

SELENASTRUM-MIKROLEVÄN
KASVATUS KAHDENSA ERI
JÄTEJAKEESSA

LAHDEN
AMMATTIKORKEAKOULU
Tekniikan ala
Ympäristöteknologia
Ympäristöbiotekniikka
Opinnäytetyö
Syksy 2013
Markku Viitanen

Lahden ammattikorkeakoulu
Ympäristötekniikan koulutusohjelma

VIITANEN, MARKKU:

Selenastrum-mikrolevän kasvatusta
kahdessa eri jätelähteessä

Ympäristöbiotekniikan opinnäytetyö, 57 sivua, 7 liitesivua

Syyskuu 2013

TIIVISTELMÄ

Bioperäisistä polttoaineista etsitään ratkaisuja kasvavaan energiatarpeeseen. Näistä mikrolevää pidetään yhtenä lupaavana vaihtoehtona bioenergiatuotantoon. Mikrolevän kasvatuksessa saannot olisivat huomattavasti muita biopolttaineen lähteitä suurempia pinta-alaa kohden, eikä sen kasvatusta kilpailisi ruoantuotannon kanssa. Kannattavuuden vahvistamiseksi mikrolevää on yritetty kasvattaa jätevedessä.

ALDIGA-projekti on tutkinut mahdollisuuksia toteuttaa teknillis-taloudellisesti jätevesipohjaista kasvatusta yhdistettyä biodieselin ja biokaasun tuotantoa varten. Tämä opinnäytetyö täydentää projektin aiempia tutkimuksia. Sen tarkoituksena on tarkastella *Selenastrum*-suvun mikrolevän biomassantuotantoa ja ravinteiden talteenottoa suljetussa järjestelmässä, kahdessa erilähteisessä jätevedessä. Tuloksia on verrattu kirjallisuuteen ja lainsäädäntöön. Levä ja jätevedet valittiin projektin aiempien tulosten perusteella. Jätevesistä tarkasteltiin typpeä ja fosforia sekä kemiallista hapenkulutusta.

Biomassan tuottonopeus oli kompostin puristevedessä 0,067 g/l/vrk ja biokaasulaitoksen rejektivedessä 0,072 g/l/vrk. Ravinteiden kulutus oli puristevedessä rejektivettä nopeampaa. Yhteensä puristevedessä poistumat olivat 83 % kokonaistyppeistä, 69 % kokonaisfosforista ja 80 % kemiallisesta hapenkulutuksesta. Rejektivedestä vastaavat luvut olivat 86 %, 98 % ja 83 %. Yhdyskuntajätevesien lakisääteinen ravinteidenpoistoteho saavutettiin puristevedessä fosforia lukuun ottamatta kuudessa vuorokaudessa. Rejektivedessä nämä poistumat saavutettiin 17 vuorokaudessa.

Biomassan kasvu oli kirjallisuuteen verrattuna kohtuullista. Tutkijat ovat raportoineet samansuuruisia, kolme kertaa pienempää ja kymmenkertaista biomassan kasvua. Ravinnehäviö sen sijaan oli samaa luokkaa kuin suomalaisissa jätevedenpuhdistamoissa. Tällä on merkitystä etenkin typenpoiston osalta, mikä nykyisissä puhdistamoissa ei välttämättä saavuta vaadittua poistotehoa.

Asiasanat: *Selenastrum*, mikrolevä, bioenergia, puristevesi, rejektivesi, jätevedenpuhdistus, ALDIGA, fotobioreaktori

Lahti University of Applied Sciences
Degree Programme in Environmental Technology

VIITANEN, MARKKU:

Cultivation of the microalga *Selenastrum*
in two waste fractions

Bachelor's Thesis in Environmental Biotechnology, 57 pages, 7 pages of
appendices

Autumn 2013

ABSTRACT

The utilization of renewable energy sources has gained increasing interest with the increasing energy crisis. Microalgae are seen as one potential solution for the problems of sufficient energy production. They have a greater areal biomass production rate than other sources of bioenergy while they do not compete with agricultural area. There have also been some studies on algal growth prospects in wastewater for increased sustainability.

The ALDIGA project has studied means to implement wastewater-based microalgal production, aiming for combined biodiesel and biogas production in a technologically and economically sustainable way. This Bachelor's Thesis complements these studies. The objective was to conduct two growth experiments of microalga of the genus *Selenastrum* in two waste fractions of differing origins but of similar nutritional profile. One of the waste fractions was press water from municipal organic waste and the other was reject water from a biogas plant.

The biomass production and the nutrient removal rate of the alga in the diluted wastewaters were observed. The results were compared with data available in literature as well as the Finnish legislation concerning municipal wastewater treatment. Nutrient removal measurements focused on the removal rate of total nitrogen and total phosphorus, and the reduction in chemical oxygen demand.

The average growth rate was 0.067 g/l/d for the press water and 0.072 g/l/d for the reject water. The nutrient removal for the press water was 83 % of total nitrogen, 69 % of total phosphorus and 80 % of chemical oxygen demand. The total nutrient reductions for reject water were, respectively, 86 %, 98 % and 83 %.

The biomass growth rate was on a moderate level. There have been reports of biomass gains that are similar, three times lower and even ten times higher than the gains in this study. The nutrient reduction rates were more positive in general and look promising especially for the removal of nitrogen, which exceeded that of most treatment plants.

Key words: *Selenastrum*, microalgae, bioenergy, wastewater treatment, press water, reject water, ALDIGA, photobioreactor

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	1
2	MIKROLEVIEN KASVU JA KASVATUSOLOSUHTEET	3
2.1	Kasvuun vaikuttavat tekijät	4
2.2	Ravinteiden otto ympäristöstä	7
2.3	Kasvatusjärjestelmät	8
2.4	Kannattavuustekijöistä	11
3	LEVÄ ENERGIANTUOTANNOSSA	14
3.1	Bioenergiaa mikrolevästä	14
3.2	Erilaisista bioenergiamuodoista	16
4	MIKROLEVÄN HYÖDYNTÄMINEN JÄTEVEDENPUHDISTUKSESSA	18
4.1	Jätevedenpuhdistuksen lainsäädäntö Suomessa	18
4.2	Jätevedenpuhdistus Suomessa	20
5	MIKROLEVÄN KASVATUSKOKEET	23
5.1	<i>Selenastrum</i> -mikrolevä	23
5.2	Tutkimuksessa käytetyt jätejakeet	23
5.3	Kasvatusliuokset	24
5.4	Esikasvatus	25
5.5	Kasvatus fotobioreaktorissa	26
5.6	Näytteenotto ja analyysit	29
6	TULOKSET	32
7	TULOSTEN TARKASTELU	38
8	YHTEENVETO	48
	LÄHTEET	49
	LIITTEET	58

1 JOHDANTO

Mikrolevää on hyödynnetty jo vuosikymmenten ajan. Sen käyttökohteet ovat vaihdelleet tarpeen ja uusien löytöjen mukaan. Ravintona levää on käytetty jo vuosituhansia, mutta viime vuosisadan puolivälissä huoli ravinnosta saadun proteiinin riittämättömyydelle synnytti tarpeen laajamittaisemmalle tuotannolle. Seuranneiden kahden vuosikymmenen aikana kiinnostuttiin levien kyvystä hapentuotantoon, jätevedenpuhdistukseen sekä mahdollisuuteen mädättää leväbiomassaa metaanintuotannossa. (Spolaore, Joannis-Cassan, Duran, Isambert 2006, 87.) Fossiilisten polttoaineiden rajallisuuden myötä kiinnostuksen kohteeksi on myös noussut mahdollisuus biopolttoainetuotantoon.

Mikrolevien merkittävänä etuna voidaan pitää saman leväbiomassan hyötykäyttömahdollisuuksia samanaikaisesti useassa kohteessa. Mikrolevien etuna oleva monikäyttöisyys luo kuitenkin omat haasteensa. Levälajien huomattava määrä ja niiden jatkuva enentyminen sekä lajien erilaiset ominaisuudet vaativat eri lajeille tutkimustietoa niiden oikeanlaiseksi hyödyntämiseksi. Levälajeja arvioidaan olevan yli 50 000, joista noin 30 000 on tutkittu (Richmond 2004, Matan, Martinsin & Caetanon 2010, 219 mukaan). Ympäri maailman on kerätty yli tuhat levälajia käsittäviä leväkokoelmia, esimerkiksi Texasin yliopisto Yhdysvalloissa ja Goettingenin yliopisto Saksassa (Mata ym. 2010, 219).

Mikrolevä toimii ideaalitulanteessa sekä yhdistettynä energiantuotantomuotona että keinona käsitellä jätevesiä. Jätevedet sisältävät levälle hyödyntämiskelpoisia aineita, joten niillä voidaan korvata erillisiä ravinnelisiä hyödyntämällä joka tapauksessa syntyviä jätevirtoja. Vähäisempi tarve ulkoisille ravinnelähteille tekisi levästä ekologisen keinon bioenergiantuotannolle. Levä ei myöskään kilpailisi ruuantuotantoon tarkoitettusta pinta-alasta tai ravinteista.

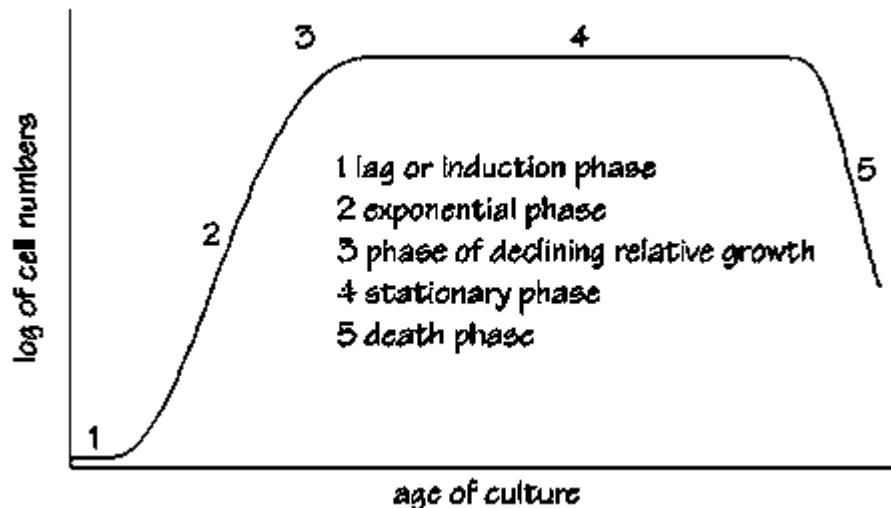
Tässä opinnäytetyössä kasvatettiin *Selenastrum* sp. -mikrolevää kahdessa erityyppisessä jätejakeessa (biojätteen puristevesi ja biokaasuprosessin rejektivesi). Kasvatuksissa tarkasteltiin biomassan tuottonopeutta ja levän kykyä poistaa jätevesistä ravinteita. Tuloksia vertailtiin kirjallisuuteen sekä yhdyskuntajätevesiä koskeviin puhdistusvaatimuksiin Suomessa. Opinnäytetyön

tutkimus toteutettiin lokakuun 2012 ja helmikuun 2013 välisenä aikana Helsingin yliopiston ympäristötieteiden laitoksen tiloissa Lahdessa. Opinnäytetyö tehtiin osana ALDIGA- ja ALGIND -projekteja, joita rahoitti Teknologian ja innovaatioiden kehittämiskeskus Tekes.

2 MIKROLEVIEN KASVU JA KASVATUSOLOSUHTEET

Mikrobiologisen populaation kasvuvaiheet on jaoteltu kirjallisuudessa neljään tai viiteen vaiheeseen. Ensimmäinen vaihe on nimeltään viive- eli lag-vaihe, jossa levä sopeutuu uuteen kasvuympäristöönsä. Tämän vaiheen pituus vaihtelee sen mukaan, missä määrin kyseessä oleva kasvuympäristö poikkeaa aikaisemmasta ympäristöstä. (FAO 1996)

Toisessa vaiheessa sopeutuminen on tapahtunut. Tällöin solut jakautuvat kiihtyvällä tahdilla ja vaihetta kutsutaankin eksponentiaalisen kasvun vaiheeksi. Kolmas vaihe on se kohta, jossa jonkin ravinteen ehtyminen alkaa rajoittaa kasvua, mikä johtaa neljanteen, stationäärivaiheeseen. Viidennessä vaiheessa ympäristön ravinteet on käytetty loppuun ja solujen määrä alkaa laskea. (FAO 1996)



KUVIO 1. Viiteen vaiheeseen jaoteltu, leväpanokselle tyypillinen mikrobiopopulaation kasvukäyrä (FAO 1996, kuvio 2.3)

Varsinaiseen kasvatukseen vaikuttavat useat tekijät. Nämä voidaan jaotella kolmeen osaan: fysio-kemiallisiin (abioottisiin) tekijöihin, kuten valo, lämpötila ja pH, bioottisiin tekijöihin, kuten lajien väliseen kilpailuun tai patogeenien läsnäoloon sekä toiminnallisiin tekijöihin, kuten kasvatusalustan sekoitustapa ja kasvualustan laimennos (Becker 1988, Larsdotterin 2006, 32 mukaan). Jokaisella tekijällä on vaikutuksensa, mutta tärkeimpiä kasvuun vaikuttavia parametreja ovat

saatavissa olevien ravinteiden laatu ja määrä, valo, pH, lämpötila, sekoitus sekä kasvatusalustan suolapitoisuus (FAO 1996).

Tärkeimmät mikrolevän hyödyntämät ravinteet ovat typpi, fosfori, rauta ja rikki (Hannon, Gimpel, Tran, Rasala & Mayfield 2010, 4). Typen, fosforin, raudan ja erinäisten hivenaineiden merkitystä tärkeimpinä ravinteina korostavat myös Demirbas & Demirbas (2011, 166).

2.1 Kasvuun vaikuttavat tekijät

Ravinteet

Hiili

Lisääntymiseen ja kasvuun tarvitaan hiiltä, jonka lähteenä mikrolevillä on yleensä hiilidioksidi (CO₂) tai bikarbonaattisuola (HCO₃) (Oswald 1988, Borowitzka 1998, Larsdotterin 2006, 32 mukaan). On arvioitu, että mikrolevä tarvitsee 183 milligrammaa hiilidioksidia tuottaakseen 100 milligrammaa biomassaa (Goswami, Kalita & Kalita 2012, 500). Bikarbonaattisuoloissa 62,3 mg/l on havaittu vastaavan 1000 mg/l hiilidioksidia (Jeong ym. 2003, Goswamin ym. 2012, 504 mukaan). Levä käyttää hiiltä fotosynteesin aikana, missä hiilestä ja vedestä muodostetaan sokeria ja happea valon toimiessa energianlähteenä. Energian- ja hiilenlähteet vaihtelevat organismeittain, samoin kasvualustan pH vaikuttaa hiilenlähteen hyödynnettävyyteen ja muotoon, jossa se esiintyy. (Larsdotter 2006, 32-33.)

Hiilidioksidin pitoisuus ilmakehässä on noin 0,039 % (Wikipedia 2013b). Sen suositelluksi pitoisuudeksi levän reaktorikasvatuksessa on kuitenkin esitetty 0,1-20 %, minkä vuoksi voi olla tarvetta lisäsyöttää hiilidioksidia levälle (Oilgae 2010).

Typpi

Typpi on yksi levän makroravinteista, jonka osuus leväsolun massasta voi olla yli 10 % (Calvin & Taylor 1989, Larsdotterin 2006, 33 mukaan). Sitä tarvitaan nukleiinihapon ja proteiinien valmistusaineeksi (LennTech BV 2013). Jätevesissä

esiintyvä tyyppi on yleensä ruuansulatustuotteiden aineenvaihduntareaktioista peräisin (Abdel-Raouf, Al-Homaidan & Ibraheem 2012, 263). Mikrolevät käyttävät tehokkaasti typpeä ammoniumina ja, ellei sitä ole saatavilla, nitraattina. Näiden lisäksi levät voivat tarvittaessa hyödyntää nitriittiä ja ureaa; eräät syanobakteerit kykenevät jopa hyödyntämään kaasumuotoista typpeä. (Oliver & Ganf 2000; Bhaya, Schwartz & Grossman 2000, Larsdotterin 2006, 33 mukaan.) Näitä syanobakteereita voidaan myös hyödyntää typenlähteenä levätuotannossa (Hannon ym. 2010, 5).

Ammoniumtyppi ja nitriitti ovat liian korkeina pitoisuuksina haitallisia leville. Ammoniumtyppi esiintyy korkeassa pH:issa ammoniakkimuodossa, minkä on havaittu olevan haitallista levälle (Azov & Goldman 1982, 736-737). pH:n merkitystä kasvulle on käsitelty yksityiskohtaisemmin jäljempänä.

Fosfori

Myös fosfori kuuluu mikrolevien käyttämiin makroravinteisiin. Makeassa vedessä fosforipitoisuutta pidetään mahdollisena kasvua rajoittavana tekijänä (Nordin 1985, 13). Jäteveteen fosforia kuitenkin päätyy pesuaineista sekä maa- ja metsätaloudesta ja sitä on kutsuttu typen ohella merkittävimäksi vesistöjen rehevöitymisen aiheuttajaksi (Hämeen ELY 2011; Abdel-Raouf ym. 2012, 263). Jätevedessä fosforia on siis yleensä saatavilla levien käyttöön riittävästi. Levät eivät välttämättä reagoi saatavilla olevan fosforin ehtymiseen välittömästi johtuen niiden kyvystä varastoida fosforia polyfosfaattina (Larsdotter 2006, 33).

Levien suosima fosfaatin muoto on fosfaatti (PO_4) (Larsdotter 2006, 33). Levät tarvitsevat fosforia solujenvälisessä energiansiirrossa, nukleiinihapon valmistuksessa sekä solunjakautumisreaktioissa.

Fysiologiset ja kemialliset tekijät

Kemiallinen hapenkulutus

Kemiallisella hapenkulutuksella (KHK) voidaan selvittää orgaanisten yhdisteiden määrää vedessä hapettamalla ne hiilidioksidiksi ja mittaamalla näin syntyneen hiilidioksidin määrä. Parametri kuvaa sekä biohajoavien että -hajoamattomien

orgaanisten yhdisteiden määrää. Mittaamalla kemiallinen hapenkulutus saadaan yleensä tietoa veden laadusta ja siten sen avulla voidaan esimerkiksi määrittää jätevedenkäsittelylaitoksen puhdistuskapasiteetti. (Ellis 2004.)

pH

Kasvuliuoksen happamuus, pH, vaikuttaa levän kasvukykyyn usealla tavalla. Useimmiten leville suotuisinta on, jos pH pysyy lähellä neutraalia (Aisyah 2013). Kullekin lajille on mahdollista – ja syytä – määrittää kasvulle optimaalisin pH-alue. Tässäkin esiintyy lajikohtaisia vaihteluita siinä, millaisissa happamuuksissa kasvu on optimaalisinta; samoin sietokyvyt vaihtelevat. Esimerkiksi *Anabaena variabilis* -levälle on löydetty kasvulle optimaalinen pH-alue 8,2–8,4, ja vaikka tarpeeksi suuret arvot tekivät kasvuympäristön lopulta elinkelvottomaksi, kasvu heikkeni myös pH:n ollessa vajaan yksikön verran optimialuetta pienempi. (Fontes ym. 1987, Larsdotterin 2006, 34 mukaan.) Toisaalta *Chlorella minutissima* -mikrolevän on havaittu kasvavan hyvin pH:n ollessa 5–12 (Bhatnagar & Bhatnagar 2009, 531).

Korkeissa mikroleväpitoisuuksissa pH:lla on taipumus kasvaa. pH:n kasvu perustuu happaman hiilidioksidin sitoutumiseen fotosynteesissä (Chevalier ym. 2000, Larsdotterin 2006, 34 mukaan). pH:n kasvun haitallisuus perustuu ainakin kahteen tekijään. Yhtenä haittana Azov ja Goldman (1982, 735) nostavat esiin sen, että levät hajottavat ravintonaan käyttämäänsä ammoniumtyyppiä ammoniakiksi, joka pH:n kasvaessa muuttuu leville haitalliseksi. Toisena tekijänä korkeissa pH-arvoissa on hiilen esiintyminen hiilidioksidin sijasta karbonaattimuodossa CO₃, jota levät eivät voi hyödyntää (Borowitzka 1998, Larsdotterin 2006, 32 mukaan).

pH:n kasvun hallinta riippuu pitkälti tarkoituksesta. Jos tavoitteena on tuhota kasvatusalustan patogeeneja, riittävän suuri pH voi riittää käsittelymenetelmäksi (Aisyah 2013). Tällöin pH:ta ei tarvitse säädellä. Toisaalta yllämainitut syyt osoittavat pH:n säätelyn merkityksellisyyden silloin, kun tavoitteena on tuottaa biomassaa ja hyötykäyttää mikroleväkantaa uudelleen. Happamuutta voidaankin säädellä esimerkiksi juuri hiilidioksidin riittävän saannin varmistamisella (Larsdotter 2006, 34). Säätelyllä voidaan myös estää korkeissa pH:issa tapahtuvaa

ammoniakin haihtumista ja näin varmistaa saatavilla olevan typenlähteen pysyvyys kasvatusjärjestelmässä (Park & Craggs 2011, 1763).

Lämpötila

Myös lämpötilalla on lajikohtainen optimialueensa kasvuun. Tyypillisesti optimilämpötilat ovat 15–25 °C, mikä pätee myös matalampiin lämpötiloihin tottuneihin lajeihin. Liian korkeat ja matalat lämpötilat haittaavat kasvua. (Larsdotter 2006, 34.) On havaittu, että usein lajit sietävät jopa 15 °C optimiaan matalampia lämpötiloja, mutta jo muutaman asteen nousu optimin yläpuolelle voi haitata leväkantaa (Mata ym. 2010, 223). Liian matalasta lämpötilasta voi kuitenkin aiheutua itseään voimakkaampi riski, sillä tällöin levän toleranssi valolle heikkenee, mikä häiritsee fotosynteesiä (Larsdotter 2006, 34).

Saliniteetti

Saliniteetilla tarkoitetaan veden suolapitoisuutta, jota ilmaistaan yksiköllä g/l (Pohjois-Pohjanmaan ELY 2011). Levien sietokyvyllä muuntuville suolapitoisuuksille on vaihteleva merkitys, minkä lisäksi on eroteltava makean ja suolaisen veden levät. Pysyttäessä levien toleranssialueen sisällä erilaisilla suolapitoisuuksilla ei välttämättä ole leviin merkittävää vaikutusta (Richmond 1986, Renaudin & Parryn 1994, 348, mukaan). Korkeampi suolapitoisuus on kuitenkin yhdistetty monityydyttymättömien rasvahappojen lisääntymiseen, mitä pidetään biodieselintuotannon kannalta epäsuotuisana (Al-Hasan ym. 1990, Renaud'n & Parryn 1994, 348 mukaan). Toisaalta *Selenastrum*-suvun levän on havaittu kasvavan heikosti korkeissa suolapitoisuuksissa (Goswami ym. 2012, 506).

2.2 Ravinteiden otto ympäristöstä

Levien toiminnallinen ymmärtäminen on tärkeää suunniteltaessa ympäristöä, johon levä sijoitetaan. On esitetty, että leväsoluja ei tulisi pitää vain tuottajina ja kuluttajina, vaan tarvitaan kokonaisvaltaisempi ymmärrys levän kasvuympäristön ominaisuuksista, kasvatettavan lajin ravinnevaatimuksista ja sen biomassantuotannosta (Chen, Qiang & Kazuyuki 2000, 87-88). Yksi merkittävä

levän toimintakykyyn vaikuttava tekijä on sen tapa ottaa ympäristöstään ravinteita.

Levän tapauksessa voidaan puhua heterotrofista, autotrofista, fotoheterotrofista tai miksotrofista. Autotrofilta tarkoitetaan yhteyttäjää: se saa hiilenlähteensä ilman hiilidioksidista auringonvalon toimiessa energianlähteenä. Heterotrofi saa orgaanisesta hiilestä sekä energian- että hiilenlähteensä, kun taas fotoheterotrofi ottaa energiansa auringonvalosta, mutta tarvitsee orgaanisia yhdisteitä hiilenlähteekseen. (Chen ym. 2011, 72; Biology online 2013) Miksotrofi on organismi, joka kykenee hyödyntämään ja yhdistelemään erilaisia energian- ja hiilenlähteitä (SYKE 2012).

Levät menestyvät kannasta riippuen eri tavoin erilaisissa ympäristöissä. Levä voi suosia tiettyä tapaa energian- tai hiilensaantiin. Miksotrofinen ravinteidenhankinta on usein eliöille toissijainen energiansaantikeino, jolloin eliö on korvannut pääasiallisen energiantuotantomuotonsa muuttuneiden olosuhteiden myötä. Miksotrofisen ravinnontuotannon on kuitenkin havaittu olevan jopa tehokkaampaa hetero- tai autotrofiaan verrattuna (Burkholder, Glibert & Skelton 2008; SYKE 2012). Fototrofiaan verrattuna heterotrofisissa olosuhteissa kasvavasta *Chlorella protothecoides* -levästä on saatu jopa 40 % suurempia lipidipitoisuuksia (Xu ym. 2006, Chenin ym. 2011, 72 mukaan).

2.3 Kasvatusjärjestelmät

Kasvatusjärjestelmän valinta

Arvioitaessa tuotannon taloudellista kannattavuutta kasvatusjärjestelmän valinta on tärkein yksittäinen tekijä. Vaihtoehtoisia järjestelmiä on lukuisia, mutta ne voidaan jaotella avoimiin ja suljettuihin järjestelmiin. Käytännössä kyse on luvussa 2.1 lueteltujen tekijöiden toteuttamisesta mahdollisimman tehokkaalla tavalla teknillis-taloudellisesti.

Avoimet järjestelmät ovat tyypillisesti edullisia ja kestäviä, ja niissä on mahdollista tuottaa biomassaa suljettua järjestelmää suuremmissa mittakaavassa (Mata ym. 2010, 226). Biomassan konsentraatio on luokkaa 0,1–0,5 g/l (Iersel

ym. 2009, 11). Niiden ongelmana kuitenkin on käytettävissä olevien lajien rajallisuus, eikä niissä välttämättä ole mahdollisuutta kasvatusparametrien tehokkaaseen hallintaan (Mata ym. 2010, 226). Esimerkiksi hiilidioksidia on ilmakehässä vain 0,03–0,06 %, joten ilman avustavia toimenpiteitä sitä on käytettävissä huomattavasti vähemmän kuin mitä levät voisivat hyödyntää (Iersel ym. 2009, 4; Mata ym. 2010, 226).

Käytännössä vaikka siis avoimeen järjestelmään voidaan johtaa hiilidioksidia syöttämällä sinne ilmaa tai leville myrkyttömiä savukaasuja, niitä haihtuu luonnostaan, eivätkä levät voi siten hyödyntää niistä saatua hiilidioksidia optimaalisesti. Ilman hiilenlähteen apusyöttöä avoimien järjestelmien on oltava matalia – yleensä ne ovatkin korkeintaan 30 cm syviä (Greenwell ym. 2009, 6). Myöskään lämpötilan säätelyä ei välttämättä ole, eikä vieraslajien tai saalistajien mahdollisuutta voida poislukea (Iersel ym. 2009, 4).

Suljettu järjestelmä on kalliimpi vaihtoehto, mutta biomassan tuotannon hallittavuus on siinä merkittävä tekijä sekä kasvatusparametrien että kontaminaation osalta. Vaikka avoimet järjestelmät saattavat olla kokoluokaltaan suurempia, suljetussa järjestelmässä saadun biomassan tiheys on suurempi. Tyypillisesti tuotetun biomassan määrä on 0,5-8 g/l (Pulz 2001; Carlsson 2007, Ierselin ym. 2009, 11 mukaan). Harvestointi onkin edullisempaa suljetussa kierrossa pienempien volyyymien vuoksi. Silti nykytekniikalla toteutetuista suljetuista järjestelmistä saatavat hyödyt eivät vielä pääsääntöisesti riitä kompensoimaan niiden käyttökustannuksia. (Mata ym. 2010, 226; Iersel ym. 2009, 9) Onkin esitetty, että niiden käyttötarve voisi tulevaisuudessa olla puhdasviljelmien kasvatus (Greenwell ym. 2009, 6). Näitä lajeja voitaisiin siirrostaa avoaltauksiin laajamittaisempaa tuotantoa käynnistettäessä.

Paras kasvatusjärjestelmä?

Edellä oleva havainnollistaa, että erityyppisillä kasvatusjärjestelmillä on erilaiset edut ja haitat. On esitetty, että ratamuotoisilla altailla (raceway pond) olisi paras – ja ainutlaatuinen – soveltuvuus laajamittaiseen tuotantoon (Carvalho ym. 2006 & Chisti 2007, Ierselin ym. 2009, 9 mukaan). Tällaiset altaat on toteutettu joskus

avoimina, mutta suljettu, putkilomainen rakenne voisi ratkaista avoimille järjestelmille tyypilliset ongelmat (Iersel ym. 2009, 10; Mata ym. 2010, 227).

Laadukas kasvujärjestelmä huomioi levän valon-, hiilidioksidin- ja ravinnetarpeen mahdollisimman kustannustehokkaalla tavalla. Jos avoimessa järjestelmässä hiilidioksidintarve saattaa rajoittaa kasvua, suljetun järjestelmän suurin haaste on muiden kasvatusparametrien, esimerkiksi valon riittävän saannin varmistaminen tiheässä viljelmässä (Chen ym. 2011, 75). ALDIGA-projektin aiemmissa kasvatuksissa *Selenastrum*-mikrolevällä on havaittu, että jos suljetussa fotobioreaktorissa huolehditaan riittävästä hiilidioksidinsyötöstä, valosta tulee kasvua rajoittava tekijä (Valkonen & Viitanen 2012).

Valonsaantiin liittyy muutamia ongelmia. Valon kulkema kokonaismatka tulisi pitää mahdollisimman pienenä. Valonsaannin riittävyttä rajoittaa yhtäältä reaktorin seinämien paksuus ja valonläpäisykyky, toisaalta levämassan ajan myötä kasvava tiheys. Valonlähteen on siis katettava mahdollisimman suuri osa reaktorista. (Chen ym. 2011, 75.)

Chen ym. (2011, 75) esittävät ratkaisuna edellä mainittuihin ongelmiin LED-valaisimet. Niiden etuina luetellaan pienuus ja kevyys, lukuisimmat käynnistyskerrat sekä niiden säteily määritellyillä aallonpituuksilla, mikä tarkoittaisi pienempää energiankulutusta. Myös optista kuitua on mahdollista käyttää, sillä ne on mahdollista virittää säteilemään valoa eri aallonpituuksilla ja niitä voidaan käyttää valonlähteinä myös reaktorin sisällä. Valonlähteiden lisääminen reaktorin sisälle kasvattaisi niin avoimissa kuin suljetuissa järjestelmissä valaistun alueen osuutta.

Aiemmassa tutkimuksessaan Chen ym. (2008) kokeilivat aurinko- ja tuulivoimavusteista järjestelmää, jossa LED-valot aktivoituisivat automaattisesti auringon säteilyvoiman vähennyttyä tietyn raja-arvon alle (Chenin ym. 2011, 76 mukaan). Tällaisella tekniikalla olisi riittävän auringonvalon vyöhykkeellä periaatteessa mahdollista tuottaa energiaa nollakulutuksella. Auringonvalon hyötysuhdetta voidaan tehostaa myös vaikuttamalla reaktorin kokoon. Erilaisia reaktorityyppejä on lukuisia, mutta yhtenä ratkaisuna on esitetty pienikokoisia, rinnakkaisia reaktoreita (Posten 2009, 173).

Vielä yksi valaistuksessa huomioitava tekijä on ylikyllästymisen mahdollisuus: tietyn rajan jälkeen valosyklin ajallisen keston kasvattaminen ei enää vaikuta levän kasvukykyyn. Tämä selittyy fotosynteesin tarpeella sekä valo- että pimeäreaktioille. Jos levä altistetaan hyvin nopeille valon ja pimeän sykleille, sen kasvupotentiaalia voidaan nostaa. Kasvu tehostuu sekä verrattuna pimeäreaktioiden täyteen puuttumiseen että hitaisiin valo-pimeäreaktioihin (alle 1/s). (Posten 2009, 168.)

Hiilidioksidin saatavuuteen liittyviin haasteisiin voidaan vastata esimerkiksi tässä tutkimuksessa käytetyllä menetelmällä, missä kaasua syötetään tarpeen mukaan pH:n kasvaessa määrätyn rajan yli. Myös Posten (2009, 172) mainitsee tämän olevan käytäntö joissakin tutkimuksissa. On myös kokeiltu kaasuläpäisevää kalvoa reaktoriseinäksi, jolloin vähennettäisiin pumppaamiseen tarvittavan energian määrää.

2.4 Kannattavuustekijöistä

Levähajaisen energiantuotannon suurin haaste on sen kannattavuus (Greenwell, Laurens, Shields, Lowitt & Flynn 2009, 6-8; Iersel ym. 2009 4, 6-7). Taloudellisesti kannattavaa, laajan mittakaavan leväpohjaista biodieseltuotantoa ei vielä tiedetä olevan; riittäviä kasvunopeuksia on saavutettu ainoastaan satunnaistilanteissa hetkellisesti (Iersel ym. 2009, 10).

Jotta voitaisiin maksimoida levänkasvun hyötysuhde, on huolehdittava riittävän valon ja helposti saatavissa olevien ravinteiden olemassaolosta (Larsdotter 2006, 37; Goswami ym. 2012, 500). Lisäksi yhtenä merkittävänä, ratkaistavana ongelmana pidetään hiilidioksidin saatavuutta ja sen pitoisuuden pitämistä leväkohtaisen optimialueen sisällä (Salih 2011, 649).

Juuri ravinteiden saatavuuden vuoksi jätevedet tarjoavat arvokkaan vaihtoehdon ravinnealustaksi. Levälajin ja jäteveden yhteensopivuus on oltava tiedossa, sillä jäteveden koostumus vaikuttaa lajikohtaisesti siinä menestymiseen. Lisäksi jotkin lajit kasvavat parhaiten käsittelemättömässä jätevedessä, kun taas joidenkin lajien menestyvyys on varmistettava erilaisin esikäsittelymenetelmin. (Krishna ym. 2012, 50.)

Jäteveden ravinnealustana toimimiseen vaikuttaa sen koostumus ja ravinnesuhteet. Näin ollen on huomioitava toisaalta jätevedessä olevien ravinteiden pitoisuus sekä muut vaikuttavat tekijät, esimerkiksi pH, saliniteetti ja kiintoaineksen määrä, toisaalta levän toleranssi näille muuttujille. Esimerkiksi rejektivedet ovat runsaasta, hienojakoisen kiintoaineksen määrästä johtuen tyypillisesti hyvin tummia, jolloin valonläpäisyn heikkous ehkäisisi levän kasvua ilman esikäsittelytoimenpiteitä (Rusten & Sahu 2011, 1196). Toisaalta kunnalliseen jätevedenpuhdistamoon johdettu jätevesi voi olla huomattavasti laimeampaa (Lahti Aqua 2013b).

Jos levää käytetään tukitoimintona jätevedenpuhdistukselle, kasvuun vaikuttaa myös sen sijoituspaikka prosessissa. Puhdistuksen aikana jätevesi laimenee poistuvien tai sitoutuneiden ravinteiden myötä, joten valmiiseen prosessiin sovellettaessa voidaan hyödyntää myös sellaisia lajeja, jotka eivät pärjää raakajätevedessä sijoittamalla ne puhdistuksen loppuosioihin.

Leväkannan toleranssi erilaisille ympäristövaikutuksille sekä kasvuympäristönä toimivan jäteveden ominaisuudet ja pitoisuudet on tunnettava. On havaittu, että yksittäinen levälaji alkaa ajan myötä dominoida kasvuympäristöä, jos kasvatusympäristössä on useita levälajeja (Chen, Li, Deitz, Liu, Stevenson & Liao 2012, 130-131). Tämä voi ohjata haluttujen tulosten ennustettavuuteen myös silloin, kun haluttua lajia ei ole seulottu etukäteen; toisaalta se rajoittaa käytettävissä olevia levävaihtoehtoja. Syytä onkin huomioida, onko dominoiva kanta paras mikrolevä halutun lopputuloksen saamiseksi vai onko se vain tolerantein.

Optimitilanteessa jätevesi yksinään riittää tarjoamaan riittävän ravinnealustan levälle. Tällöin ei tarvittaisi erillisiä tukiravinteita. Mostafa ym. (2012, 61) tarkastelivat yhdeksän eri levälajin yhteensopivuutta jätevedenpuhdistuslaitoksen vedessä ja havaitsivat, että vaikka suurin osa tutkituista lajeista menestyi sterilisoidussa, ravinnelisän saaneessa jätevedessä, osassa tapauksista laji saattoi menestyä paremmin ilman näitä toimenpiteitä. Rusten ym. (2011, 1200) kasvattivat biokaasuntuotantoa varten rejektivedessä *Chlorella* sp. -suvun levää tarkoituksena kiertomuotoinen hyödyntäminen yhdistettynä jätevedenkäsittely ja

biokaasuntuotanto levän avulla. Tässä tutkimuksessa he havaitsivat, että vaikka rejektivettä oli kirkastettava ennen levänkasvatusta, laimentamista ei tarvittu. Huomionarvoista on valitun levälajin trofisuus – hetero- tai miksotrofiaan kykenevä laji ei välttämättä tarvitse ylimääräistä hiilidioksidia hiilen lähteeksi (Li ym. 2011, 10862).

Millainen kapasiteetti kasvatusjärjestelmältä vaadittaisiin taloudellisesti kannattavaan tuotantoon? Kannattavuuteen luonnollisesti vaikuttaa raakaöljyn markkinahinta, mutta on määritetty, että kannattavuus edellyttäisi biomassan määräksi yli 20 g/l. Kasvatusjärjestelmän vaatiman energiatarpeen pitäisi olla korkeintaan 50 W/m³, valmistuskustannusten taas pitäisi pysyä alle hintatason 40 €/m². (Posten 2009, 175.)

Yllä kuvatu seikat havainnollistavat levänkasvatuksessa käyttökelpoisten sovellusten monimuotoisuutta. Edellä kuvattu voidaan kiteyttää kolmeen osa-alueeseen, joiden paitsi ominaispiirteet myös keskinäiset vaikutukset on tunnettava ennen laajamittaista levänkasvatuksen toteuttamista. Ensinnäkin on tunnettava kasvatusympäristön fysikaalis-kemiallinen rakenne-, ravinne- ja muu ainesosaprofiili. Ympäristön prosessien osatekijät on tunnettava, jotta niihin voidaan valita sovellustapa leväviljelyyn. Toiseksi on mietittävä kasvatusten tarkoitus ja siitä halutut tulokset – minkätyyppisessä energiantuotannossa painopiste on, vai onko tavoite vain jäteveden puhdistaminen? On myös valittava soveltuva kasvatusjärjestelmä. Kolmanneksi, näitä tietoja soveltaen, on valittava käyttöön soveltuva levälaji. Koska levälajeilla on merkittäviä eroja kasvupotentiaalissa, koostumuksessa sekä toleranssissa eri kasvuparametreille ja niiden muutoksille, valittavien lajien ja toteutustekniikoiden määrä on runsas. Kuten opinnäytetyön alussa todettiin, levätuotannon mahdollisuudet ovat samalla myös haasteita.

3 LEVÄ ENERGIANTUOTANNOSSA

Mikrolevien käyttökelpoisuus on moniulotteista. Yleensä ensisijainen tavoite on kuitenkin biomassantuotanto, missä käyttökohte ja -tapa vaihtelevat. Mata ym. (2010, 219-220) ovat koonneet käyttökohteiksi mm. kasvihuonekaasujen vähentämisen hiilidioksidinsitomisella sekä rehevöittävien ravinteiden poiston jätevedestä levkannan kasvun yhteydessä. Lisäksi materiaalin- ja energiantuotannon kannalta levän korkeat lipidipitoisuudet mahdollistavat sen käytön biodieselintuotannossa. Lipideistä stripattua levämassaa voidaan edelleen hyötykäyttää mädätteenä, lannoitteena tai rehuna. Yhtenä esitettynä teemana etenkin tulevaisuuden kannalta tuodaan esiin myös erilaisten levälajien suotuisimpien ominaisuuksien geneettinen yhdistely.

Levästä tuotettua biomassaa voidaan käyttää bioenergiantuotannon ohella mm. vetykaasun, lääkeaineiden ja ruuan tuotantoon (Larsdotter 2006, 31). On myös esitetty, että levän avulla jätevettä voitaisiin puhdistaa ja poistaa raskasmetalleja (Abdel-Raouf ym. 2012, 263).

Moniulotteista käyttötapaa tukee mahdollisuus hyödyntää yhtä leväviljelmää usein eri tavoin. Lipideistä voidaan esteröidä biodieseliä (Campbell 2008, 3-4; Mata ym. 2010, 221), hiilihydraateista voidaan valmistaa bioetanolia ja proteiineista rehua (Campbell 2008, 4; Oilgae 2013).

3.1 Bioenergiaa mikrolevästä

Vaihtoehdot energiantuotantoon vaihtelevat lajien yksilöllisten ominaisuuksien mukaan. Demirbas & Demirbas (2011, 166) esittävät, että polttoainetuotantoon parhaat levät ovat tyypillisesti yksisoluisia viherleviä. Tällaisille leville tyypilliset ominaisuudet ovat korkea lipidipitoisuus, nopea kasvu ja tiheä populaatio.

Lipidipitoisuus vaihtelee lajeittain voimakkaasti; rasvaa voi olla vain muutama prosentti solua kohden, kun parhaimmillaan pitoisuudeksi on kirjallisuudessa esitetty 70 % (Mata ym. 2010, 220). Viherlevän tapauksessa pitoisuus voi joissakin tapauksissa olla yli 50 % (Demirbas & Demirbas 2011, 166). Lipidien määrän ohella myös laadulla on merkitystä: tyydyttyneitä ja yksinkertaisia

tydyttymättömiä rasvoja pidetään parhaina tasalaatuisen biodieselin valmistuksessa, kun taas monitydyttymättömien rasvojen suuri määrä on indikaattori heikommasta laadusta (Demirbas & Demirbas 2011, 166).

Polttoainetuotannon kannalta oleellisinta on tuotetun öljyn määrä per aikayksikkö. Jos biomassan kasvu on hidasta, suuri öljypitoisuus ei vielä tarkoita parasta tuottavuutta ja tämän vuoksi kasvunopeus on otettava huomioon. Korkealla öljypitoisuudella on havaittu olevan yhteyttä heikkoon öljynsaantoon (Iersel ym. 2009, 7). *Chlorella*, *Scenedesmus* ja *Dunaliella* edustavat nopeakasvuista leväsukuja, joissa myös lipidipitoisuus on tyypillisesti 20-50 % (Mata ym. 2010, 220-221; Demirbas & Demirbas 2011, 165).

Huomioitava on myös saatavilla olevien, leville käyttökelpoisten ravinteiden vaikutus leväsolujen koostumukseen. Muuten ominaisuuksiltaan suotuisakaan levä ei ole sovelias, jos se ei menesty tarkoitetussa kasvuympäristössään. Ravinteiden vaikutus näkyy lopullisessa lipidien määrässä ja laadussa. (Mata ym. 2010, 221.) On lisäksi havaittu, että lipidituotanto leväsoluissa lisääntyy usein, kun kasvuympäristö on niukkaravinteinen (Sheehan ym. 1999, Wiley, Campbellin & McKuinin 2011, 327 mukaan). Joissakin tutkimuksissa on havaittu, että typenpuute, voimakas valo, matala lämpötila sekä korkea suola- ja rautapitoisuus tehostavat lipidituotantoa (Goswami ym. 2012, 500). Jätevesissä ravinteiden ei katsota yleensä olevan kasvua rajoittava tekijä, mikä on huomionarvoista harkittaessa jätevesikasvatteisista levistä hankittavaa biodieseltuotantoa.

Mikrolevästä saatavan bioöljyn määrän tiedetään olevan moninkertainen muihin lajeihin nähden. Varsinaiset tuotannolliset luvut elävät: suhteutettuna toiseksi parhaana pidettyyn biopolttoaineeseen, palmuöljyyn, mikrolevän öljyntuottoa on toisaalla esitetty kuusinkertaiseksi (Arnold, Kostia, Kymäläinen, Tikka, Romantschuk & Spilling 2011, 73), toisaalla 10-25-kertaiseksi (Mata ym. 2010, 221; Demirbas & Demirbas 2011, 166). On arvioitu, että viljelemällä levää kymmenesosalla siitä pinta-alasta, joka kuluu soijapavun kasvatukseen, voitaisiin tyydyttää Yhdysvaltojen vuotuinen polttoainetarve (Demirbas & Demirbas 2011, 166).

3.2 Erilaisista bioenergiamuodoista

Biopolttoaineita on jaoteltu sukupolvittain. Ensimmäisen sukupolven biopolttoaineet ovat sellaisia, joita on valmistettu sokeri- ja tärkkelyspitoisista sekä öljypitoisista kasveista. Näiden ongelmana on kuitenkin etenkin hiilihydraattipitoisten kasvien energia vs. ruoka -kilpailu, mistä toisen sukupolven biopolttoaineet ovat kehittyneet. Niiden raaka-aineita ovat selluloosa ja jätteet. Leviä, ja niiden ohella myös mikrobeja, pidetään kolmannen sukupolven biopolttoaineina ja niiden uskotaankin pääsevän laajamittaiseen jakeluun tämän vuosikymmenen aikana. (Bioteknologia Info 2013.)

Biodieselillä viitataan rasvahappojen monoalkyyliestereihin. Levästä tuotetun biodieselin energiasisältö (41 MJ/Kg) vastaa suurin piirtein fossiilista raakaöljyä (42,7 MJ/Kg). (Demirbas & Demirbas 2011, 166.) Biodieselin valmistusprosessi on raakaöljyn jalostusta yksinkertaisempaa, ja sitä on valmistettu jo liki sata vuotta (Demirbas & Demirbas 2007, Campbellin 2008, 3 mukaan). Valmistus perustuu transesterifikaatioksi kutsuttuun reaktioon, missä rasvahapot pilkotaan irti asyyllilipidien glyserolirungosta ja metyloidaan metyyliestereiksi eli biodieseliksi. Prosessissa syntyy sivutuotteena myös biodieselissä hyödyntämiskelvotonta glyserolia (Demirbas & Demirbas 2011, 166).

Biodieseliä valmistetaan lipideistä. Bioetanolia sen sijaan saadaan levien hiilihydraattipitoisista soluseinistä (selluloosa) ja tärkkelyksestä, jolloin tärkeää onkin levän korkea hiilihydraattipitoisuus. Bioetanolinvalmistukselle suotuisat levälajit, esimerkiksi *Euglena gracilis*, eivät välttämättä ole samoja, joista biodieseliä on kannattavaa valmistaa. Biodiesel ja -etanoli eivät silti ole toisiaan poissulkevia, vaan samasta levämassasta voidaan ensin poistaa öljy ja etanoli valmistaa jäljelle jääneestä massasta, jota tavallisen etanolin tapaan fermentoidaan hiivan avulla. Joidenkin lähteiden mukaan levästä saatavasta hiilihydraatti- ja proteiinipitoisesta biomassasta ei ole kannattavaa valmistaa etanolia. (Oilgae 2013.) Etanolin energiasisältö on 29,3 MJ/Kg (Wikipedia 2013a).

Toinen alkoholipohjainen uusiutuva polttoaine on biobutanoli, jota voidaan niin ikään valmistaa biomassasta käymisteitse. Butanoli on etanolia raskaampi yhdiste ja se sisältää noin 30 % enemmän energiaa kuin etanoli, siis suurin piirtein saman

verran kuin raakaöljy. Biobutanolin käyttö ei ole täysin vailla teknisiä ongelmia, mutta siitä kaavailaan yhtä vaihtoehtoa korvaamaan fossiilisia polttoaineita liikenteessä. (Tirronen 2008)

Vielä yksi tapa hyödyntää levämassaa on biokaasu. Levän on havaittu olevan tehokas alusta bioperäisen metaanin tuotannossa joko sellaisenaan tai yhdistettynä muuhun biojätteeseen (Arnold ym. 2011, 73). Leväbiomassan käyttämiseen muun mädätteen tukiaineena kannustaa levän mädätyksen kannalta huono hiilen ja typen välinen suhde sekä vastustuskyky biohajoamiselle, mikä voisi ajaa mädätyslämpötilan nostamiseen (Yen & Brune 2005, 130; Golueke 1957, Wiley ym. 2011, 332 mukaan). Mädättämällä syntyvä biokaasu on tyypillisesti 55-70 % metaania lopun ollessa hiilidioksidia (Svenskt Gastekniskt Center 2012, 5). Syntynyttä hiilidioksidia voisi olla mahdollista kierrättää levien uudelleenkäyttäväksi (Wiley ym. 2011, 328).

Biokaasun ja biodieselin tuotanto voidaan yhdistää mädättämällä biomassalla lipidien eristyksen jälkeen. Koska pelkkä mädätys on kokonaisuudessaan robustisempi prosessi ja vaatii siten vähemmän vaiheita ja energiaa, on yhdistettyä biodieselin ja -kaasuntuotantoa samasta massasta syytä harkita lipidipitoisuuden perusteella. On esitetty, että vasta kun lipidien määrä on vähintään 40 %, yhdistelmätuotanto alkaisi muuttua kannattavaksi. (Sialve, Bernet & Bernard 2009, 414-415.)

4 MIKROLEVÄN HYÖDYNTÄMINEN JÄTEVEDENPUHDISTUKSESSA

Jätevesien ravinteelliset ominaisuudet vaihtelevat sen mukaan, millaisista prosesseista vesi on syntynyt. Jätevesissä rajoittaviksi tekijöiksi saattaa yleisimmin osoittautua hiilen ja typen määrä sekä valo (de la Noüe, Laliberté & Proulx 1992, Borowitzka 1998; Larsdotterin 2006, 32 mukaan). Mikrolevien kyky hyödyntää erilaisia ravinteita on kuitenkin monipuolinen ja nopea (Mata ym. 2010, 219). Nopeuteen hyödyntää ravinteita vaikuttaa kunkin ravinteen pitoisuuserot solun ulko- ja sisäpuolella sekä kalvon läpäisyneopeus (Larsdotter 2006, 32).

Jäteveden ja mikrolevien hyötysuhde on kaksisuuntainen. Yhtäältä levien avulla jätevedestä voidaan poistaa rehevöittäviä tekijöitä, kuten typpeä ja fosforia, toisaalta jätevesi tarjoaa mikrolevälle suotuisan kasvuympäristön, jolloin tarve lannoitteiden käytölle leväviljelyssä vähenee. Lannoitteiden käytön kasvatusalustojen valmistuksessa on väitetty aiheuttavan puolet leväviljelyn kasvihuonekaasupäästöistä ja energiankulutuksesta (Clarens ym. 2010, Wiley ym. 2011, 329 mukaan). Toisaalta heterotrofisissa kasvatuksissa on saatu useissa tapauksissa parempia kasvutuloksia kuin fototrofisessa kasvussa (Chen, Yeh, Aisyah, Lee & Chang 2011, 75).

4.1 Jätevedenpuhdistuksen lainsäädäntö Suomessa

Jätevesien puhdistaminen perustuu Suomessa ympäristölakiin ja vesihuoltolakiin (Ympäristönsuojelulaki 86/2000, 11 §, 16 §; Vesihuoltolaki 119/2001, 6 §). Puhdistamisvelvoitteella pyritään estämään vesistöjen rehevöityminen tai saastuminen; fosforin tiedetään vapaana rehevöittävän vesistöä, kun typpi taas voi aiheuttaa ilmanlaadun heikkenemistä (Chen ym. 2012, 128). Lainsäädännössä esitetään puhdistustarve erikseen taajama- ja haja-asutusalueille. Taajama-alueilla tarkoitetaan tässä kunnalliseen viemäriverkostoon yhdistettyä infrastruktuuria, joissa käsittely tapahtuu jätevedenpuhdistamoilla. Tarkemmat puhdistusvaatimukset on eritelty valtioneuvoston asetuksilla 888/2006 yhdyskuntajätevesille ja 209/2011 haja-asutusalueiden jätevesille.

Taulukossa 1 on esitelty valtioneuvoston asetus 888/2006:n mukaiset yhdyskuntajätevesien puhdistusvaatimukset. Taulukossa ilmoitetut minimipitoisuus ja vähimmäispoistoteho ovat vaihtoehtoisia - niistä voidaan soveltaa kerrallaan joko toista tai molempia. Ravinteista fosforin poisto on pakollista, kun taas typenpuhdistuksen osalta todetaan, että sitä ”on poistettava silloin, kun typpikuorman vähentämisellä voidaan parantaa vesien tilaa” (Valtioneuvoston asetus yhdyskuntajätevesistä 888/2006, 4 §). Rehevyyttä arvioidaan ensisijaisesti fosforin avulla, sillä typpeä ei sellaisenaan mielletä hyväksi rehevyyssindikaattoriksi (Hämeen ELY 2012). Taulukossa käytetty termi AVL viittaa asukasvastinelukuun, jolla tarkoitetaan 70 gramman suuruista biologista hapenkulutusta seitsemässä vuorokaudessa (O_2 BHK₇) (Valtioneuvoston asetus yhdyskuntajätevesistä 888/2006, 2 §). Sen avulla hahmotetaan vedenpuhdistuslaitoksen puhdistuskapasiteettia.

TAULUKKO 1. Yhdyskuntajätevesien puhdistusvaatimukset (valtioneuvoston asetus yhdyskuntajätevesistä 888/2006). Puhdistuksessa voidaan soveltaa joko vaadittua minimipitoisuutta, prosentuaalista poistotehoa tai molempia.

Muuttuja	Minimipitoisuus (mg/l)	Poistoteho vähintään (%)
Biologinen hapenkulutus BHK ₇	30	70
Kemiallinen hapenkulutus KHK	125	75
Kokonaisfosfori	3 (AVL < 2000) 2 (AVL 2000 - 10000) 1 (AVL > 100 000)	80
Kokonaistyppeä	15 (AVL 10 000 - 100 000) 10 (AVL > 100 000)	70
Kiintoaine	35	90

Haja-asutusalueiden puhdistuksessa sovelletaan pienempiä puhdistusvaatimuksia. Valtioneuvoston asetuksessa talousjätevesien käsittelystä viemäriverkostojen

ulkopuolisilla alueilla (209/2011) käsittelyvaatimukset kohdistetaan kokonaisfosforiin, kokonaistyppeen ja biologiseen hapenkulutukseen. Asetus määrittää yhden asukkaan aiheuttamat keskimääräiset kuormitusluvut yllämainituille (2 §) sekä edellyttää kuormituksen vähentämistä tietyillä prosentuaalisilla osuuksilla (3-4 §). Nämä on eritelty tarkemmin taulukossa 2. Kunnilla on myös mahdollisuus ankarampiin puhdistusvaatimuksiin ympäristönsuojelumääräyksiensä nojalla silloin, kun katsotaan ravinteiden voivan aiheuttaa erityistä haittaa.

TAULUKKO 2. Viemäriverkon ulkopuolisten alueiden puhdistusvaatimukset talousjätevesille (Valtioneuvoston asetus talousjätevesien käsittelystä viemäriverkostojen ulkopuolisilla alueilla 209/2011)

Muuttuja (mg/l)	Kuormitusluku henkeä kohden (g/vrk)	Poistoteho (%)	Pilaantumisherkän alueen vähimmäispoistoteho (%)
BHK ₇	50	-80	-90
Kokonaistyppi	14	-30	-40
Kokonaisfosfori	2,2	-70	-85

4.2 Jätevedenpuhdistus Suomessa

Jätevettä puhdistetaan monivaiheisella prosessilla. Sen toteutustavat voivat erota toisistaan – käytännössä vaatimuksena olisi kuitenkin lainsäädännöllisen puhdistustarpeen toteuttaminen. Yleisesti ottaen jäteveden eloperäinen aines ja typpiyhdisteet hajotetaan biologisesti, fosfori kemiallisesti – sekä typpi- että fosforiyhdisteet on kuitenkin mahdollista hajottaa biologisesti. (Suomen ympäristökeskus 2011a.)

Ensimmäisissä vaiheissa jätevedestä erotetaan suurikokoisemmat kappaleet sekä selkeyttämällä hiekka ja rasva. Tästä jätevesi siirtyy ilmastusaltaaseen, jossa eloperäinen aines hajoaa vedeksi ja hiilidioksidiksi. Hajotus on biologista ja perustuu altaassa joko vapaana tai kantoainekappaleisiin kiinnittyneenä olevaan mikrobikantaan eli ns. aktiivilietteeseen. Prosessin lopussa on vielä jälkiselkeytys. Tyypillistä jätevesiprosesseille on jäteveden uudelleen kierrättäminen puhdistusprosessin läpi, jolloin saavutetaan parempia puhdistustuloksia. (Suomen ympäristökeskus 2011a.)

Typpeä poistetaan biologisesti, ja se tapahtuu yleensä erillisissä typenpoistolaitoksissa. Prosessi voidaan toteuttaa eri tavoin, mutta perusperiaatteena on hyödyntää hapellisissa oloissa ammoniakkia nitraatiksi hapettavien nitrifikaatiobakteereiden sekä hapettomissa oloissa nitraatin typpikaasuksi pelkistävien denitrifikaatiobakteereiden toiminnan vuorottelua. Näissä prosesseissa hiilidioksidi laskee altaan pH:ta, mitä kompensoidaan kalkin avulla. Jos nitrifikaatio tehdään ennen denitrifikaatiota, tarvitaan denitrifikaatiobakteereille ylimääräistä orgaanista ainetta hiilen lähteeksi. Nitrifikaatio voidaankin suorittaa pelkistävän prosessin jälkeen ja siinä saatu nitraatti syöttää takaisin denitrifikaatiobakteereiden käytettäväksi. Näiden altaiden perässä on vielä selkeytysallas, josta käsiteltävää jätevettä johdetaan takaisin alkuun. (Suomen ympäristökeskus 2011b.)

Stripaamalla voidaan poistaa erityisesti ammoniakkipitoisesta jätevedestä ammoniakki pois ilmastamalla. Stripattu ammoniakki voidaan yhdistää fosforihappoon, jolloin syntyy lannoitekelpoista ammoniumfosfaattia. (Suomen ympäristökeskus 2011b.)

Fosforinpoisto on yleensä kemiallista ja voidaan toteuttaa eri vaiheissa puhdistusprosessia. Fosforia poistetaan saosaineella, joka koostuu raudasta ja sulfaattista tai kloridista. Poistotavasta riippumatta pääsääntöisesti ensin saosaine sekoitetaan nopeasti jäteveteen, seosta hämmennetään hitaammin ja lopuksi selkeytetään, jolloin saostuma joko laskeutetaan tai nostetaan pinnalle. Saostuskemikaalien toiminta riippuu veden pH:sta, joten pH:ta säädellään annostelemalla jäteveteen rikkihappoa tai kalkkia, tarpeen mukaan. Saosaine- ja

hämmennyslaitteisto sijoitetaan joko ennen biologista hajotusta tai sen jälkeen. Suomessa on yleisesti käytössä rinnakkaissaostus, jossa saosaineen sekoittuminen tapahtuu ilmastusaltaassa aktiivilietteen biohajottamisen yhteydessä. (Suomen ympäristökeskus 2011c.)

Myös biologisia toteutuksia fosforinpoistoon on olemassa. Tämä prosessi perustuu mikrobeihin, joita pidetään vuoroin hapettomissa, vuoroin hapellisissa olosuhteissa ja jotka tämän yhteydessä sitovat fosfaattia soluunsa. Tämä voidaan käytännössä toteuttaa lisäämällä ennen ilmastusallasta anaerobinen kammio, jossa anaerobiset reaktiot tapahtuvat; hapelliset reaktiot tapahtuvat normaaliin tapaan ilmastusaltaassa. Ongelma kuitenkin on prosessia kiertävä palautusliete; jätevedessä olevan nitraatin on havaittu inhiboivan fosforin biologista sitomista, mitä varten tarvitaan erillinen denitrifikaatio. Nitraattia siis ei biologisilla fosforin- ja typenpoistolaitoksilla saisi päätyä anaerobiseen osastoon, joten on ohjattava järjestelmää niin, että nitraattipitoinen aines johdetaan denitrifioitavaksi ennen anaerobista käsittelyä. (Suomen ympäristökeskus 2011d.)

Yli 50 asukkaan jätevesiä käsitteleviä puhdistamoita on Suomessa 540. Keskimäärin ne poistavat jätevedestä 97 % orgaanisesta aineesta, 96 % fosforista ja 56 % tpestä. Näistä erityisesti typenpoistoa pidetään tällä hetkellä haasteellisena. (Suomen ympäristökeskus 2011a.)

5 MIKROLEVÄN KASVATUSKOKEET

Selenastrum-mikrolevää kasvatettiin kahdessa eri jätejakeessa, ja näiden rinnalla tehtiin kontrollikasvatus. Ennen varsinaista bioreaktorikasvatusta oli kaksi esikasvatusvaihetta, joiden tarkoituksena oli sopeuttaa levä bioreaktorin kasvatusympäristöön. Esikasvatusvaiheissa tuotettiin noin viisi litraa leväkasvatetta, joka siirrostettiin bioreaktoriin. Niissä kasvatuksia jatkettiin kunnes biomassan kasvun todettiin joko pysähtyneen tai hidastuneen riittävästi.

5.1 *Selenastrum*-mikrolevä

Selenastrum on makean veden yksisolainen leväsuku, joka kykenee sietämään pieniä suolapitoisuuksia (Goswami ym. 2012, 506). Se kuuluu Selenastraceae-heimoon, ja solut ovat tyypillisesti suorita tai käyriä sirppejä, jotka suippenevat päätään kohti (Fawley, Dean, Dimmer & Fawley 2005, 142). Liuoksessa leväsolut voivat takertua toisiinsa ja näyttää harsomaisilta vyyhdeiltä. *Selenastrum*-mikrolevän on havaittu tuottavan korkeita lipidipitoisuuksia ja se pystyy hyödyntämään hiiltä sekä hiilidioksidi- että bikarbonaattimuodossa (Goswami ym. 2012, 500–501). Sitä on myös käytetty biomonitoroinnissa toksisten aineiden tunnistajana (Connecticut College 2013). *Selenastrum*-suvun mikrolevistä on lajitasolla vain vähän tietoa.

Tässä tutkimuksessa käytetty *Selenastrum*-suvun levä on eristetty Iso-Ruuhijärvestä toukokuussa 2008 (Tikka 2011, 10). Käytetty *Selenastrum* sp. on määritelty ainoastaan sukutasolla eikä tarkasta lajista ole tietoa. *Selenastrum*-mikrolevän on havaittu kykenevän sekä heterotrofiaan että mahdollisesti miksotrofiaan (Tikka 2011, 41).

5.2 Tutkimuksessa käytetyt jätejakeet

Selenastrum-levää kasvatettiin kahdessa eri jätejakeessa, jotka valittiin aiemmin tehtyjen tutkimusten perusteella (Valkonen 2013). Toinen jätejakeista on yhdyskuntajätteestä puristettua nestettä ja peräisin Kujalan kompostista (myöh. Kujala). Toinen jätejakeista oli rejektivettä sianlannan ja teollisen biojätteen

mädätetystä lietteestä Biovakka oy:n biokaasulaitokselta. Rejektivedestä kiinnostuttiin alun perin sen korkean ravinnepitoisuuden vuoksi (Kautto 2011, 13), mutta aiemmin levää ei saatu kasvamaan rejektivedessä siitä huolimatta, että sen ravinneprofiili on samankaltainen ylläkuvatun puristeveden kanssa (Valkonen 2013)

Molemmat jätejakeet olivat alun perin lietemäisiä, ja niistä oli erotettu neste sentrifugoimalla ja suodattamalla saatu supernatantti lasikuitusuodattimen läpi. Tämän jälkeen ne oli steriloitu autoklavoimalla (121 °C, 1 bar, 40 min). Ennen leväkasvatuksia jätevedet on säilötty pimeässä 5 °C:n lämpötilassa. Koska valitut jätejakeet olivat sellaisenaan liian konsentroituneita levien käytettäväksi (Valkonen 2013), ne laimennettiin 2,5 %:seksi (taulukko 3).

5.3 Kasvatusliuokset

Esikasvatuksissa käytettiin kahta ravinnealustaa – EG ja COMBO (Kilham ym. 1998, 147-148; Culture collection of algae and protozoa 2013). Ravinnealustat valmistettiin reseptien mukaisesti pienin muutoksin. Jätejakeet lisättiin kasvatusliuoksiin, jotka autoklavoitiin 121 °C:ssa yhden barin ylipaineessa ja kylmäsäilöttiin 5 °C:ssa.

COMBO oli pääasiallinen käytetty ravinnealusta. EG:tä käytettiin ainoastaan rejektivesikasvatuksen ensimmäisessä esikasvatusvaiheessa aikataulullisista syistä, sillä EG-alustan oli projektissa havaittu kasvattavan levämassaa nopeammin.

Varsinaisissa kokeissa Kujala-jätevesikasvatuksessa käytettiin kasvatusalustana vesijohtoveteen laimennettua jätevettä. Rejektivedestä on aiemmin projektissa havaittu puuttuvan joitakin hivenaineita verrattuna puristevedeen, mikä on ehkäissyntä levänkasvua. Tämän vuoksi rejektiveteen lisättiin epäorgaanisia yhdisteitä COMBO-kasvatusliuoksen ohjeen mukaisesti siten, että COMBO:n reseptiä (COMBO_R) noudatettiin muutoin, mutta typpeä ja fosforia sisältävät ainesosat natriumnitraatti (NaNO₃) ja dikaliumfosfaatti (K₂HPO₄) jätettiin pois. Tällöin molemmissa tapauksissa typen ja fosforin lähde oli jätevesi. Kontrollikasvatuksessa käytettiin COMBO-ravinnealustaa (COMBO_K)

alkuperäisreseptistä poiketen siten, että typpi- ja fosforipitoisuudet olisivat yhtä suuret kuin Kujala-kasvatuksessa. Organiseksi hiilen lähteeksi kontrollissa lisättiin glukoosia pitoisuudella 5 g/l.

5.4 Esikasvatus

Esikasvatuksessa käytettiin steriilejä, kertakäyttöisiä muovipulloja ja 5 litran Erlenmeyer-pulloja. Erlenmeyerit konepestiin, niiden suut peitettiin alumiinifoliolla ja ne steriloiitiin 160 °C:ssa kaksi tuntia (Rao 2008; General bacteriology 2013). Muovipulloissa tehdyt esikasvatukset pidettiin lämpötila- ja valosäädelyssä Sanyo MLR 350 -mallisessa kasvatuskaapissa, jossa pulloja ajoittain ravisteltiin. Erlenmeyereissa tehdyt esikasvatukset pidettiin huoneenlämmössä tasoravistelijassa, jota valaistiin lähietäisyydeltä loisteputkilampuin. pH asetettiin noin 7:ään suolahapon avulla (0,1 M). Rejektiveden esikasvatuksessa lisättiin pH:n puskuriliuokseksi natriumbikarbonaattia (0,02 M), tarkkailtiin pH:ta ja säädettiin suolahapon (0,1 M) avulla liuoksen pH noin 7:ään, sen noustua yli 8:n.

Kunkin esikasvatuksen vaiheet on koottu taulukkoon 3.

TAULUKKO 3. Esikasvatuksien koekohtainen kuvaus ja kokeen käynnistäminen.

Kujala	Rejekt	Kontrolli
Jätevesi + COMBO (1:40) 200 ml:n steriileihin muovipulloihin	Jätevesi + EG (1:99) 200 ml:n steriileihin muovipulloihin	COMBO _K 200 ml:n steriileihin muovipulloihin
Seuraavana päivänä 20 ml levän siirrostus yllä mainittuihin pulloihin		
N. 7 päivää esikasvatusta		
Jätevesi + COMBO + levä 600 ml:n steriileihin muovipulloihin	Jätevesi + COMBO + levä + HCl-NaHCO ₃ kahteen steriiliin 5 l:n Erlenmeyer-pulloon	COMBO _K + levä kahteen steriiliin 5 l:n Erlenmeyer-pulloon
Esikasvatus kasvatuskaapissa (siirrosten määrä n. 5 l)	Esikasvatus tasoravistelijassa (siirrosten määrä n. 5 l)	
Reaktorikasvatuksen käynnistys: hanavesi 76 l, jätevesi (2,5 % loppupitoisuus) + leväsiirrostte reaktoriin	Reaktorikasvatuksen käynnistys: hanavesi 76 l, jätevesi (2,5 % loppupitoisuus) + COMBO _R + leväsiirrostte reaktoriin	Reaktorikasvatuksen käynnistys: hanavesi 76 l, COMBO _K + glukoosi 5 g/l (loppupit.) + leväsiirrostte reaktoriin

5.5 Kasvatus fotobioreaktorissa

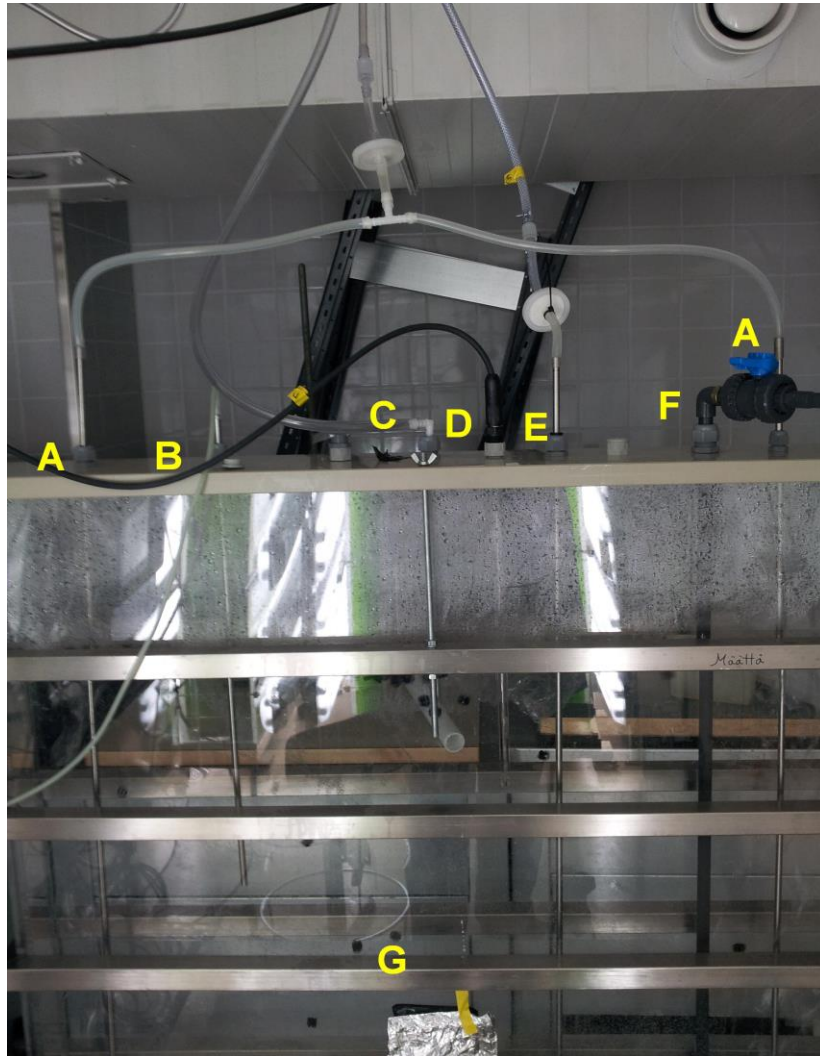
Reaktorikasvatuksissa käytettiin 100-litraista laattafotobioreaktoria, joka on esitetty käyttövalmiudessa kuviossa 2. Reaktorin materiaaleja on kuvannut opinnäytetyössään tarkemmin Vuontisjärvi (2012, 23-24). Reaktorin kuvauksen mukaan sen seinämät ovat polymetyylimetakrylaattia (pleksimuovi), se on tuettu

metallisella tukirakenteella ja siihen on kiinnitetty molemmin puolin loisteputkilamppukehikot. Reaktorissa on tiivistetty, ruuveilla kiristettävä kansi, johon on porattu kierrereiät tarvikkeiden läpivienneiksi.

Hiilidioksidinsyöttö säädettiin KM 3000 -multiparametrilaitteella. Reaktoriin liitetty SCHOTT:n pH-elektrodi lähetti laitteelle dataa, jonka perusteella pH:n kasvettua yli määritetyn raja-arvon 7,4 laite syötti automatisoidusti reaktoriin hiilidioksidia, kunnes pH oli laskenut raja-arvon alle. pH:n ohella kokeista tallennettiin dataa lämpötilasta ja valaistuksesta. Lämpötilaa seuraamalla saatiin tietää, pysyykö reaktorin sisäinen lämpötila halutulla lämpötil-alueella 20-30 °C.

Reaktoria valaistiin pitkulaisilla loisteputkivalaisimilla (8×36 W) molemmilta pitkittäissivuiltaan. Reaktoriin kiinnitettiin anturi, joka mittasi fotosynteettisesti aktiivisen säteilyn läpäisevyyttä. Tätä läpäisevän säteilyn määrää seurattiin pH:n tapaan KM 3000 -multiparametrilaitteella.

Projektin aiemmissa kasvatuksissa oli havaittu, että *Selenastrum* saattaa kerääntyä reaktorin seiniin niissä kohdin, joissa virtaus ei ole riittävää. Tämän estämiseksi reaktoriin annosteltiin kantoainekappaleita. Kantoainekappaleiden alkuperäinen tarkoitus on toimia kalankasvatusaltaita puhdistavan biofilmin liikkuvana alustana (Clewer 2013). Tässä yhteydessä niitä käytettiin estämään levän kiinnittymistä reaktorin seinämiin.



KUVIO 2. Tutkimuksessa käytetty suljettu laattafotobioreaktori käyttövalmiudessa. Merkkien selitykset: A: ilmastusletku, B: näytteenottoputki, C: poistoilmaletku, D: pH-lämpötila-anturi, E: hiilidioksidinsyöttö, F: poistoputki, G: valaistusmittari.

Jokaisen kasvatuksen jälkeen reaktori komponentteineen puhdistettiin huolellisesti. Reaktorin pesussa käytettiin BioVasan valmistamaa BioClean-puhdistusainetta, joka ei sisällä reaktorin seinämämateriaalille haitallisia alkoholeja (BioVasa 2013; Muovimuotoilu 2013). Komponentit, kuten putket ja letkut, pestiin niin ikään BioCleanilla; suodattimet ja huokoskivi autoklavoitiin (121 °C, 1 bar). Kantoainekappaleet puolestaan säilöttiin kloriittiliuoksessa.

5.6 Näytteenotto ja analyysit

Kustakin kasvatuksesta otettiin näytteitä niin, että näytteenottokertojen välillä oli korkeintaan 3 vuorokautta. Ensimmäinen näyte otettiin aina kokeen käynnistyttyä ja viimeinen leväbiomassan talteenoton yhteydessä. Pääsääntöisesti kutakin näytettä käsiteltiin neljällä eri tavalla.

- 1) kuivapaino lasikuitusuodattimille vakuumlaitteiston avulla
- 2) sentrifugointi, josta
 - a. biomassan talteenotto ja syväjääditys -80 °C:seen
 - b. fuugatun supernatantin suodatus ja saadun liuoksen analysointi seurattavien ravinteiden osalta
- 3) kestäväointi Lugolin liuoksella
- 4) solumäärälaskenta virtaussytometrillä kestäväidystä näytteestä

Kuivapaino

Kuivapainon määrittämiseksi hyödynnettiin imulaitteistoa ja Whatmanin GF/C-suodattimia (halkaisija 47 mm, huokoskoko 2 µm). Suodattimet kuivattiin pitämällä niitä 105 °C:ssa yön yli ennen suodatusta. Suodatusvaiheessa kunkin päivän näytettä uutettiin kolmelle suodattimelle, jotka edelleen kuivattiin yllämainitussa lämpötilassa yön yli. Suodatettu määrä vaihteli kasvatuksen etenemisen mukaan siten, että määrä oli korkeintaan 50 ml / suodatin (kasvatusten alkuvaiheissa) ja vähintään 5 ml / suodatin. Kuivauksen jälkeen punnittiin kuivapainot (kaava 1). Näytteestä saatujen kuivapainojen perusteella laskettiin suodatettuun annokseen suhteutettuna levän konsentraatio reaktorissa (kaava 2). Kunkin näytteenottokerran näytteiden konsentraatioista laskettiin keskiarvo, jonka perusteella koekohtaiset biomassan kasvukäyrät laadittiin.

Kaava 1. Yksittäisen näytteen kuivapainon laskukaava

$$S_{kp} = S_{s_x} - S_x$$

S_{kp} = *Selenastrum*-näytteen kuivapaino,

S_{s_x} = Suodattimen ja näytteen yhteenlaskettu kuivapaino

S_x = suodattimen kuivapaino

Kaava 2. Yksittäisen näytteen leväkonsentraatio

$$S_c = S_{kp}/f \times 1000$$

S_c = näytteen konsentraatio (g/l)

f = GF/C-suodattimen läpi suodatettu näytemäärä (ml)

Sentrifugointi

Biomassan talteen keräämiseksi näytteet sentrifugoitiin kaksi tai kolme kertaa biomassan määrästä riippuen. Sentrifugoitu näyte kerättiin 50 ml:n tuubiin, jossa biomassa pakastettiin (-80 °C). Tavoite oli saada kustakin näytteestä märkäpainona vähintään gramma biomassaa.

Supernatanttia otettiin talteen 50–100 ml ravinneanalyysjää varten. Liuos suodatettiin vielä Whatman GF/C-suodattimella (halkaisija 47 mm, huokoskoko 2 µm) imulaitteiston läpi mahdollisten jäljellejääneiden kiintoainekappaleiden erottelemiseksi. Suodatettu näyte kerättiin pulloon ja pakastettiin (-18 °C) ravinteiden mittaamiseen asti.

Reaktorikasvatuksen päätyttyä biomassa kerättiin kaksifaasisentrifugilla Evodos type 10. Tätä biomassaa ei käytetty tämän opinnäytetyön yhteydessä.

Kestävöinti ja solumäärälaskenta

Näytteet kestävöitiin Lugolin liuoksella siten, että kutakin näytettä pipetoitiin 1 ml Eppendorf-putkeen, johon annosteltiin 20 µl Lugolin liuosta. Tarkoituksena oli mahdollistaa kunkin näytteen solumäärän selvitys ja tarvittaessa tarkempi tarkastelu mikroskoopilla.

Kestävöidyistä näytteistä tehtiin solumäärälaskenta virtaussytometri Partec Cyflow® 8:n avulla. Tätä varten näytteet käsiteltiin tekemällä 1:50-liuos tislatusista vedestä ja NaS₂O₂-liuoksesta, jolla Lugolin liuoksen väri saatiin poistettua näytteestä. Sytometrin avulla näytteistä saatiin solumäärät millilitraa kohden.

Ravinnepitoisuuksien mitta

Biomassan kasvun ohella oli oleellista seurata ravinteiden kulumista reaktorista. Näin saatiin selville levän kuluttamien ravinteiden määrä sekä tähän kulunut aika. Tätä tietoa voidaan edelleen suhteuttaa biomassan kasvuun ja siinä tapahtuneisiin muutoksiin. Seurattavat tekijät olivat kokonaistyyppi, ammonium, nitraatti, kokonaisfosfori, fosfaatti ja kemiallinen hapenkulutus. Kokonaistyyppillä tarkoitetaan näytteessä olevan orgaanisen typen sekä ammoniakki- (NH₃-N), nitraatti- (NO₃-N) ja nitriittitypen (NO₂-N) määrää (ASA Analytics 2013), ja kokonaisfosforilla tarkoitetaan orgaanisten ja epäorgaanisten fosfaattiyhdisteiden määrää (United States Environmental Protection Agency 2013).

Ravinnenäytteet analysoitiin sentrifugoidusta supernatantista Hach Lange DR 2800 -spektrofotometrillä laitteelle soveltuvien ravinnetestikittien avulla. Ravinnenäytteitä otettiin edustavasti kasvatuksista siten, että näytteitä olisi kasvatusta kohden vähintään viisi, ja että sekä aloitus- että lopetuspäivän näytteistä olisi mitattu ravinnepitoisuudet.

Spesifinen kasvunopeus

Solumääräisistä kasvutuloksista laskettiin myös spesifinen kasvunopeus (specific growth rate). Spesifinen kasvunopeus asetetaan eksponentiaalisen kasvun vaiheeseen, joka tässä työssä on etsitty kuvaajien kasvukäyrän jyrkimmän, suoranmuotoisen kasvunopeuden kohdasta. Kasvunopeus saadaan laskettua kaavalla 3, missä eksponentiaalisen kasvun vaiheesta otettujen kahden näytteen solumäärien osamäärän luonnollinen logaritmi jaetaan näytteenottopäivien ajallisella erotuksella (Goswami ym. 2012, 503).

Kaava 3. Spesifisen kasvunopeuden laskukaava (Goswami ym. 2012, 503, sovellus kirjoittajan)

$$\mu = \ln (N_t/N_0) / \Delta T$$

μ = spesifinen kasvunopeus

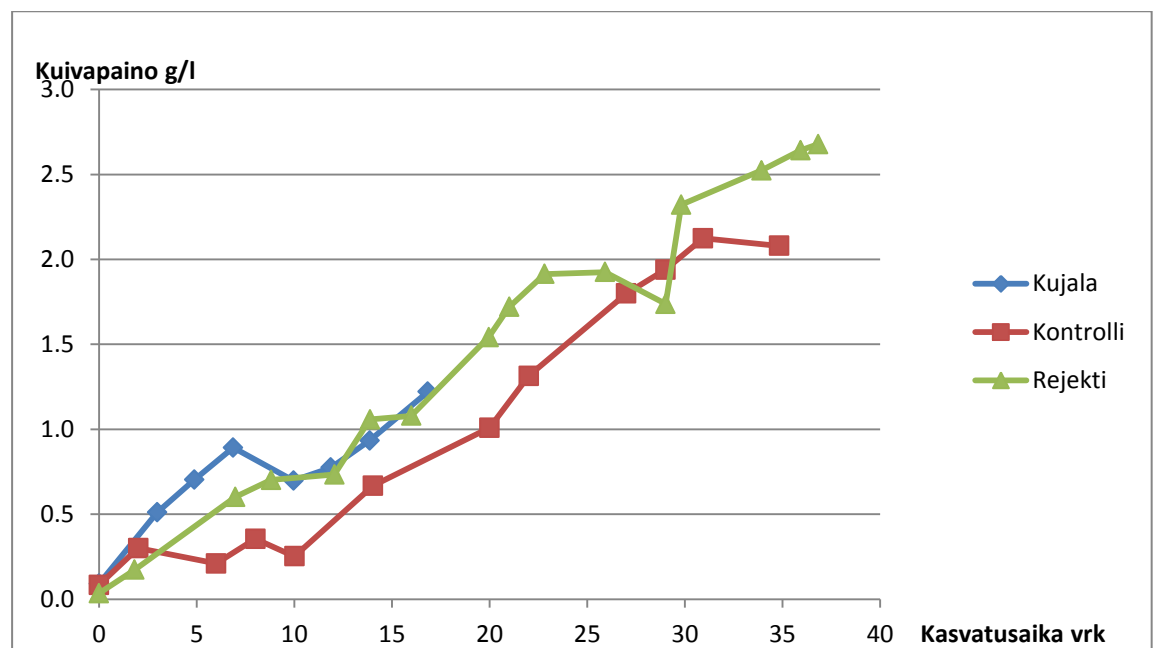
N_t = solumäärä kasvatuksen päättämivuorokauden kohdalla

N_0 = solumäärä kasvatuksen aloitusvuorokauden kohdalla

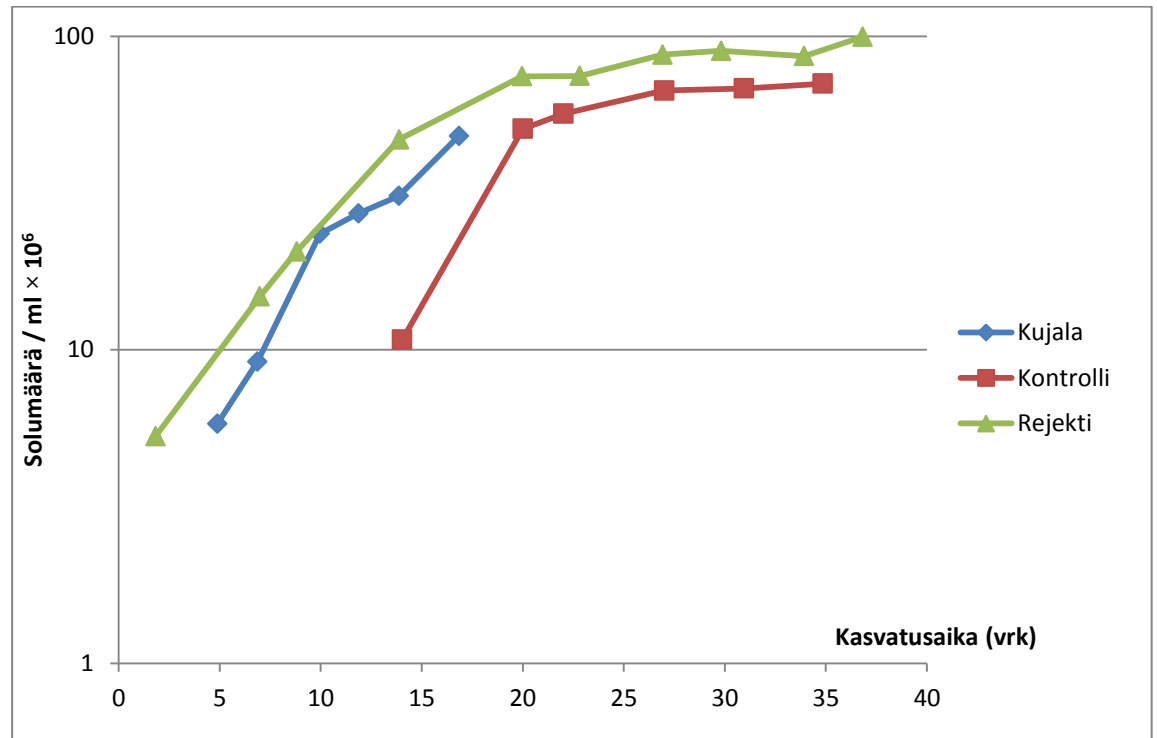
ΔT = kasvatukseen käytetty aika vuorokausina.

6 TULOKSET

Kasvatusten kuivapainoja (g/l) (kuvio 3) ja solumääriä (solua / ml) (kuvio 4) ilmaisevat kuvaajat eivät ole täysin yhtenevät. Biomassan kasvu on lineaarista kasvatusten aikana mutta solumäärien kasvu noudattaa selvemmin mikrobipopulaation kasvukäyrää, ja eksponentiaalisen kasvun vaihe ja stationäärivaihe erottuvat. Kasvatusvuorokauden 20 kohdalla sekä rejekti- että kontrollikasvatuksen solumäärien kasvu hidastuu selkeästi mutta vastaavaa ilmiötä ei havaita biomassan kasvusta.



KUVIO 3. Reaktorikasvatusten kuivapainon kasvu (g/l) kasvatusajan funktiona



KUVIO 4. Reaktorikasvatusten solumäärien kasvu kasvatusajan funktiona logaritmisella asteikolla. Y-akselilla on kuvattu solumäärät miljoonina millilitraa kohden.

Biomassan kasvu

Kujala-kasvatuksen kokonaispituus oli 17 vuorokautta. Siitä saatu kokonaisbiomassa oli 1,2 g/l ja keskimääräinen kasvunopeus 67,1 mg/l/vrk. Virtaussytometrillä saatu lopullinen solumäärä oli $4,82 \times 10^7$ solua / ml ja spesifinen kasvunopeus 0,28 (taulukko 4). Spesifinen kasvunopeus oli mitattu aikaväliltä 5-10 vrk (LIITE 1; taulukko 2).

Rejktivesikasvatuksen kokonaiskesto oli 37 vuorokautta. Biomassan lopulliseksi pitoisuudeksi saatiin 2,7 g/l ja keskimääräinen vuorokausikasvu oli 71,8 mg/l/vrk. Virtaussytometrin avulla saatu lopullinen solumäärä oli $9,96 \times 10^7$ solua / ml. Spesifinen kasvunopeus oli 0,19 (taulukko 4), ja se laskettiin aikaväliltä 2-9 vrk (LIITE 1; taulukko 5).

Kontrollikasvatuksen lopulliseksi biomassaksi saatiin 2,1 g/l keskimääräisen kasvunopeuden ollessa 57,3 mg/l. Virtaussytometrillä saatu lopullinen solumäärä

oli $7,05 \times 10^7$ solua/ml. Spesifiseksi kasvunopeudeksi saatiin 0,26 laskettuna väliltä 14-20 vrk (taulukko 4; LIITE 1; taulukko 8). Kontrollikasvatuksen tulokset mukailevat rejektiveden tuloksia biomassan osalta. Solumääräisen kasvunopeuden perusteella kasvu on kuitenkin ollut nopeampaa kuin jätevesikasvatuksissa. Ensimmäisen viikon aikana kasvua ei ole tapahtunut merkittävästi (kuvio 7).

TAULUKKO 4. Kasvatuskokeiden kasvunopeudet, kokonaissaannot kuivapainoina ja solumäärinä sekä spesifiset kasvunopeudet. Kuivapainot on määritetty koko kasvatusten ajalta, spesifiset kasvunopeudet on laskettu eksponentiaalisen kasvun vaiheesta. (LIITE 1; taulukot 2, 5, 8)

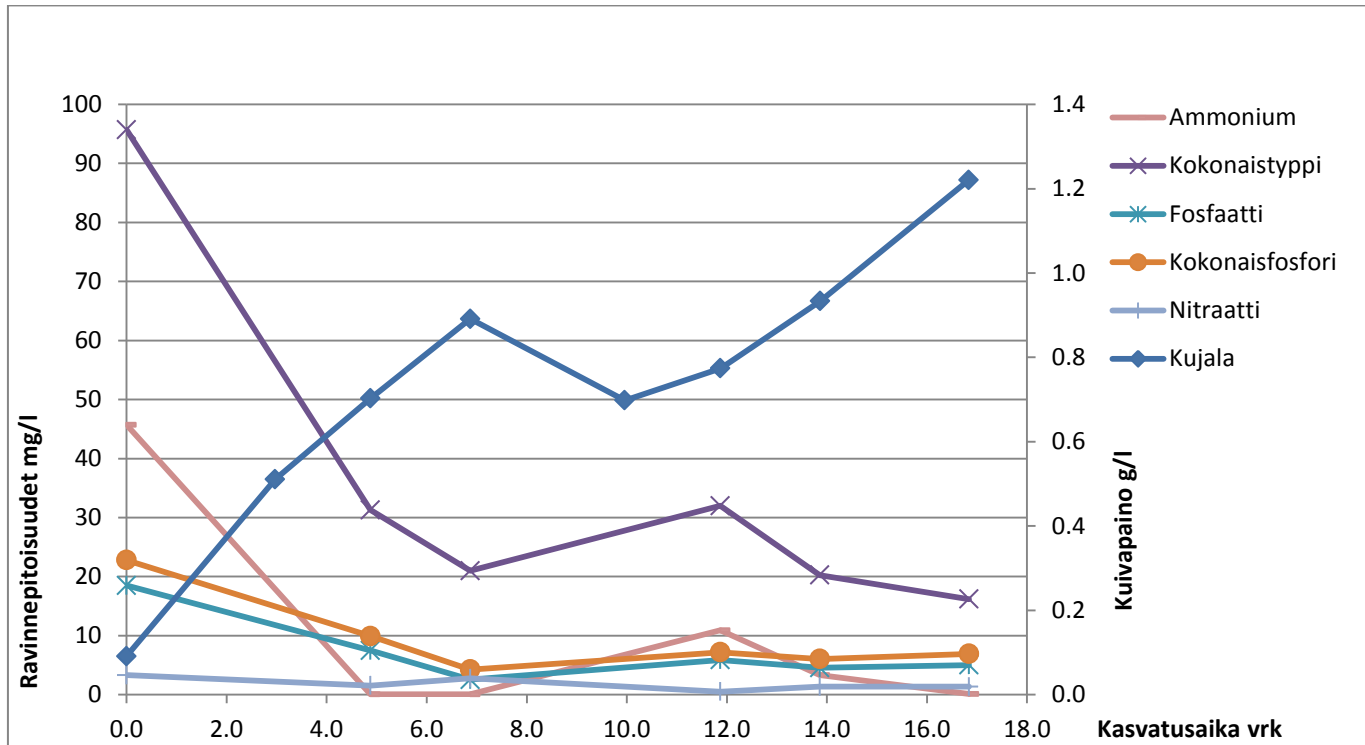
	Kasvunopeus, kuivapaino (g/l/vrk)	Kokonaissaanto, kuivapaino (g/l)	Spesifinen kasvunopeus (vrk)	Kokonaissaanto (solumäärä $\times 10^6$ / ml)
Kujala	0,067	1,2	0,28	48,1
Rejekti	0,072	2,7	0,19	99,6
Kontrolli	0,074	2,1	0,26	70,5

Ravinteiden sitoutuminen biomassaan / vähenemä kasvatusalustasta

Koekohtaisissa kuvaajissa (kuviot 5, 6 ja 7), esitetään biomassan kasvu (g/l) ja ravinteiden kulutus (mg/l). Kuvioissa 5, 6 ja 7 on arvot kokonaistypestä, nitraatista ja ammoniumista sekä kokonaisfosforista ja fosfaatista. Kemiallisen hapenkulutuksen arvot on kerrottu tulosten yhteydessä.

Kasvatuksen aikana Kujalan jäteveden fosfaattipitoisuus väheni 18,5 mg/l:sta 5,0 mg/l:aan, eli yhteensä 73 % alkuperäisestä määrästä (kuvio 5) . Kokonaisfosforin vähenemä oli 70 %, siis 22,8 mg/l:sta pitoisuuteen 6,9 mg/l. Ammoniumipitoisuus väheni liki 100 %, eli alkuperäisestä pitoisuudesta 45,7 mg/l pitoisuuteen 0,11 mg/l. Nitraattipitoisuus muuttui 59 % pienemmäksi, joskin sen alkuperäinen pitoisuus oli vain 3,3 mg/l. Loppupitoisuus oli 1,4 mg/l. On siis todennäköistä, että levä on käyttänyt pääasiallisena typenlähteenään ammoniumia.

Kasvatusliuoksessa on todennäköisesti ollut tyypeä myös orgaanisessa muodossa, sillä kokonaistypen määrä on ollut noin kaksinkertainen verrattuna ammonium- ja nitraattitypen määrään yhteensä. Kemiallinen hapenkulutus väheni 80 % (2180 mg/l → 444 mg /l).



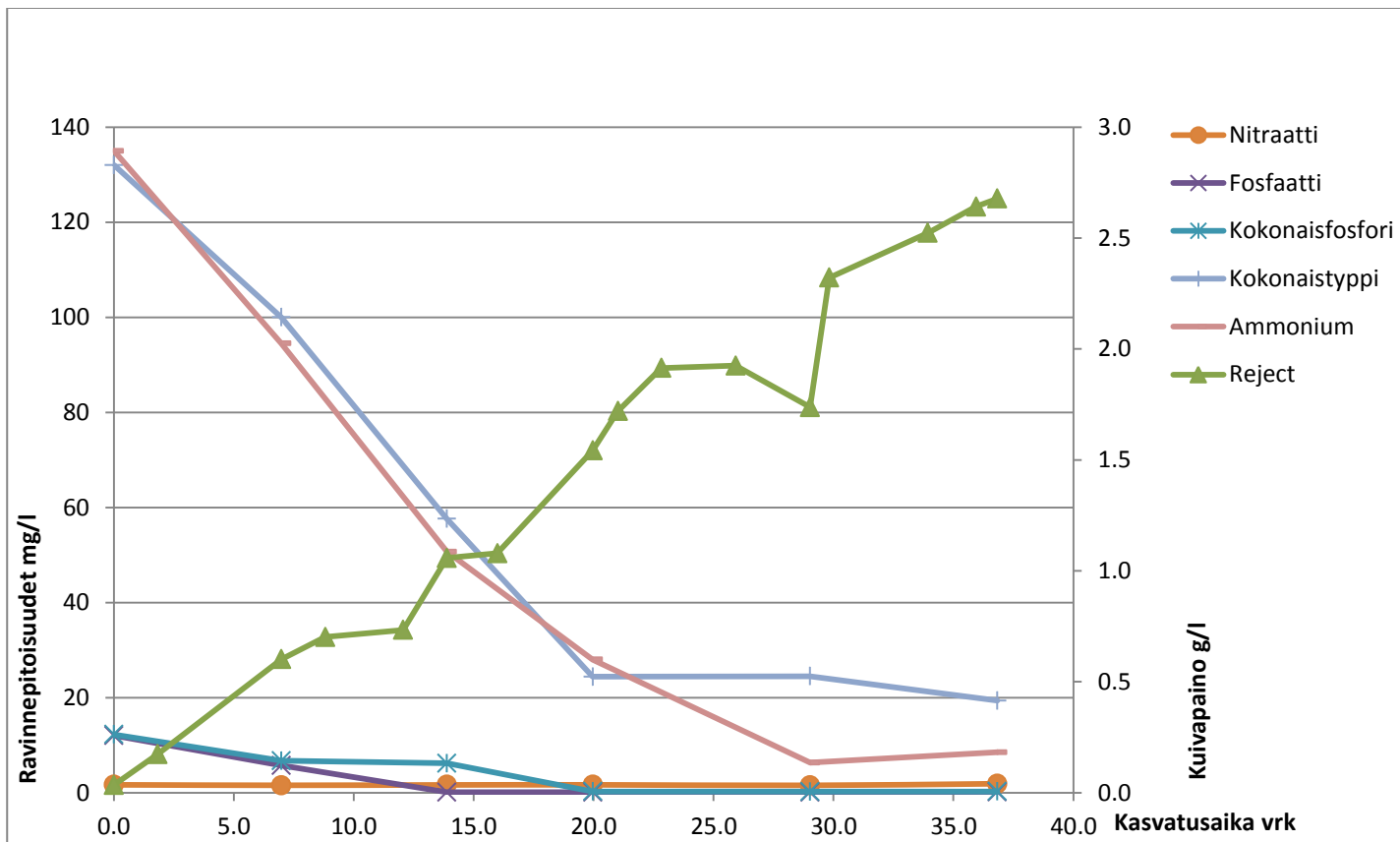
KUVIO 5. Kujalan jäteveden kasvatuksesta otettujen näytteiden ravinnepitoisuuksien (mg/l) ja kuivapainon (g/l) muutos kasvatusajan funktiona

Fosfori poistui rejektivedestä lähes kokonaan: fosfaatti väheni pitoisuudesta 12 mg/l alle ravinnetestikitin määritysrajan 0,5 mg/l ja kokonaisfosfori pitoisuudesta 12,2 mg/l niin ikään alle määritysrajan 0,5 mg/l (kuvio 6). Tämän perusteella fosforinpoisto oli siis ainakin 98 %. Tässä kasvatuksessa miltei kaikki tyyppi esiintyi ammoniumina. Sen alkuperäispitoisuus oli keskimäärin 135,1 mg/l ja lopuksi jäljellä oli 8,5 mg/l (vähemmän 93,7 %). Nitraattipitoisuus lisääntyi 14 % eli alkuperäisestä pitoisuudestaan 1,7 mg/l pitoisuuteen 1,9 mg/l.

Kokonaistyyppipitoisuus putosi pitoisuudesta 135,1 mg/l pitoisuuteen 19,4 mg/l (vähemmän prosentteina 85,6 %). Hajonta ammoniumin ja kokonaistypen pitoisuuksissa perustuu havaittuun virheeseen testituloksissa (ks. luku 6).

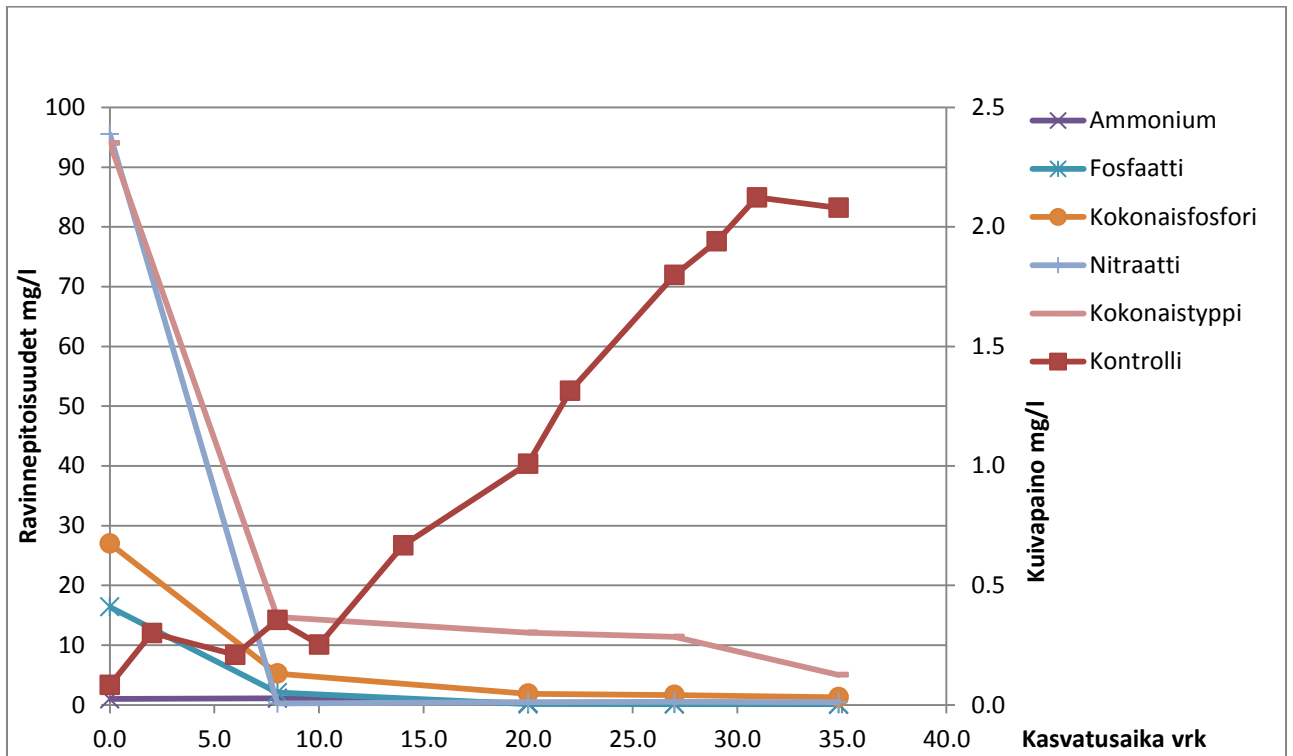
Kemiallisen hapenkulutuksen muutos oli pitoisuudesta 576,8 mg/l pitoisuuteen

100,0 mg/l, siis 82,7 %. Puristeveden kemiallinen hapenkulutus oli suurin piirtein nelinkertaista rejektiveteen nähden (LIITE 1; taulukot 1, 4).



KUVIO 6. Rejektiveden kasvatuksesta otettujen näytteiden ravinnepitoisuuksien (mg/l) ja kuivapainon muutos (g/l) kasvatusajan funktiona

Kontrollikasvatuksessa kokonaisfosfori väheni pitoisuudesta 27,0 mg/l pitoisuuteen 1,3 mg/l (95,3 %) ja fosfaatti 16,4 mg/l:sta alle ravinnetestin määritysrajan 0,5 mg/l. Typpi oli tarkoituksenmukaisesti peräisin COMBO:n reagenssina olevasta natriumnitraatista. Nitraatin pitoisuus oli alussa 94,0-95,5 mg/l ja lopussa 0,4 mg/l. Vähenemä oli siis yli 99 %. Ammoniumpitoisuudet olivat alussa 1,0 mg/l ja lopussa 0,08 mg/l tehden vähenemästä 91,4 %. Kokonaistyyppipitoisuus väheni keskimääräisestä pitoisuudesta 94,8 mg/l pitoisuuteen 5,0 mg/l. Sen vähenemä oli 94,7 %. Kemiallinen hapenkulutus pieneni kokeen aikana pitoisuudesta 5100,0 mg/l pitoisuuteen 137,0 mg/l, siis 97,3 %.



KUVIO 7. Kontrollikasvatenäytteiden ravinnepitoisuuksien (mg/l) ja kuivapainon muutos (g/l) kasvatusajan funktiona

7 TULOSTEN TARKASTELU

Biomassan kasvu

Suljetuissa kasvatusjärjestelmissä biomassasaannot ovat tyypillisesti 0,5-8 g/l (Iersel ym. 2009, 11), johon verrattuna tässä työssä saadut kasvatustulokset (1,2 – 2,7 g/l) ovat samaa tasoa (taulukko 4). Jätevedessä kasvunopeudeksi on saatu 0,03–0,7 g/l/vrk jätevesityypistä riippuen (Martinez ym. 2000 & An ym. 2003, Krishnan, Devin & Thankamanin 2012, 50 mukaan). Esimerkiksi Bhatnagar ym. (2009, 532) saivat kasvatuksessaan keskiarvoksi 0,067 g/l/vrk, mikä on sama tulos kuin Kujala - kasvatuksessa.

Li ym. tutkivat neljäntoista eri levälajin kasvua jätevedenpuhdistuslaitoksen jäteliitteessä ilman erillistä tukiravinnealustaa. Kahta parhaimmin menestynyttä kantaa (*Chlorella kesleri* ja *Chlorella protothecoides*) jatkotutkittaessa saatiin yhdentoista vuorokauden kasvatuksissa biomassaksi parhaissa tapauksissa 1,9 g/l ja 2,5 g/l. Tällöin kasvunopeudet olivat 0,17 g/l/vrk ja 0,23 g/l/vrk. Toisaalta neljässä koeasetelmassa kahdeksasta biomassansaanto oli jäänyt alle 0,8 g/l ja parhaat tulokset saatiin korkeimmilla valomäärillä ja -intensiteeteillä sekä ylimääräisellä hiilidioksidinsyötöllä (Li, Zhou, Hu, Min, Chen & Ruan 2011, 10865, 66.). Tässä opinnäytetyössä vastaavat nettosaannot puriste- ja rejektijätevesikasvatuksessa olivat 11. kasvatusvuorokauden kohdalla noin 0,7 g/l.

Goswami ym. (2012, 507) saivat *Selenastrum*-suvun sentrifugoiduille ja suodatetuille levänäytteille kasvunopeuden vaihteluväliksi 0,2–1,1 g/l/vrk ja keskiarvoksi 0,75 g/l/vrk, mikä on tämän työn kasvatukseen verrattuna kymmenkertainen. Spesifinen kasvunopeus puolestaan oli Goswamin ym. (2012) tutkimuksessa keskimäärin 0,69, kun tässä työssä saadut kasvunopeudet olivat 0,28 (Kujala) ja 0,19 (rejekti). Voidaan siis todeta, että vaihteluväli eri lähteistä saaduissa kasvatustuloksissa on erittäin suuri.

Ravinteiden poisto

Ravinteiden vähenemää on verrattu valtioneuvoston asetuksessa 888/2006 annettuihin puhdistusvaatimukseen yhdyskuntajätevesistä (taulukko 5). Asetus

esittää vaatimukset sekä prosentuaalisena poistotehona (%) että pitoisuusrajoina (mg/l).

Koska Kujala-kasvatus jäi lyhyeksi, ei kasvatuksen aikana saavutettu vaadittua 80 %:n vähenemää kokonaisfosforin osalta. Muutoin Kujala-kasvatuksessa saavutettiin vaaditut poistotehot kuuden vuorokauden aikana, mutta pitoisuusrajoja ei ehditty saavuttaa. Rejektivedessä ravinteiden vähenemä oli selkeästi hitaampaa: tavoitteena oleviin poistotehoihin päästiin vasta 17. kasvatusvuorokauden aikana. Biomassan kasvunopeus oli kuitenkin liki samaa luokkaa muiden kasvatusten kanssa.

Kontrollikasvatuksen ravinnevähenemä noudatteli Kujala-jäteveden tuloksia. Ei voida kuitenkaan sanoa, miten aiemmin mainittu bakteerikontaminaatio vaikutti ravinteiden vähenemiseen. Merkittävä osa ravinteista kului ennen kuin kasvatuksesta oli havaittavissa selkeää leväpopulaatiota. Typen osalta kasvatuksessa päästiin jo 8 vuorokauden aikana pitoisuuteen 14,7 mg/l, mutta tästä eteenpäin väheneminen hidastui merkittävästi, ja raja-arvo 10 mg/l saavutettiin vasta noin neljän viikon jälkeen.

TAULUKKO 5. Yhdyskuntajätevesien puhdistusvaatimuksien mukaiset prosentuaaliset poistotehot ja näiden poistettujen pitoisuuksien raja-arvot sekä kasvatusaika, jolloin poistoteho on saavutettu. Rivillä poistotehon saavutusvuorokausi viitataan kasvatusaikaan, jonka kuluttua poistoteho on saavutettu, ja sen alla oleva sarake viittaa konsentraatioina esitettyihin puhdistusvaatimukseen, kun asukasvastineluku on yli 100 000. (Valtioneuvoston asetus yhdyskuntajätevesistä yhdyskuntajätevesistä 888/2006.)

		Kujala	Rejeki	Kontrolli
Kokonaistyyppi	-70 % pit. (mg/l)	28,7	39,6	28,2
	Poistotehon saavutusvuorokausi	6.	17.	6.
	Vrk, jolloin 10 mg/l jäljellä	-	-	29.
Kokonaisfosfori	-80 % pit. (mg/l)	4,6	2,4	5,4
	Poistotehon saavutusvuorokausi	-	17.	8.
	Vrk, jolloin 1 mg/l jäljellä	-	8.	7.
Kemiallinen hapenkulutus	-75 % pit. (mg/l)	545,0	144,2	1275,0
	Poistotehon saavutusvuorokausi	5.	15.	6.
	Vrk, jolloin 125 mg/l jäljellä	-	Välillä 7.–20.	-

Wang ym. saavuttivat kolmessa viikossa lehmänlanta- ja ravinneliuos pohjaisella leväkasvatuksella pitoisuuksia 1,48–1,71 g/l. Ravinnevähennäminen oli orgaanista ja

ammoniakkitypen määrää ilmaisevan kokonais-Kjeldahl-typen osalta 75–82 %, kokonaisfosforin 62–75 % ja kemiallisen hapenkulutuksen 27–38 %. (Wang, Li, Chen, Min, Chen, Zhu & Ruan 2010, 2626) Tässä tutkimuksessa käytetyn, sianlantaperäisen laimennetun rejektiveden avulla kasvatetun levän biomassassa oli vastaavana ajankohtana 1,72 g/l. Toisin kuin Wangin ym. tutkimuksessa, Kjeldahl-typen sijasta tässä tutkimuksessa mitattiin kokonaistyyppiä, jonka vähenemä on vastaavana ajankohtana ollut noin 80 %. Kokonaisfosforin osalta määrä oli yli 95 % ja kemiallisen hapenkulutuksen vähenemä noin 80 %.

Li ym. (2011, 10865) mittasivat ravinteiden vähentymää 11 vuorokauden aikana. Tutkimuksessa ei ilmoiteta käytetyn jäteveden ravinnepitoisuuksia, mutta tuloksista ilmenee kemiallisen hapenkulutuksen vähentyneen kasvatusparametrien vaikutuksista riippuen 75-90 %, kokonaistypen 61-87 % ja kokonaisfosforin 13-92 %. Typen osalta havaittiin toisen leväkannan poistaneen sitä paremmin ulkoisen hiilidioksidinsyötön avulla, kun toisessa tällä ei ollut vaikutusta. Fosforin osalta ulkoisen hiilidioksidinsyötön havaittiin molemmissa tapauksissa olevan merkittävä negatiivinen korrelaatio: korkeammassa hiilidioksidipitoisuuksissa fosforinpoisto oli vähäistä, kun korkeammassa pH:ssa poistoteho kasvoi. Yhdentoista vuorokauden jälkeen Kujalan suotoveden vähenemät olivat 70-80 % (KHK), 69 % (kokonaistyyppi) ja 71 % (kokonaisfosfori). Rejektivessä vähenemät olivat 70–80 % (KHK), 51–55 % (kokonaistyyppi) ja 50 % (kokonaisfosfori).

Kujala-kasvatuksen keskeytyminen

Kujala-kasvatus lopetettiin vuorokauden 16 aikana, kun muita kasvatuksia ylläpidettiin yli kuukausi. Tämä selittyy osaltaan sillä, että vuorokauden 10 kohdalla havaittiin kasvun hidastuneen, mikä virheellisesti tulkittiin kasvun päätymiseksi. Varsinaista syytä kuivapainon vähentymiselle ei voitu osoittaa. Tarkasteltaessa ravinnepitoisuuksia tämän notkahduksen aikana ammonium oli kulutettu reaktorissa loppuun. Toisaalta kokonaistyyppipitoisuus oli tällä ammoniumin nollahetkellä 21 mg/l, mikä viittaa siihen, että levämassalle on ollut käytettävissä tyyppiä, joskin epäsuotuisammassa muodossa, esimerkiksi nitraattina. Muutaman vuorokauden aikana ammonium- ja

kokonaistyyppipitoisuudet olivat kasvaneet noin 10 mg/l kumpikin. Vastaavasti biomassa oli lisääntynyt.

Kasvu olisi todennäköisesti vielä jatkunut, mutta Kujala-kasvatus oli ensimmäinen, jolloin ei ollut tietoa, kuinka kauan kasvun olisi oletettavissa jatkuvan. Tästä kasvatuksesta ei kuitenkaan voida tehdä luotettavia johtopäätöksiä kasvun jatkumisen tai lopullisen biomassantuotannon suhteen. Tuloksia tarkasteltaessa onkin huomioitava, että mikäli kasvatusta olisi jatkettu, sekä biomassa että ravinteidenpoistoteho olisivat todennäköisesti olleet saatuja loppupitoisuuksia suurempia.

Kujala-kasvatuksessa biomassan kasvu oli kuivapainosta saatujen konsentraatioiden perusteella kaikkein nopeinta ensimmäisen seitsemän vuorokauden aikana, joskin kasvu pysähtyi tämän jälkeen hetkellisesti. Solumäärämittauksissa pudotusta biomassassa ei havaittu vastaavana ajankohtana.

Rejektikasvatuksen korkea typpipitoisuus

Reaktorikasvatuksessa havaittiin, että todellinen kasvatusliuoksen typpipitoisuus oli aiemmin projektissa mitattua pitoisuutta suurempi: rejektivedestä otetussa näytteessä havaittiin typpipitoisuudeksi 135 mg/l, kun kahdessa muussa kasvatuksessa pitoisuudet olivat noin 96 mg/l (Kujala) ja 94 mg/l (kontrolli). Aiemmassa projektin mittauksessa laimentamattoman rejektiveden typpipitoisuus oli 3860 mg/l, mikä tässä tutkimuksessa käytettynä 2,5-prosenttisena jätevetenä olisi ollut 96,5 mg/l, eli likimain sama pitoisuus kuin Kujalassa ja kontrollissa. Rejektivedessä myös lähes kaikki typpi oli ammoniumina, kun Kujalan jätevedessä ammoniumin osuus oli noin 48 %.

TAULUKKO 6. Kokeiden aloituksen yhteydessä reaktorista otetuista näytteistä mitatut ravinteet, yksikkö mg/l

	Fosfaatti	Kokonaisfosfori	Ammonium	Nitraatti	Kokonaistyppe	KHK
Kujala	18,5	22,8	45,7	3,30	95,7	2180
Rejeki	12,0	12,2	135,0	1,66	135,0	576,0

Toinen reaktorivaiheen ongelma esiintyi 29. vuorokautena otetussa näytteessä, jossa biomassan kuivapaino oli laskenut aiemmasta. Ammoniumpitoisuuden oli samaan aikaan havaittu pudonneen tasolle, jossa se ravinneanalyyysien perusteella pysyi kasvatuksen loppuun asti, millä on saattanut olla vaikutusta biomassaan. Seuraavassa näytteessä kuivapaino oli kuitenkin jatkanut suurin piirtein samaa trendiä kuin notkahdusta edeltäneessä näytteessä, joten epäedustavan näytteen mahdollisuutta voidaan pitää todennäköisenä. Kestävöidyn näytteen solumäärän laskeminen virtaussytometrillä olisi lisäksi voinut vahvistaa tai hylätä virheellisen näytteen; tästä päivämäärästä solulaskentaa ei kuitenkaan tehty.

Kontaminaatio kontrollikasvatuksessa

Kontrollikasvatuksen alkuvaiheissa havaittiin bakteerikontaminaatio ja kasvatusliuoksen väri muuttui kellertäväksi. Hiilenlähteenä käytetty glukoosi on todennäköisesti suosinut bakteerien kasvua. Kontaminaatio vääristi aiemmin kuvattua vuorokautista kasvukeskiarvoa (57,3 mg/l/vrk). Jos keskiarvoa laskettaessa jätetään huomioimatta tämä viivevaihe, on biomassan kasvun keskiarvo 73,6 mg/l/vrk. Tämä keskiarvo on laskettu kasvatusajan 10,0 ja 34,8 väliltä. Taulukossa 6 on käytetty tätä korjattua kasvunopeutta.

Tarkasteltaessa biomassan kasvua suhteessa ravinteiden vähentymiseen voidaan havaita, että suurin osa ravinteista kului juuri tämän alkuvaiheen kontaminaation aikana. Vuorokauden 7 kohdalla tehdyn ravinnemäärityksen perusteella saatujen tietojen mukaan kokonaisfosforipitoisuus oli pudonnut viidennekseen alkutilanteesta ja leville käyttökelpoisen fosfaatin määrä kahdeksasosaan.

Kokonaistypen osalta tällä aikavälillä pitoisuus oli vähentynyt reiluun 15 prosenttiin alkuperäisestä. Lähes kaikki typpi oli liuoksessa nitraattimuotoisena. Ravinnetestien mukaan toisaalta lähes kaikki nitraatti olisi kulutettu tänä aikana (alle 0,4 mg/l), ja koska ammoniumtyyppiä liuos sisälsi vain hyvin niukasti, loppu typpi on saattanut olla levälle heikommin käyttökelpoisessa muodossa, esimerkiksi nitriittinä. Ravinteita on voinut kontaminaation aikana varastoitua myös leväsoluihin. Ei voida kuitenkaan osoittaa tarkasti, millaisia vaikutuksia bakteereilla on ollut levän kasvuun ja saatavilla olevien ravinteiden määrään. Kaikesta huolimatta biomassan kasvu oli alkuvaiheen jälkeen ravinteiden vähentymiseen nähden yllättävä ja vastasi muiden kasvatusten biomassan kasvua.

Muita huomioita

Reaktoriin lisättyihin kantoainekappaleisiin tarttunutta levämassaa ei huomioitu leväkonsentraation määrittämisessä. Oletus oli, ettei tämä määrä olisi oleellisen suuri. Lisäksi, koska kappaleita lisättiin jokaiseen kasvatukseen suurin piirtein saman verran, suhteellisen vaikutuksen kasvatukseen pitäisi olla minimoitu. Myöskään silmämääräisesti arvioiden reaktorinpesuvaiheessa poistetuista kappaleista ei ollut havaittavissa runsaasti tarttunutta levää.

Ravinnetestituloksissa havaittiin kaksi lievää mittausvirhettä. Rejektikasvatuksen aloitusnäytteessä havaittiin ammoniumpitoisuus 3 mg/l suuremmaksi kuin kokonaistyyppipitoisuus. Kontrollikasvatuksessa aloitusnäytteen nitraattipitoisuus puolestaan oli 1,5 mg/l suurempi kuin kokonaistyyppipitoisuus. Virheet ovat vähäisiä, joten näitä käsiteltäessä ilmoitetaan kokonaistyyppipitoisuus ja rejektikasvatuksen ammonium- sekä kontrollikasvatuksen nitraattipitoisuus toistensa keskiarvoina.

Rejektikasvatuksen esikasvatusvaiheessa käytettiin ravinnealustana COMBO:n sijasta poikkeuksellisesti EG:tä. EG:n käyttöä pidettiin mahdollisena, sillä levän voidaan olettaa seuraavaan siirrostusvaiheeseen mennessä käyttäneen EG:n ravinteet, minkä näin ollen ei pitäisi vaikuttaa kokeen tuloksiin. Käytännössä kuitenkin – oletettua nopeuseroa huomioimatta – COMBO:n käyttö olisi ollut kaikissa kasvatusvaiheissa perusteltua.

Sovellettavuus

Tässä tutkimuksessa käytettyjä jätejakeita oli laimennettu jopa 25-kertaisesti ja alkuperäisessä muodossaan niitä voidaankin pitää enemmän lietteinä kuin jätevesinä (Valkonen 2013). Tässä tutkimuksessa niitä voi pitää keinotekoisina jätevesinä.

Lahdessa jätevedenpuhdistuksesta vastaa Lahti Aqua, jonka kaksi bio-kemiallisesti toimivaa puhdistamoä käsittelevät noin 30 000 kuutiota jätevettä päivässä. Niissä typen ja orgaanisen aineen puhdistus tapahtuu aktiivilietteellä ja fosfori saostetaan kemiallisesti (Lahti Aqua 2013a). Yrityksen ilmoittamat ravinnepitoisuudet ja puhdistustulokset vuodelta 2012 on esitetty taulukossa 7. Taulukossa on ilmoitettu ainoastaan ne parametrit, joita on tarkasteltu myös tämän tutkimuksen yhteydessä.

TAULUKKO 7. Lahti Aquan jätevedenpuhdistamoiden poistotehot sekä ravinteiden alkuperäiset ja lopulliset pitoisuudet vuonna 2012 (Lahti Aqua 2013b). Alkuperäiset pitoisuudet ovat laskennallisia ja perustuvat yrityksen ilmoittamiin tietoihin loppupitoisuuksista. Taulukon arvot ovat puhdistamoiden tuloksista laskettuja keskiarvoja.

	Alkup. pitoisuus (mg/l)	Lopullinen pitoisuus (mg/l)	Poistoteho (%)
Kokonaisfosfori	8,3	0,2	97,2
Ammoniumtyppi	54,5	2,1	96,1
Kokonaistyyppi	-	-	72,2
KHK	-	40,5	-

Verrattaessa jätevedenpuhdistuslaitoksiin tuleviin kunnallisen jäteveden pitoisuuksiin tässä tutkimuksessa käytettyjen jätevesien kokonaisfosforipitoisuudet olivat suurempia. Ammoniumtyypeä oli Kujala-kasvatuksessa alle viidesosa vähemmän ja rejektivesikasvatuksessa liki 2,5 kertaa enemmän.

Kokonaistypen osalta levän poistoteho on ylittänyt puhdistamoiden aktiivilietekäsittelyn lukeman 11 %:lla Kujala-kasvatuksessa ja 16 %:lla

rejktivedessä. Ammoniumtypenpoisto oli Kujala-kasvatuksessa hieman puhdistuslaitoksia parempaa; rejktiveden poistoteho jäi 6,5 mg/l laitosten vastaavaa pienemmäksi. Fosforia rejktivesikasvatuksessa poistettiin suurin piirtein saman verran Kujala-kasvatuksen jäädessä huomattavasti jälkeen. Kemiallisen hapenkulutuksen väheneminen on merkittävästi tehokkaampaa puhdistuslaitoksissa.

Kunnallinen jätevesi ei siis olisi sellaisenaan liian väkevää levänkasvatukselle. Tämä antaa viitteitä levänkasvatuksen mahdollisuudelle jätevedenpuhdistuslaitoksilla. Varsinainen sijoitusympäristö puhdistusprosessissa on silti mietittävä tarkoin – liian laimeana jätevesi voi hidastaa levänkasvatusta. Lisäksi leväpuhdistus ei saa olla yhteydessä aktiivilietepuhdistukseen: nitrifikaatiobakterien läsnäolo saattaa hidastaa typenpoistoa moninkertaisesti (Choi, Das, Yu & Hu 2010, 1009).

Keruufrekvenssin valinta

Jos biomassan saanto ja ravinteiden vähenemät ovat tässä työssä saatua suuruusluokkaa, mikä olisi sopiva keruuväli? Kasvuajan pituus riippuu siitä, onko pääasiallisena tarkoituksena biomassantuotanto vai jätevedenpuhdistus.

Kujalan kompostipuristeveden osalta havaittiin, että prosentuaalinen poistoteho saavutettiin kuudessa vuorokaudessa, mutta ei pitoisuusraja-arvoja. Ravinteiden lisäkäsittelymenetelmiä (ks. luku 4.2) hyödyntämällä olisi siten mahdollista valita tämäntyyppiselle jätevedelle 6–7 vrk:n pituinen käsittely- ja levänkasvatusjakso. Tällöin biomassan saanto olisi noin 0,9 g/l. Solumääristä saadun kasvukäyrän perusteella kasvu ei olisi tällöin kuitenkaan pysähtynyt, minkä perusteella siis levänkasvatusta voisi jatkaa pidemmällekin biomassan saantia varten.

Rejktivedessä ravinteiden vähentyminen oli kompostinestettä hitaampaa, muttei rejktivedelle poikkeuksellista. Prosentuaalinen poistoteho saavutettiin kasvatusvuorokauden 17 kohdalla typen ja fosforin osalta, kemiallisen hapenkulutuksen osalta jo kaksi vuorokautta aikaisemmin. Minimipitoisuuksista kokonaistyyppiä ei saatu vähennettyä tavoitetasoonsa 10 mg/l, mutta kokonaisfosforin raja-arvo 1 mg/l saavutettiin arviolta vuorokauden 19 aikana.

Kemiallisesta hapenkulutuksesta harvemmin suoritettujen näytteenottojen vuoksi tarkkaa raja-arvon saavutusaikaa ei voida sanoa, mutta tämä on tapahtunut viimeistään vuorokauden 20 aikana. Kasvatusvuorokauden 17 kohdalla biomassa on ollut noin 1,2 g/l ja vuorokauden 20 kohdalla noin 1,5 g/l. Solumääristä saadun kasvukäyrän perusteella biomassan kasvu hidastui jo 20. kasvatusvuorokauden kohdalla.

Luvussa 4.2 todettiin jätevedenpuhdistuksessa saatavan poistotehon olevan Suomessa nykyään yli 95 % orgaaniselle aineelle ja fosforille; sen sijaan typen puhdistusosuus on vain 56 % (Suomen ympäristökeskus 2011a). Lahti Aquan jätevedenpuhdistamoissa on päästy vuonna 2012 yli lain edellyttämän 70 %:n (Lahti Aqua 2013b). Tämän tutkimuksen kokonaistypen vähenemä oli kuitenkin yli 80 %. Teoriassa siis levällä voitaisiin bioenergiantuotannon yhteydessä hoitaa typen tehokkaampi poisto ilman erillistä vuorottelua nitrifikaatio- ja denitrifikaatiobakteereiden välillä.

8 YHTEENVETO

Tässä opinnäytetyössä kasvatettiin *Selenastrum*-suvun mikrolevää kahdessa erityyppisessä jätejakeessa, ja tavoitteena oli tarkastella biomassan tuottoa ja ravinteiden vähenemää. Kasvatuskokeissa biomassan kasvu oli noin 0,07 g/l/vrk, mikä on samassa mittaluokassa kirjallisuudessa julkaistujen tulosten kanssa. Suurin biomassapitoisuus 2,7 g/l saavutettiin rejektivesikasvatuksessa. Solumääräinen kasvu eksponentiaalivaiheen aikana oli nopeinta Kujalan puristevesikasvatuksessa. Kujala-kasvatuksen keskeytymisen vuoksi kokonaisbiomassan saantoa oli vaikea verrata. Kasvunopeuksia verratessa merkittäviä eroja ei kuitenkaan havaittu.

Ravinteiden talteenotto laimennetuista jätejakeista oli tehokasta kun tuloksia verrattiin yhdyskuntajätevedelle asetettuihin puhdistusvaatimuksiin. *Selenastrum*-mikrolevän kyky sitoa ravinteita saavutti ja jopa ylitti vaatimukset. Julkaistuissa tutkimuksissa on saatu samankaltaisia ja paikoin heikompia puhdistustuloksia. Tämän perusteella *Selenastrum*-mikrolevän käyttö jätevesien puhdistuksessa vaikuttaa lupaavalta ja leväbiomassaa voidaan edelleen hyödyntää energiantuotannossa.

LÄHTEET

Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. & Ibraheem, I. 2012. Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19/2012, 257–275 [viitattu 17.7.2013]. Saatavissa ScienceDirect-tietokannasta: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X12000332>

Aisyah, R. Effect of pH on microalgae growth. *Research algae* [viitattu 2.4.2013]. Saatavissa: <http://www.researchalgae.com/basic/effect-of-ph-on-microalgae-growth.html>

ALDIGA – Algae from Waste for Combined Biodiesel and Biogas Production. Lahden ammattikorkeakoulu [viitattu 5.4.2013]. Saatavissa: <http://www.lamk.fi/aldiga/Sivut/default.aspx>

Arnold, M., Kostia, S., Kymäläinen, M., Tikka, M., Romantschuk, M. & Spilling, K. 2011. Algae from waste for combined biodiesel and biogas production – ALDIGA. Teoksessa Mäkinen, T., Alakangas, E. & Kauppi, M. (toim.) *BioRefine Yearbook 2011*. Tekes Review 284/2011. Helsinki. 73–77 [viitattu 17.7.2013]. Saatavissa: www.tekes.fi/u/BioRefine_Yearbook_2011.pdf

ASA Analytics. 2013. Total Nitrogen in Wastewater [viitattu 9.12.2013]. Saatavissa: <http://www.asaanalytics.com/total-nitrogen.php>

Azov, Y. & Goldman, J. 1982. Free Ammonia Inhibition of Algal Photosynthesis in Intensive Cultures. Teoksessa *Applied and Environmental Microbiology* 43, 1982, 735–739 [viitattu 17.7.2013]. Saatavissa PubMed-tietokannasta: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC241910/>

Bhatnagar, A & Bhatnagar, M. 2009. *Chlorella minutissima* – A Promising Fuel Alga for Cultivation in Municipal Wastewaters. *Applied Biochemistry and Biotechnology* (2010) 161: 523–536 [viitattu 17.7.2013]. Saatavissa PubMed-tietokannasta: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19882116>

Biology online. 2013. Autotrophic [viitattu 4.4.2013]. Saatavissa: <http://www.biology-online.org/dictionary/Autotrophic>.

- Bioteknologia Info. Biopolttoaineet [viitattu 4.4.2013]. Saatavissa:
http://www.bioteknologia.info/etusivu/ymparisto/Biomassa/fi_FI/Biopolttoaineet/
- BioVasa. 2013. BioClean | maatalouden desinfiointi pesuaine [viitattu 11.4.2013].
Saatavissa: <http://www.biovasa.fi/puhdistus-desinfiointi-aineet/bioclean-maatalouden-desinfiointi-pesuaine>
- Burkholder, J., Glibert, P. & Skelton, H. 2008. Mixotrophy, a major mode of nutrition for harmful algal species in eutrophic waters. *Harmful Algae* 8 (2008) 77–93 [viitattu 17.7.2013]. Saatavissa ScienceDirect-tietokannasta:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S156898830800098X>
- Campbell, M. 2008. Biodiesel: Algae as a Renewable Source for Liquid Fuel. *Guelph Engineering Journal* (1), 2–7. ISSN: 1916-1107 [viitattu 17.7.2013].
Saatavissa: http://www.soe.uoguelph.ca/webfiles/gej/articles/GEJ_001-002-007_Campbell_Biodiesel_from_Algae.pdf
- Chen, Y., Qiang, H. & Kazuyuki, S. 2000. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. *Biochemical Engineering Journal* 6, 2000, 87–102 [viitattu 17.7.2013]. Saatavissa:
https://wiki.umn.edu/pub/Biodiesel/WebHome/energetics_and_carbon_metabolism_during_growth_of_microalgal_cells_under_photoautotrophic.pdf
- Chen, C., Yeh, K., Aisyah, R., Lee, D. & Chang, J. 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology* 102 (2011), 71–81 [viitattu 17.7.2013].
Saatavissa PubMed-tietokannasta:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20674344>
- Chen, R., Li, R., Deitz, L., Liu, Y., Stevenson, J. & Liao, W. 2012. Freshwater algal cultivation with animal waste for nutrient removal and biomass production. *Biomass and Bioenergy* 39 (2012), 128–138 [viitattu 17.7.2013]. Saatavissa ScienceDirect-tietokannasta:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953411006647>

Choi, O., Das, A., Yu, C. & Hu, Z. 2010. Nitrifying Bacterial Growth Inhibition in the Presence of Algae and Cyanobacteria. *Biotechnology and Bioengineering*. 2010. 107(6). 1004–1111 [viitattu 18.7.2013]. Saatavissa PubMed-tietokannasta: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20632370>

Clewer oy. 2013. Kalankasvatus suljetussa kierrossa [viitattu 17.7.2013]. Saatavissa: <http://www.clewer.com/etusivu/suurasiakkaille/kalankasvatus>

Connecticut College. 2013. Selenastrum Reinsch [viitattu 5.3.2013]. Saatavissa: http://silicasecchidisk.conncoll.edu/LucidKeys/Carolina_Key/html/Selenastrum_Main.html

Culture collection of algae and protozoa. 2013. *Euglena gracilis* medium recipe [viitattu 3.4.2013]. Saatavissa: <http://www.ccap.ac.uk/media/recipes.htm#>

Demirbas, A. & Demirbas F. 2011. Importance of algae oil as a source of biodiesel. *Energy conversion and management*. 52 (2011), 163–170 [viitattu 17.7.2013]. Saatavissa ScienceDirect-tietokannasta: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196890410002761>

Ellis, G. 2004. Chemistry of wastewater. *Encyclopedia of Life Support Systems* [viitattu 27.3.2013]. Saatavissa: <http://www.eolss.net/EolssSampleChapters/C06/E6-13-04-05/E6-13-04-05-TXT-03.aspx>

Fawley, M., Dean, M., Kimmer, S. & Fawley, K. 2005. *Journal of Phycology* 42, 2005. 142–154 [viitattu 17.7.2013]. Saatavissa: <http://www.uamont.edu/facultyweb/fawleym/ItascaMO/Selenastraceae.pdf>

Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO]. 1996. Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture. *FAO Fisheries technical paper* 361 [viitattu 26.3.2013]. Saatavissa: <http://www.fao.org/docrep/003/W3732E/w3732e00.htm#Contents>

General bacteriology. 2013. Sterilization and disinfection [viitattu 3.4.2013].
Saatavissa: <http://generalbacteriology.weebly.com/sterilization-and-disinfection.html>

Goswami, R., Kalita, N. & Kalita, M. 2012. A study on growth and carbon dioxide mitigation by microalgae *Selenastrum* sp.: its growth behavior under different nutrient environments and lipid production. *Annals of Biological Research*, 2012, 3 (1): 499–510 [viitattu 28.8.2013]. Saatavissa Scholars Research Library -tietokannasta: <http://scholarsresearchlibrary.com/ABR-vol3-iss1/ABR-2012-3-1-499-510.pdf>

Greenwell, H., Laurens, L., Shields, R., Lovitt, R. & Flynn, K. 2009. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technical challenges. *Journal of the Royal Society* 2010 7. 703–726 [viitattu 17.7.2013]. Saatavissa PubMed-tietokannasta: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20031983>

Hannon, M., Gimpel, J., Tran, M., Rasala, B. & Mayfield, S. 2010. Biofuels from algae: challenges and potential. *Biofuels* syyskuu 2010, 763–784 [viitattu 28.8.2013]. Saatavissa PubMed-tietokannasta: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3152439/>

Hämeen ELY. 2011. Fosfori vedenlaatua kuvaavana muuttujana. Valtion ympäristöhallinto [viitattu 9.4.2013]. Saatavissa: <http://www.ymparisto.fi/default.asp?contentid=152015>

Hämeen ELY. 2012. Typpi vedenlaatua kuvaavana muuttujana. Valtion ympäristöhallinto [viitattu 9.4.2013]. Saatavissa: <http://www.ymparisto.fi/default.asp?contentid=152029#a1>

Iersel, S., Gamba, L., Rossi, A., Alberici, S., Dehue, B., Staaij, J. & Flammini, A. 2009. Algal-based Biofuels: A Review of Challenges and Opportunities for Developing Countries. Food and Agriculture Organization of the United Nations [viitattu 17.7.2013]. Saatavissa: <http://www.fao.org/docrep/012/i1199e/i1199e00.htm>

- Kautto, A. 2011. Waste Streams for Algae Cultivation. Lahden ammattikorkeakoulu, tekniikan ala [viitattu 8.7.2013]. AMK-opinnäytetyö. Saatavissa Theseus-tietokannasta: <http://urn.fi/URN:NBN:fi:amk-2011060210759>
- Kilham S., Kreeger, D., Lynn, S., Goulden, C. & Lazaro, H. 1998. COMBO: a defined freshwater culture medium for algae and zooplankton. *Hydrobiologia* 07-1998, volume 377, issue 1-3 (147–159) [viitattu 20.8.2013]. Saatavissa: <http://www.scottglynn.com/1998%20Kilham%20et%20al%20Hydrobiologia%20%20377%281-3%29%20147-159.pdf>
- Krishna, A., Dev, L. & Thankamani, V. 2011. An integrated process for Industrial effluent treatment and Biodiesel production using Microalgae. *Research in Biotechnology*. 3(1): 47–60, 2012 [viitattu 17.7.2013]. Saatavissa Research in biotechnology -tietokannasta: <http://www.researchinbiotechnology.com/index.php/rib/article/view/72/69>
- Lahti Aqua oy. 2013a. Jätevedenpuhdistamot [viitattu 30.10.2013]. Saatavissa: <http://www.lahtiaqua.fi/Toiminta/J%C3%A4teveden%20puhdistus/J%C3%A4tevedenpuhdistamot>
- Lahti Aqua oy. 2013b. Puhdistustuloksia [viitattu 30.10.2013]. Saatavissa: <http://www.lahtiaqua.fi/Toiminta/J%C3%A4teveden%20puhdistus/Puhdistustuloksia>
- Larsdotter, K. 2006. Wastewater treatment with microalgae – a literature review. *Vatten* 62: 31–38. 2006. Lund [viitattu 18.7.2013]. Saatavissa: http://www.tidskriftenvatten.se/mag/tidskriftenvatten.se/dircode/docs/48_article_2125.pdf
- LennTech BV. Nitrogen (N) and water [viitattu 27.3.2013]. Saatavissa: <http://www.lenntech.com/periodic/water/nitrogen/nitrogen-and-water.htm>
- Li, Y., Zhou, W., Hu, B., Min, M., Chen, P. & Ruan, R. 2011. Integration of algae cultivation as biodiesel production feedstock with municipal wastewater treatment: Strains screening and significance evaluation of environmental factors.

Bioresource Technology 102. 10861–10867 [viitattu 18.7.2013]. Saatavissa PubMed-tietokannasta: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21982450>

Mata, T., Martins, A. & Caetano, N. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* Vol. 14. Issue 1. Tammikuu. 217–232 [viitattu 18.7.2013]. Saatavissa ScienceDirect-tietokannasta: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032109001646>

Mostafa, S., Shalaby, E. & Mahmoud, G. 2012. Cultivating Microalgae in Domestic Wastewater for Biodiesel Production. *Notulae Scientia Biologicae* 4 (1). 56–65 [viitattu 18.7.2013]. Saatavissa: <http://notulaebiologicae.ro/index.php/nsb/article/view/7298>

Muovimuotoilu. Tekniset muovit [viitattu 11.4.2013]. Saatavissa: <http://www.muovimuotoilu.fi/content/view/33/62>

Nordin, R. 1985. Water quality criteria for nutrients and algae. Ministry of environment, British Columbia. Saatavissa: <http://www.env.gov.bc.ca/wat/wq/BCguidelines/nutrients/nutrientstech.pdf>

Oilgae. 2013. Ethanol from Algae [viitattu 4.4.2013]. Saatavissa: <http://www.oilgae.com/algae/pro/eth/eth.html>

Park, J. & Craggs, R. 2011. Nutrient removal in wastewater treatment high rate algal ponds with carbon dioxide addition. *Water Science & Technology* 63.8. 1758-1764 [viitattu 18.7.2013]. Saatavissa PubMed-tietokannasta: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21866778>

Pohjois-Pohjanmaan ELY. 2011. Sanasto. Valtion ympäristöhallinto [viitattu 5.4.2013]. Saatavissa: <http://www.ymparisto.fi/default.asp?contentid=166171>

Posten, C. 2009. Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Engineering in Life Sciences* 2009, 9, No. 3, 165-177 [viitattu 18.7.2013]. Saatavissa Wiley Online Library -tietokannasta: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elsc.200900003/pdf>

Renaud, S. & Parry, D. 1994. Microalgae for use in tropical aquaculture II: Effect of salinity in growth, gross chemical composition and fatty acid composition of three species of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, heinäkuu 1994, Volume 6, Issue 3, 347–356 [viitattu 18.7.2013]. Saatavissa ProQuest-tietokannasta:

<http://search.proquest.com.libproxy.helsinki.fi/docview/13680719/abstract?source=fedsrch&accountid=11365>

Rusten, B. & Sahu, A. 2011. Microalgae growth for nutrient recovery from sludge liquor and production of renewable bioenergy. *Water Science & Technology*. 64.6. 1195-1201 [viitattu 18.7.2013]. Saatavissa PubMed-tietokannasta:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22214070>

Salih, F. 2011. Microalgae Tolerance to High Concentrations of Carbon Dioxide: A Review. *Journal of Environmental Protection*, 2011, 2, 648-654 [viitattu 17.7.2013]. Saatavissa Scientific Research -tietokannasta:

<http://www.scirp.org/Journal/PaperDownload.aspx?paperID=6158>

Sialve, B., Bernet, N. & Bernard, O. 2009. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology Advances* 27, 2009. 409-416 [viitattu 18.7.2013]. Saatavissa ScienceDirect-tietokannasta:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975009000457>

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. & Isambert, A. 2006. Commercial Applications of Microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering* vol. 101, no. 2, 2006, 87-96 [viitattu 18.7.2013]. Saatavissa ScienceDirect-tietokannasta:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172306705497>

Suomen ympäristökeskus. 2011a. Jätevesien puhdistus biologinen fosforinpoisto. Valtion ympäristöhallinto [viitattu 10.7.2013]. Saatavissa:

<http://www.ymparisto.fi/default.asp?node=6569&lan=fi>

Suomen ympäristökeskus. 2011b. Typenpoistomenetelmät. Valtion ympäristöhallinto [viitattu 29.8.2013]. Saatavissa:

<http://www.ymparisto.fi/default.asp?node=6571&lan=fi>

Suomen ympäristökeskus. 2011c. Fosforinpoistomenetelmät. Valtion ympäristöhallinto [viitattu 29.8.2013]. Saatavissa: <http://www.ymparisto.fi/default.asp?node=6572&lan=fi>

Suomen ympäristökeskus. 2011d. Biologinen fosforinpoisto. Valtion ympäristöhallinto [viitattu 29.8.2013]. Saatavissa: <http://www.ymparisto.fi/default.asp?node=6573&lan=fi>

Suomen ympäristökeskus. 2012. Miksotrofia. Valtion ympäristöhallinto [viitattu 8.3.2013]. Saatavissa: <http://www.ymparisto.fi/default.asp?node=12939&lan=fi>

Svenskt Gastekniskt Center. 2012. Basic Data on Biogas [viitattu 17.7.2013]. Saatavissa: http://www.energigas.se/~media/Files/www_energigas_se/Publikationer/Infomaterial/BasicDataonBiogas2012.ashx

Tikka, M. 2011. Humusjärvien planktisten levien soveltuvuus biodieselin raaka-aineeksi. Lahti: Helsingin yliopisto, ympäristötieteiden laitos. Pro gradu -tutkielma.

Tirronen, R. (toim.) 2008. Biobutanolista kehitetään bensiinin korvaajaa. Suomen Akatemia [viitattu 4.4.2013]. Saatavissa: <http://www.aka.fi/fi/T/Tiedeuutiset2/Arkisto/TietystiUutiset/Biobutanolista-kehitetaan-bensiinin-korvaajaa/>

United States Environmental Protection Agency. 2013. Phosphorus [viitattu 9.12.2013]. Saatavissa: <http://water.epa.gov/type/rsl/monitoring/vms56.cfm>

Valkonen, K. & Viitanen, M. 15.10.2012. A bioreactor performance test with Selenastrum.

Valkonen, K. 2013. Opinnäytetyö tähän asti [sähköpostiviesti]. Vastaanottaja Viitanen, M. Lähetetty 17.4.2013.

Valtioneuvoston asetus talousjätevesien käsittelystä viemäriverkostojen ulkopuolisilla alueilla 209/2011. Saatavissa: <http://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2011/20110209>

Valtioneuvoston asetus yhdyskuntajätevesistä 888/2006. Saatavissa:

<http://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2006/20060888>

Vesihuoltolaki 119/2001. Saatavissa:

<http://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/2001/20010119>

Vuontisjärvi, N. 2012. Leväkasvatusreaktorin asennointi ja testaus. Lahden ammattikorkeakoulu, tekniikan ala [viitattu 2.4.2013]. AMK-opinnäytetyö.

Saatavissa Theseus-tietokannasta: <http://urn.fi/URN:NBN:fi:amk-2012120918753>

Wang, L., Li, Y., Chen, P., Min, M., Chen, Y., Zhu, J. & Ruan, R. 2010.

Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella* sp. *Bioresource Technology* 101 (2010). 2623-

2628 [viitattu 8.10.2013]. Saatavissa ScienceDirect-tietokannasta:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852409014382>

Wikipedia. 2013a. Etanoli [viitattu 4.4.2013].

<http://fi.wikipedia.org/w/index.php?title=Etanoli&oldid=12989619>

Wikipedia. 2013b. Hiilidioksidi [viitattu 3.4.2013]. Saatavissa:

<https://fi.wikipedia.org/w/index.php?title=Hiilidioksidi&oldid=12939736>

Wiley, P., Campbell, J. & McKuin, B. 2011. Production of Biodiesel and Biogas from Algae: A Review of Process Train Options. *Water Environment Research*, vol. 84, nro 4. 326-338 [viitattu 18.7.2013]. Saatavissa PubMed-tietokannasta:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21553588>

Yen, H. & Brune, D. 2005. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. *Bioresource Technology* 98 (2007). 130-134 [viitattu 18.7.2013]. Saatavissa PubMed-tietokannasta:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16386894>

Ympäristönsuojelulaki 86/2000. Saatavissa:

<http://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/2000/20000086>

LIITTEET

LIITE 1. Mikroleväkasvatusten data taulukoituna

Kujalan kompostin puristevesi:

TAULUKKO 1. Kujala-jäteveden leväkasvateäyhteistä mitatut ravinteet (mg/l) sekä vähenemä (%). Merkintä x tarkoittaa, ettei ajankohdalta ole mitattu kyseistä parametria.

Kasvatusaika (vrk)	Fosfaatti	Kokonaisfosfori	Nitraatti	Ammonium	Kokonaistyppe	KHK
0	18,5	22,8	3,30	45,7	95,7	2180
4,88	7,49	9,92	1,56	0,05	31,3	518
6,87	2,56	4,27	2,76	0,05	21,0	x
11,87	5,88	7,20	0,51	10,9	32,0	x
13,86	4,56	6,06	1,36	3,31	20,3	x
16,84	5,02	6,92	1,37	0,11	16,2	444
Muutos yhteensä %	-72,9	-69,6	-58,6	-99,77	-83,0	-79,6

TAULUKKO 2. Kujalan kompostijätevedestä punnittujen kuivapainojen keskiarvot, keskihajonta ja keskimääräinen kasvu vuorokautta kohden.

Kasvatusaika (vrk)	Kuivapainojen keskiarvo (g/l)	Kuivapainojen keskihajonta	Kasvun muutos keskimäärin (g/l/vrk)
0	0,091	0,004	0
2,97	0,511	0,006	0,141
4,88	0,703	0,066	0,101
6,87	0,891	0,126	0,094
9,96	0,698	0,050	-0,063
11,87	0,774	0,012	0,040
13,87	0,933	0,031	0,080
16,84	1,221	0,013	0,097

TAULUKKO 3. Mikrolevän solumäärän kasvu Kujala-jätevedessä. Solumäärää ei ole ilmoitettu niistä näytteistä, joissa ei ole havaittu selkeää leväpopulaatiota.

Kasvatusaika (vrk)	Solumäärä ($\times 10^6$ /ml)
0,00	-
2,97	-
4,88	5,801
6,87	9,167
9,96	23,44
11,87	27,22
13,86	30,94
16,84	48,06

Mädättämön rejektivesi:

TAULUKKO 4. Rejektijäteveden leväkasvatenäytteistä mitatut ravinteet (mg/l).

Viiva (-) tarkoittaa pitoisuuden olleen alle ravinnetestikitin määrittämissä rajoissa.

Merkillä * on osoitettu tulos, jossa on ilmoitettu mitattujen ammonium- ja kokonaistyyppipitoisuuksien keskiarvo. Merkintä x tarkoittaa, ettei ajankohdalta ole mitattu kyseistä parametria.

Kasvatusaika vrk	Fosfaatti	Kokonaisfosfori	Nitraatti	Ammonium	Kokonaistyyppi	KHK
0	12,0	12,2	1,66	134*	134*	576
6,98	5,72	6,70	1,56	94,5	100	182
13,88	-	6,20	1,64	50,7	57,6	x
19,96	-	-	1,66	28,0*	24,4*	108
29,02	-	-	1,55	6,32	24,5	x
36,83	-	-	1,89	8,49	19,4	99,6
Muutos yhteensä %	>-98,0	>-98,0	+13,8	-93,7	-85,7	-82,7

TAULUKKO 5. Rejektijätevedestä punnitut kuivapainojen keskiarvot, keskihajonta ja keskimääräinen kasvu vuorokautta kohden.

Kasvatusaika (vrk)	Kuivapainojen keskiarvo (g/l)	Kuivapainojen keskihajonta	Kasvun muutos keskimäärin (g/l/vrk)
0,00	0,035	0,001	0
1,82	0,173	0,008	0,076
6,98	0,601	0,017	0,083
8,81	0,701	0,006	0,055
12,06	0,733	0,058	0,010
13,88	1,058	0,014	0,178
15,99	1,079	0,064	0,010
19,96	1,542	0,055	0,116
21,01	1,720	0,021	0,170
22,82	1,914	0,020	0,107
25,92	1,925	0,018	0,003
29,02	1,737	0,020	-0,061
29,82	2,321	0,017	0,730
33,93	2,523	0,015	0,049
35,94	2,641	0,048	0,059
36,83	2,677	0,031	0,040

TAULUKKO 6. Mikrolevän solumäärän kasvu rejektijätevedessä. Solumäärää ei ole ilmoitettu näytteestä, jossa ei ole havaittu selkeää leväpopulaatiota.

Kasvatusajalta 22,82 otettu näyte kestävästiin 50 µl:lla Lugolin liuosta 20 µl:n sijasta.

Kasvatusaika (vrk)	Solumäärä ($\times 10^6$ /ml)
0	x
1,82	5,291
6,98	14,79
8,81	20,57
13,88	46,84
19,96	74,47
22,82	74,68
26,92	87,32
29,82	89,82
33,93	86,35
36,83	99,62

Kontrollikasvatus:

TAULUKKO 7. Kontrollikasvatuksen näytteistä mitatut ravinteet (mg/l). Viiva (-) tarkoittaa pitoisuuden olleen alle määrittäysrajan. Merkillä * on osoitettu tulos, jossa on ilmoitettu mitattujen nitraatti- ja kokonaistyyppipitoisuuksien keskiarvo. Merkintä x tarkoittaa, ettei ajankohdalta ole mitattu kyseistä parametria.

Kasvatusaika (vrk)	Fosfaatti	Kokonaisfosfori	Nitraatti	Ammonium	Kokonaistyyppi	KHK
0	16,4	27,0	94,8*	0,98	94,8*	5100
8,01	2,06	5,24	-	1,10	14,7	228
20,00	-	1,88	0,46	0,28	12,1	198
27,00	-	1,66	0,51	0,11	11,4	194
34,84	-	1,29	0,44	0,08	5,04	137
Muutos yhteensä %	>-96,9	-95,2	-99,5	-94,5	-94,7	-97,3

TAULUKKO 8. Kontrollikasvatuksesta punnitut kuivapainojen keskiarvot, keskihajonta ja keskimääräinen kasvu vuorokautta kohden.

Kasvatusaika (vrk)	Kuivapainojen keskiarvo (g/l)	Kuivapainojen keskihajonta	Kasvun muutos keskimäärin (g/l/vrk)
0,00	0,083	0,004	0,000
2,01	0,300	0,025	0,108
6,00	0,209	0,016	-0,023
8,01	0,355	0,004	0,072
10,01	0,252	0,077	-0,051
14,03	0,667	0,015	0,103
20,00	1,009	0,011	0,057
22,01	1,313	0,001	0,152
27,00	1,799	0,009	0,097
29,01	1,939	0,034	0,070
30,94	2,123	0,122	0,095
34,84	2,079	0,116	-0,011

TAULUKKO 9. Kontrollikasvatuksesta mitatut solumäärien kasvut. Solumäärää ei ole ilmoitettu näytteistä, joissa ei ole havaittu selkeää leväpopulaatiota.

Kasvatusaika (vrk)	Solumäärä ($\times 10^6$ /ml)
0,00	0,49
6,00	-
9,01	-
14,03	10,77
20,00	50,66
22,01	56,59
27,00	67,10
30,94	68,13
34,84	70,54