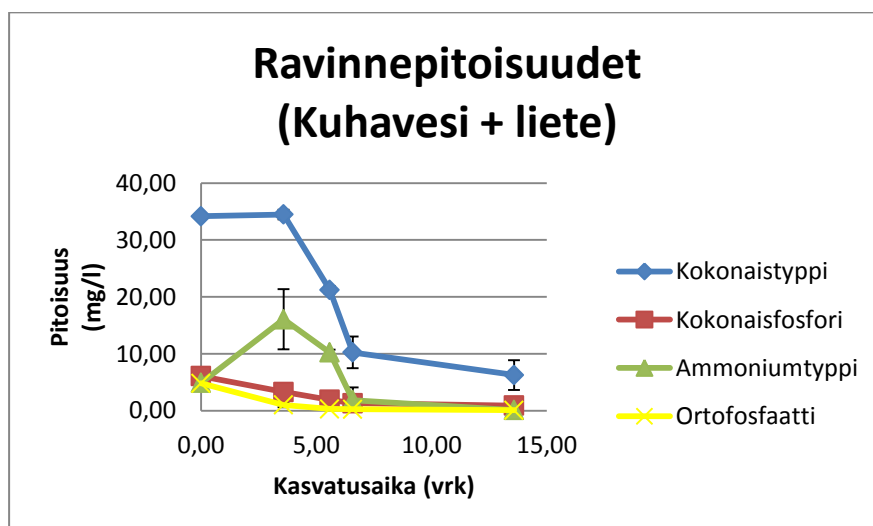
Kuhan kasvatusaltaan vedessä tehtyjen kasvatusten ravinneanalyysoitujen tulosten (kuvio 8) perusteella kokonaistyyppiä kulutettiin 75,0 % ja koko-

naisfosforin 88,5 %. Ammoniumtyyppä kulutettiin 92,5 % ja ortofosfaattia 99,1 %.



KUVIO 8. Kuhan kasvatusaltaan vedessä tehtyjen kasvatusten ravinnepitoisuudet

Kuviossa 9 on esitetty niiden kasvatusten ravinneanalyysien tulokset, joissa on käytetty kuhan kasvatusaltaan vettä, jota on rikastettu kuhan lietteellä. Kokonaistypen kulutus oli 81,7 %, kokonaisfosforin 85,2 %, ammoniumtyyppien 98,0 % ja ortofosfaatin 98,5 %.

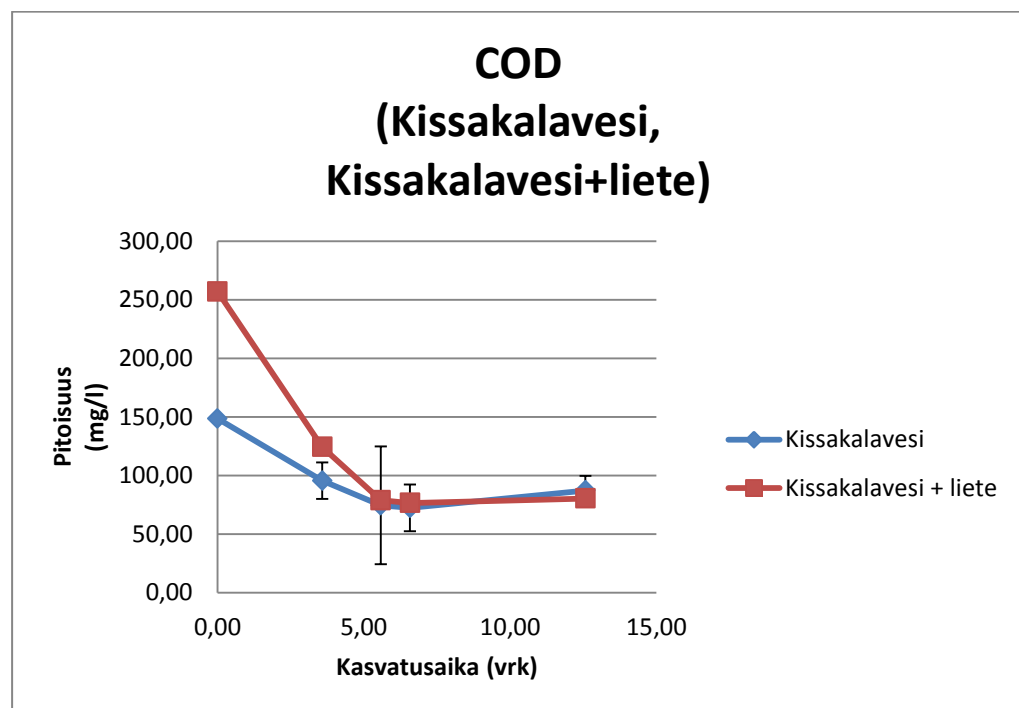


KUVIO 9. Kuhan lietteellä rikastetussa kuhan kasvatusaltaan vedessä tehtyjen kasvatusten ravinnepitoisuudet

7.3 Kemiallinen hapenkulutus (COD)

Kemiallisen hapenkulutuksen mittaustulokset on esitetty kuvioissa 10 ja 11. Kemiallisen hapenkulutuksen (COD) avulla mitataan veden kemiallisesti kuluttaman hapen määrää (Kemira 2017). Kyvettitesteissä on käytetty dikromaattihapetusta (HACH 2017c).

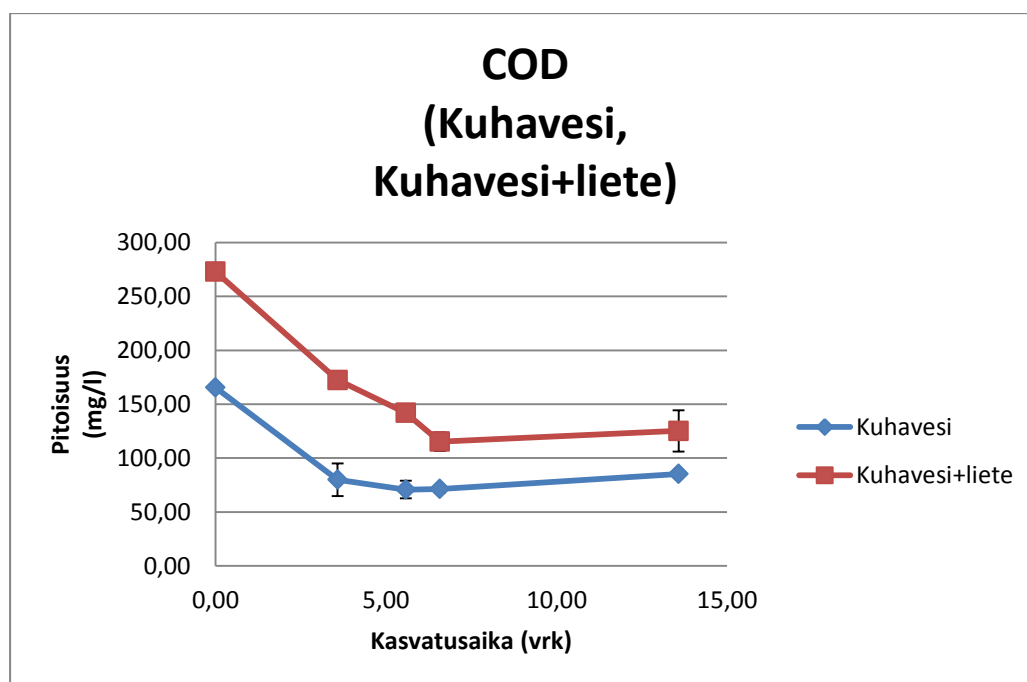
Kuviossa 10 on esitelty kaikkien niiden kasvatusten kemiallisen hapenkulutuksen tulokset, joissa on käytetty kasvatusalustana kissakalan kasvatusaltaan vettä, myös ne, joita on rikastettu kissakalan lietteellä. Molemmissa kasvatuksissa COD laski suurin piirtein samalle tasolle viiden päivän aikana. Kasvatuskokeen aikana COD laski kissakalankasvatusaltaan vedessä tehdyissä kasvatuksissa 41,3 % ja kissakalan lietteellä rikastetussa kissakalan kasvatusaltaan vedessä tehdyissä kasvatuksissa 68,7 %.



KUVIO 10. Kissakalan kasvatusaltaan vedessä ja kissakalan lietteellä rikastetussa kissakalan kasvatusaltaan vedessä tehtyjen kasvatusten kemiallinen hapenkulutus (COD)

Kemiallisen hapenkulutuksen arvot ovat kaikkien kasvatusten kesken korkeimmat koko kokeen ajan niissä kuhan kasvatusaltaan vesissä tehdyissä kasvatuksissa, jotka sisälsivät myös kuhan lietettä (kuvio 11). Kuviossa 11

on esitetty myös ainoastaan kuhan kasvatusaltaan vedessä tehtyjen kasvatusten kemiallisen hapenkulutuksen tulokset. Kokeen aikana COD laski kuhan kasvatusaltaan vedessä tehdyissä kasvatuksissa 48,4 % ja kuhan lietteellä rikastetussa kuhan kasvatusaltaan vedessä tehdyissä kasvatuksissa 54,1 %.



KUVIO 11. Kuhan kasvatusaltaan vedessä ja kuhan lietteellä rikastetussa kuhan kasvatusaltaan vedessä tehtyjen kasvatusten kemiallinen hapenkulutus (COD)

7.4 Kokeen aikana tapahtuneita virheitä

Näytteenottojen yhteydessä tapahtui sekoitusvirhe, minkä vuoksi näytteet eivät olleet tarpeeksi yhdenmukaisia, ja tuloksissa esiintyy hieman virheitä. Myös kaasujen syöttö oli epätasaista kasvatusten välillä. Virheistä huolimatta kokeen tuloksia voi hyödyntää jatkossa.

7.5 Johtopäätökset

Kuivapainoanalyysien perusteella mikrolevien kasvattaminen oli tehokkainta kasvatuksissa, joissa oli käytetty kuhan lietteellä rikastettua kuhan kasvatusaltaan vettä. Mikrolevien kasvu oli tehokasta myös kasvatuksissa, joissa oli käytetty kissakalan lietteellä rikastettua kissakalan kasvatusaltaan vettä. Viimeiseksi mainituissa kasvatuksissa ravinteiden kokonaiskulutus oli tehokkainta verrattuna muihin kasvatuksiin. Näitä kasvatusalustoja kannattaa hyödyntää jatkossakin mikrolevien kasvattamisessa. Levät kasvoivat lietteellä rikastetuissa kasvatuksissa paremmin kuin kasvatuksissa, joissa ei ollut lietettä.

Kasvatuksissa biomassan tuotto oli vähäistä kasvualustoissa, joissa oli käytetty ainoastaan kissakalan tai kuhan kasvatusaltaan vettä. Tulokset osoittavat, että ilman lietteen lisäämistä levien biomassan tuotto on vähäistä, ja mikäli leväbiomassaa halutaan hyödyntää, on lietettä lisättävä biomassasaannon parantamiseksi.

Optisen tiheyden mittaaminen osoittautui helpoksi ja tehokkaaksi, mutta ei välttämättä tarpeeksi tarkaksi menetelmäksi, mikäli tarvitaan tarkkoja kuivapainotuloksia. Sen avulla on kuitenkin mahdollista seurata mikrolevien kasvua ja selvittää, milloin kasvatusten stationäärivaihe alkaa. Menetelmä on hyödyllinen ja sitä kannattaa hyödyntää erityisesti silloin, kun ei tarvita tarkkoja kuivapainotuloksia. Tämän avulla mittauksia ja kokeen etenemistä voidaan nopeuttaa huomattavasti, sillä pelkästään tässä kokeessa yhden päivän näytteiden optisen tiheyden mittauksiin kului aikaa noin 20 minuuttia, kun taas kuivapainoanalyysissä kului useampi tunti.

Kalan kasvattamon kannattaa hyödyntää mikroleviä siellä syntyvän jäteveden puhdistamisessa. Lisäksi jatkossa voitaisiin tutkia, voidaanko syntyvästä biomassasta valmistaa kalojen ravinnoksi soveltuvaa rehua, ja jos voidaan, niin onko se kannattavaa. Jatkotutkimuksissa kannattaa tarkastella muutenkin koko prosessista aiheutuvia kustannuksia.

8 YHTEENVETO

Kasvatuskokeen tarkoituksena oli selvittää, soveltuvatko kalankasvattamon vedet mikrolevien kasvatukseen, ja voidaanko mikroleviä hyödyntää kalankasvattamon jätevesien puhdistamisessa. Kokeen yhteydessä verrattiin kuivapainomäärityksestä ja optisen tiheyden mittaamisesta saatuja tuloksia keskenään, sekä pohdittiin, voitaisiinko kuivapainoanalyysit korvata optisen tiheyden mittauksilla. Työssä esiteltiin myös yleisesti mikroleviä (erityisesti kokeessa käytettyjä lajeja), niiden kasvatustekniikoita sekä muutaman esimerkin avulla sitä, kuinka niitä voidaan hyödyntää esimerkiksi jäteveden puhdistuksessa sekä ravitsemuksessa.

Levien kasvussa oli melko suuria eroja eri kasvatusalustojen välillä, mikä todennäköisesti johtui ravinnepitoisuuksien eroista. Tehokkainta levien biomassan kasvu oli kasvatuksissa, joissa oli käytetty kuhan kasvatusalustaan vettä, jota oli rikastettu kuhan lietteellä. Sen sijaan kasvatusalustoissa, joissa oli käytetty ainoastaan kissakalan kasvatusalustaan vettä, tehdyt kasvatukset saavuttivat nopeimmin stationäärivaiheen, mutta levien biomassa jäi pienimmäksi. Myös kuhan kasvatusalustaan vesissä tehdyissä kasvatuksissa mikrolevien biomassa oli pieni. Optisen tiheyden mittaaminen oli helppoa ja nopeaa, joten menetelmää kannattaa hyödyntää jatkossa levien kasvun seurannassa, erityisesti silloin, kun ei tarvita tarkkoja kuivapainoarvoja.

Kokeen aikana otettiin myös ravinnanäytteet, joista mitattiin: kokonaistyppi-, kokonaisfosfori-, ammoniumtyppi- ja ortofosfaattipitoisuudet sekä kemiallinen hapenkulutus (COD). Ravinteiden kokonaiskulutus oli tehokkainta kasvatuksissa, joissa kasvualustana oli käytetty kissakalan lietteellä rikastettua kissakalan kasvatusalustaan vettä. Levät olisivat saattaneet kasvaa vielä paremmin, jos olisi käytetty enemmän lietettä.

Työn aikana selvisi, että mikroleviä voidaan hyödyntää kalankasvattamon jäteveden puhdistuksessa. Tämän lisäksi jatkossa voitaisiin tutkia, voidaanko mikroleviä hyödyntää esimerkiksi kalojen ravintona käytettävän rehun tuotannossa. Tässä tulee kuitenkin pohtia ensin prosessin taloudel-

lista kannattavuutta, sekä tarkastella muita prosessista aiheutuvia kustannuksia.

LÄHTEET

Painetut lähteet:

Aittomäki, E., Eerikäinen, T., Leisola, M., Ojamo, H., Suominen, I. & Weymarn, N. 2002. Bioprosessitekniikka. Porvoo: WS Bookwell Oy.

Antolli, P. & Liu, Z. 2012. Bioreactors Design, Properties and Applications. New York: Nova Science Publishers.

Bruun, J., Leppänen, J., Rantajärvi, E. & Salojärvi, J. 2012. Meriympäristön nykytilan arvio [viitattu 27.3.2017]. Saatavissa: file:///C:/Users/uusi/Downloads/4.%20Meriymp%C3%A4rist%C3%B6n%20nykytilan%20arvio.%20Merenpohjan%20ja%20vesipatsaan%20eli%C3%B6yhteis%C3%B6t.pdf

Happonen, P., Holopainen, M., Sotkas, P., Tenhunen, A., Tihtarinen-Ulmanen, M. & Venäläinen, J. 2008. BIOS1 Eliömaailma. Uudistettu painos. Helsinki: WSOY Oppimateriaalit Oy.

Hatakka, J., Saari, H., Sirviö, J. & Viiri, J. 2013. Physica 3 Aallot. Uudistettu painos. Helsinki: Sanoma Pro Oy.

Hatakka, J., Saari, H., Sirviö, J., Viiri, J. & Yrjänäinen, S. 2009. Physica 8 Aine ja säteily. Helsinki: WSOY oppimateriaalit Oy.

Lahti, K. & Rönkä, A. 2006. Biologia Ympäristöekologia. Helsinki: WSOY Oppimateriaalit Oy.

Rikkinen, J. 1999. Leviä, sieniä ja leväsieniä. Helsinki: Yliopistopaino.

Tikkanen, T. 1986. Kasviplanktonopas. Forssa: Forssan kirjapaino Oy.

Elektroniset lähteet:

Adarme-Vega, T., Lim, D., Schenk, P., Timmins, M., Vernen, F. & Yan, L. 2012. Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable

omega-3 fatty acid production. PMC [viitattu 30.8.2017]. Saatavissa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3465194/>

All About Algae.com. 2017a. Algae Cultivation [viitattu 10.3.2017]. Saatavissa: <http://allaboutalgae.com/algae-cultivation/>

All About Algae.com. 2017b. Open Pond Systems [viitattu 5.9.2017]. Saatavissa: <http://allaboutalgae.com/open-pond/>

Ando, Y., Furuse, M., Kamiya, N., Komaki, H., Niwa, Y., Tanaka, Y. & Yamashita, M. The Truth About Broken Cell Wall Chlorella [viitattu 17.3.2018]. Saatavissa: <https://chlorelle.wordpress.com/2011/04/13/the-truth-about-broken-cell-wall-chlorella/>

Antioksidantit.com. 2016. Beetakaroteeni [viitattu 16.3.2018]. Saatavissa: <http://www.antioksidantit.com/beetakaroteeni/>

Aoyagi, H., Uchiyama, H. & Ugwu, C. 2007. Photobioreactors for mass cultivation of algae. ScienceDirect [viitattu 15.2.2018]. Saatavissa: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852407001368#ae-p-section-id9>

Arashiro, L. 2016. Microalgae as a sustainable alternative for wastewater treatment. IWA [viitattu 7.2.2018]. Saatavissa: <http://www.iwa-network.org/microalgae-sustainable-alternative-wastewater-treatment/>

Arp, D., Klotz, M. & Ward, B. 2011. Nitrification. EBSCOhost [viitattu 15.2.2018]. Saatavissa: <http://web.b.ebscohost.com/aineistot.lamk.fi/ehost/ebookviewer/ebook/bmxlYmtfXzEwMjAyOTRfX0FO0?sid=996178c5-771d-4503-8c8f-c87325580279@sessionmgr104&vid=0&format=EB&rid=1>

Biodiesel from Algae. 2018. Raceway Pond [viitattu 4.2.2018]. Saatavissa: <https://biodieselfromalgae2.weebly.com/production-processes.html>

Block, R., Mousa, S. & Swanson, D. 2012. Omega-3 Fatty Acids EPA and DHA: Health Benefits Throughout Life. *Advances in Nutrition* [viitattu 30.8.2017]. Saatavissa: <http://advances.nutrition.org/content/3/1/1.full>

Borén, E. 2015. Solun rakenne. Otavan Opisto [viitattu 6.2.2018]. Saatavissa:
http://opinnot.internetix.fi/fi/muikku2materiaalit/lukio/bi/bi2/04_solun_rakenne/01_solun_rakenne?C:D=hRyz.hQ2o

CCAP. 2018. EG:JM [viitattu 15.3.2018]. Saatavissa:
https://www.ccap.ac.uk/media/documents/EG_JM.pdf

Clewer Oy, 2017. Clewer clean water [viitattu 14.5.2017]. Saatavissa:
http://www.clewer.com/fi/wp-content/uploads/sites/2/2015/08/clewer_esite_800S-1300S.pdf

Dumur, D., Filali, R., Lopes, F., Pareau, D. & Tebbani, S. 2014. CO₂ Biofixation by Microalgae. Wiley, E-kirja [viitattu 16.3.2017]. Saatavissa:
<https://ebookcentral-proquest-com.aineistot.lamk.fi/lib/lamk-ebooks/reader.action?docID=1734308>

Flores, C. & Stange, C. 2012. Carotenoids and Photosynthesis - Regulation of Carotenoid Biosynthesis by Photoreceptors. E-kirja [viitattu 12.2.2018]. Saatavissa: <https://www.intechopen.com/books/advances-in-photosynthesis-fundamental-aspects/carotenoids-and-photosynthesis-regulation-of-carotenoid-biosynthesis-by-photoreceptors>

Flynn, K., Greenwell, H., Laurens, L., Lovitt, R. & Shields, R. 2009. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *JOURNAL OF THE ROYAL SOCIETY INTERFACE* [viitattu 4.2.2018]. Saatavissa:
<http://rsif.royalsocietypublishing.org/content/7/46/703>

Guiry, M. 1867. *Selenastrum* Reinsch. AlgaeBase [viitattu 7.10.2016]. Saatavissa:
http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=P28cfe22a37ba0d7b&-session=abv4:AC1F07411896c1FDF0XLEF0380EA

Guiry, M. 2018. *Euglena gracilis* var. *saccharophila* Pringsheim. Alga-eBase [viitattu 2.2.2018]. Saatavissa: http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=e65d3c2865daadf12

HACH. 2017a. Ammonium cuvette test 2.0-47.0 mg/L NH₄-N [viitattu 4.2.2018]. Saatavissa: <https://uk.hach.com/ammonium-cuvette-test-2-0-47-0-mg-l-nh-sub-4-sub-n/product?id=26370269011>

HACH. 2017b. Ammonium cuvette test 0.015-2.0 mg/L NH₄-N [viitattu 4.2.2018]. Saatavissa: <https://uk.hach.com/ammonium-cuvette-test-0-015-2-0-mg-l-nh-sub-4-sub-n/product-downloads?id=26370269012>

HACH. 2017c. COD cuvette test 50-300 mg/L O₂ [viitattu 4.2.2018]. Saatavissa: <https://uk.hach.com/cod-cuvette-test-50-300-mg-l-o-sub-2-sub/product?id=26370291511>

HACH. 2017d. Laton Total Nitrogen cuvette test 20-100 mg/L TN_b [viitattu 4.2.2018]. Saatavissa: <https://uk.hach.com/laton-total-nitrogen-cuvette-test-20-100-mg-l-tn-sub-b-sub/product?id=26370291437>

HACH. 2017e. Laton Total Nitrogen cuvette test 1-16 mg/L TN_b [viitattu 4.2.2018]. Saatavissa: <https://uk.hach.com/laton-total-nitrogen-cuvette-test-1-16-mg-l-tn-sub-b-sub/product?id=26370268941>

HACH. 2017f. Phosphate Ortho/Total cuvette test 0.5-5.0 mg/L PO₄-P [viitattu 4.2.2018]. Saatavissa: <https://uk.hach.com/phosphate-ortho-total-cuvette-test-0-5-5-0-mg-l-po-sub-4-sub-p/product?id=26370291447>

HACH. 2017g. Phosphate (Ortho/Total) cuvette test 0.05-1.5 mg/L PO₄-P [viitattu 4.2.2018]. Saatavissa: <https://uk.hach.com/phosphate-ortho-total-cuvette-test-0-05-1-5-mg-l-po-sub-4-sub-p/product?id=26370291448>

Hammond, B. 2013. Carotenoids. *Advances in Nutrition* [viitattu 30.8.2017]. Saatavissa: <http://advances.nutrition.org/content/4/4/474.full?sid=a558d373-8d38-4491-bc63-9d8f68ec93f9>

- Hee-Jeong, C., Prabuddha, L. & Seung-Mok, L. 2015. A mini review: photobioreactors for large scale algal cultivation. ProQuest [viitattu 5.9.2017]. Saatavissa: <https://search-proquest-com.aineistot.lamk.fi/docview/1702200396>
- HSY. 2017. Puhdistamme jätevedet tehokkaasti [viitattu 11.10.2017]. Saatavissa: <https://www.hsy.fi/fi/asiantuntijalle/vesihuolto/jatevedenpuhdistus/Sivut/default.aspx>
- Kemira. 2017. BOD:n ja COD:n poisto [viitattu 11.9.2017]. Saatavissa: <http://www.kemira.com/fi/toimialat-sovellukset/sivut/bodcodn-poisto.aspx>
- Korvonen, P. 2017. VS: Kalankasvatuskonseptin kuvaus. Sähköpostiviesti. Vastaanottaja Eskola, R. Lähetetty 9.2.2017.
- Kunga, L. & Vanags, J. 2017. Cultivation of microalgae in shake flasks and laboratory scale photobioreactor [viitattu 6.9.2017]. Saatavissa: http://bioreactors.net/wp-content/uploads/2015/10/Photobioreactor_applicationENG.pdf
- Levarbio 2016. Hanke [viitattu 27.10.2016]. Saatavissa: <http://levarbio-ymparistotieteet.com/Hanke.php>
- Lewis, L.& McCourt, R. 2004. Green algae and the origin of land plants. American Journal of Botany. Nro 10/2004 [viitattu 6.2.2018]. Saatavissa: <http://www.amjbot.org/content/91/10/1535.long>
- Ojamäe, K. 2011. Growth physiology and photosynthetic performance of green microalgae mass culture grown in a thin-layer cascade. ResearchGate. Master's Thesis [viitattu 4.2.2018]. Saatavissa: https://www.researchgate.net/publication/266211232_Growth_physiology_and_photosynthetic_performance_of_green_microalgae_mass_culture_grown_in_a_thin-layer_cascade
- Protist Information Server. 2018a. *Euglena gracilis* [viitattu 4.2.2018]. Saatavissa:

http://protist.i.hosei.ac.jp/pdb/images/mastigophora/euglena/gracilis/ltu-14/gracilis_2c.html

Protist Information Server. 2018b. *Selenastrum gracile* [viitattu 4.2.2018].

Saatavissa:

<http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/Chlorophyta/Selenastrum/gracile/gracile3.html>

Pulkkinen, M. 2016. Tulevaisuuden valkuaisrehu: levää lehmille.

MAASEUDUN TULEVAISUUS [viitattu 12.2.2018]. Saatavissa:

<http://www.maaseuduntulevaisuus.fi/suomalainen-maaseutu/tulevaisuuden-valkuaisrehu-lev%C3%A4%C3%A4-lehmille-1.144714>

Szalay, J. 2015. What Are Carotenoids? Live Science [viitattu 4.2.2018].

Saatavissa: <https://www.livescience.com/52487-carotenoids.html>

Schwab, U. 2016. Omega-rasvahapot. DUODECIM TERVEYSKIRJASTO [viitattu 5.9.2017]. Saatavissa:

https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00900#s3

SOLIDWATER. 2017. Flotaatiolaitteet [viitattu: 7.6.2017]. Saatavissa:

<http://www.solidwater.fi/tuotteet/flotaatiolaitteet/>

SOLUNETTI. 2006a. Kasvisolun rakenne [viitattu 14.5.2017]. Saatavissa:

http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/kasvisolun_rakenne/2/

SOLUNETTI. 2006b. Mikrobipopulaation kasvuvaiheet [viitattu 31.8.2017].

Saatavissa:

http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/mikrobipopulation_kasvuvaiheet/3/

SOLUNETTI. 2006c. Spektrofotometri [viitattu 31.8.2017]. Saatavissa:

<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/spektrofotometri/>

Suomen YK-liitto. 2017. Vesi [viitattu 14.1.2017]. Saatavissa:

<http://www.ykliitto.fi/yk70v/ekologinen/vesi>

Terve.fi. 2017. Omega-3-rasvahapot masennuksen ehkäisyn ja hoidon tukena [viitattu 30.8.2017]. Saatavissa: <http://www.terve.fi/aivot-mieli-ja-muisti/omega-3-rasvahapot-masennuksen-ehkaisyn-ja-hoidon-tukena>

Vaasan yliopisto. 2016. Levästä energiaa ja ratkaisuja jäteveden puhdistukseen [viitattu 14.2.2018]. Saatavissa: <http://www.uva.fi/fi/news/transalgae/>

VitaeLab. 2017. Omega-3-rasvahapot [viitattu 30.8.2017]. Saatavissa: <https://www.vitaelab.fi/Terveystietoa/Omega-3>

Voutilainen, A. 2010. Omega-3-rasvahappojen merkitys korostuu raskauden aikana. terve.fi [viitattu 30.8.2017]. Saatavissa: <http://www.terve.fi/raskaus-ja-odotus/omega-3-rasvahappojen-merkitys-korostuu-raskauden-aikana>

LIITTEET

LIITE 1. EG-kasvatusalustan ohje

LIITE 2. Käytetyt pikatestit ja niiden pitoisuusvälit

LIITE 1. EG-kasvatusalustan ohje (CCAP 2018.)

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) CaCl₂ stock solution:

CaCl₂ 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

CaCl₂ 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

CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa), Dunstaffnage Marine Laboratory,

Oban, Argyll, PA37 1QA, UK

Tel: +44 (0)1631 559000 Fax: +44 (0)1631 559001 Email: ccap@sams.ac.uk Web: www.ccap.ac.uk

JM (Jaworski's Medium)

Freshwater algae

Stocks per 200 ml

(1) Ca(NO₃)₂·4H₂O 4.0 g

(2) KH₂PO₄ 2.48 g

(3) MgSO₄·7H₂O 10.0 g

(4) NaHCO₃ 3.18 g

(5) EDTAFeNa 0.45 g

EDTANa₂ 0.45 g

(6) H₃BO₃ 0.496 g

MnCl₂·4H₂O 0.278 g

(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 0.20 g

(7) Cyanocobalamin 0.008 g

Thiamine HCl 0.008 g

Biotin 0.008 g

(8) NaNO₃ 16.0 g

(9) Na₂HPO₄·12H₂O 7.2 g

Medium per litre

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

CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa), Dunstaffnage Marine Laboratory,

Oban, Argyll, PA37 1QA, UK

Tel: +44 (0)1631 559000 Fax: +44 (0)1631 559001 Email: ccap@sams.ac.uk Web: www.ccap.ac.uk

LIITE 2. Käytetyt pikatestit ja niiden pitoisuusvälit (HACH 2017a; HACH 2017b; HACH 2017c; HACH 2017d; HACH 2017e; HACH 2017f; HACH 2017g.)

Ravinneanalyysi	Käytetty pikatesti	Pitoisuusväli	Sisältääkö poltto-osuuden
Kokonaistyyppi	Laton Total Nitrogen cuvette test (LCK 338)	20-100 mg/L TN _b	Kyllä
	Laton Total Nitrogen cuvette test (LCK 138)	1-16 mg/L TN _b	
Kokonaisfosfori	Phosphate Ortho/Total cuvette test (LCK 348)	0.5-5.0 mg/L PO ₄ -P	Kyllä
	Phosphate (Ortho/Total) cuvette test (LCK 349)	0.05-1.5 mg/L PO ₄ -P	
Ammoniumtyppi	Ammonium cuvette test (LCK 303)	2.0-47.0 mg/L NH ₄ -N	Ei
	Ammonium cuvette test (LCK 304)	0.015-2.0 mg/L NH ₄ -N	
Ortofosfaatti	Phosphate Ortho/Total cuvette test (LCK 348)	0.5-5.0 mg/L PO ₄ -P	Ei
	Phosphate (Ortho/Total) cuvette test (LCK 349)	0.05-1.5 mg/L PO ₄ -P	
Kemiallinen hapenkulutus (COD)	COD cuvette test (LCK 614)	50-300 mg/L O ₂	Kyllä