RAVINTEIDEN SITOMINEN MIKROLEVIEN AVULLA SUOTOVEDEN ALLASKÄSITTELYSSÄ

HAMK
HÄMEEN AMMATTIKORKEAKOULU
HÄME UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Ammattikorkeakoulututkinnon opinnäytetyö

Hämeenlinna, Bio- ja elintarviketekniikka

Kevät, 2019

Karl Nieminen

HÄMEEN AMMATTIKORKEAKOULU
HÄME UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Bio- ja elintarviketekniikka
Hämeenlinna

Tekijä Karl Nieminen **Vuosi** 2018

Työn nimi Ravinteiden sitominen mikrolevien avulla suotoveden allaskäsittelyssä

Työn ohjaajat Maritta Kymäläinen & Tuija Pirttijärvi

TIIVISTELMÄ

Opinnäytetyö tehtiin osana Hämeen ammattikorkeakoulussa käynnissä olevaa Leväsieppari-hanketta. Hanke toteuttaa hallituksen Kiertotalouden läpimurto ja puhtaat ratkaisut käyttöön -kärkihanketta, ja sen rahoittajana toimii ympäristöministeriö. Hankkeen tavoitteena on jätevesien ravinteiden talteenotto ja kierrätys leväbiomassalla.

Tässä opinnäytetyössä rakennettiin leväkasvatusallas Hämeenlinnan Karanojan jätteidenkäsittelyalueen suotoveden käsittelyyn. Työssä selvitettiin altaan toimivuutta sekä altaaseen istutetun mikrolevän kasvua ja ravinteiden pidätyskykyä suotovedessä. Käsittelyt toteutettiin muutaman vuorokauden mittaisina koejaksoina kesän 2018 aikana. Analysoinnit tehtiin HAMKin Visamäen laboratoriossa.

Leväallas oli rakenteeltaan toimiva ratkaisu, jossa mm. tasainen sekoitus ja virtaus onnistuivat hyvin. Hallitsevaksi leväkannaksi altaassa valikoitui *Chlorella*-lajin mikrolevä. Levä kasvoi nopeasti ja ravinteiden poistumat suotovedestä olivat hyvällä tasolla. Altaassa saavutettiin parhaimmillaan n. 1,3 g/litra leväpitoisuus. Typpivähenemä oli yli 90 % ja fosforivähenemäkin parhaimmillaan n. 88 %. Suotoveden pH nousi leväkasvatuksen aikana, sillä altaassa ei käytetty pH-säätöä. Näin ollen typpipoistumasta osa vapautui ilmaan ammoniakkina. Jatkossa altaan pH-säätö onkin yksi kehityskohde typen talteenoton onnistumiseksi. Muita kehityskohteita ovat mm. levän talteenotto ja levän jatkokäyttömahdollisuudet.

Avainsanat Mikrolevä, ravinteet, suotovesi

Sivut 37 sivua, joista liitteitä 2 sivua

HÄMEEN AMMATTIKORKEAKOULU
HÄME UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Engineering
Hämeenlinna University Centre

Author	Karl Nieminen	**Year** 2018
Subject	Removal of Nutrients from Leachate Using Outdoor Pond-cultured Microalgae	
Supervisors	Maritta Kymäläinen & Tuija Pirttijärvi	

ABSTRACT

This Bachelor's thesis was a part of a project called Leväsieppari at Häme University of Applied Sciences. The still ongoing project is part of Key Government Project 'Circular Economy's Breakthroughs' funded by the Ministry of the Environment. The project aims at the reclamation and recycling of nutrients such as nitrogen and phosphorus by using microalgae.

In this thesis, the focus was to determine the growth factors and the functionality of the cultivation of the microalgae in a pond that's located in Karanoja Waste Treatment Centre in Hämeenlinna. The functionality of the method was determined by the results of standardized laboratory analyses, such as ammoniacal (NH_4^+) and total nitrogen, total suspended solids and phosphorus.

The results showed that the microalgae cultivation was successful, since the algae appeared to grow rather fast. In addition, the nutrient absorption was fairly good. Although the removal of the nutrients was not complete, all the cultivated microalgae batches could reduce the ammoniacal nitrogen by at least 94 %. In case of total nitrogen and phosphorus, only with the third batch it was possible to reduce their amount by 92 % and 88 %.

Based on the results, even if it is possible with the algae to remove all the nutrients from the water, a method to harvest algae would still be needed to achieve complete water cleaning efficiency. Finally, in order to get better results, it is recommended to improve the cultivation methods by regulating the conditions, for example, by adjusting the pH.

Keywords Microalgae, nutrients, leachate

Pages 37 pages including appendices 2 pages

SISÄLLYS

1 JOHDANTO 1

2 MIKROLEVÄT JA NIIDEN KASVATUS 2

2.1 Mikrolevän kasvuun vaikuttavia tekijöitä 3
2.1.1 Valo 4
2.1.2 Hiilenlähde 4
2.1.3 Ravinteet 5
2.1.4 Lämpötila 5
2.1.5 pH 5
2.1.6 Sekoitus 6
2.2 Mikrolevän panoskasvatus 6
2.3 Mikrolevän jatkuvatoiminen kasvatus 7
2.4 Mikrolevän puolijatkuvatoiminen kasvatus 8

3 CHLORELLA VULGARIS 8

3.1 Allaskasvatus 8
3.2 Ominaisuudet ja käyttö 9

4 LEVÄKASVATTAMON RAKENTAMINEN JA TOIMINTA 10

4.1 Altaan suunnittelu ja valmistelu 10
4.2 Rakennustyöt ja kasvatusten aloittaminen 11
4.3 Kasvattamon toiminta 12
4.4 Suotovesi 13
4.5 Näytteenotto 14

5 MIKROLEVÄN KASVATUS SEKOITUSALTAASSA 15

5.1 1. panoskasvatus 15
5.2 2. panoskasvatus 16
5.3 3. panoskasvatus 17
5.4 Puolijatkuva kasvatus 18

6 ANALYYSIT JA MENETELMÄT 18

6.1 OD-mittaus 19
6.2 Kiintoaine 19
6.3 Kokonaistyppi 20
6.4 Ammoniumtyppi 21
6.5 Nitraattityppi 21
6.6 Fosfori 22

7 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU 22

7.1 Leväkasvu 23
7.2 Ravinteiden vähenemä 24
7.2.1 Ammoniumtyppi 24
7.2.2 Typen vähenemätarkastelu 28

7.3 Fosfori-typpi-suhteen tarkastelu 31
7.4 Virhearviointi 32

8 JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA 33

LÄHTEET 35

Liitteet

Liite 1 Leväsuspension kiintoainepitoisuudet ja OD_{686}-tulokset eri kasvatuksissa.

Liite 2 Analyysitulosten keskiarvot ja -hajonnat

1 JOHDANTO

Typpi ja fosfori ovat tärkeitä ravinteita muun muassa maanviljelyssä. Ongelmaksi muodostuu tämän hetkinen ravinteiden kierto, missä iso osa ravinteista poistuu jätevesien mukana vesistöihin. Vesistöissä typpi ja fosfori aiheuttavat rehevöitymistä. Parantuneet vedenpuhdistustekniikat ovat kuitenkin vähentäneet vesistöihin joutuvien ravinteiden määrää, mutta käytetyillä menetelmillä ravinteet ovat poissa ravinnekierrosta. Levien käyttäminen ravinteiden sitomiseen jätevesistä mahdollistaisi vesistöjen puhtaana pitämisen ja ravinteiden talteenoton muun muassa lannoitekäyttöön.

Opinnäytetyö tehtiin osana Leväsieppari-hanketta. Hanke toteuttaa osaltaan Suomen vesienhoidon ja merenhoidon toimenpideohjelmia, joissa esitetään toimet vesien hyvän tilan saavuttamiseksi. Lisäksi hanke toteuttaa hallituksen Kiertotalouden läpimurto ja puhtaat ratkaisut käyttöön -kärkihanketta ja sen rahoittajana toimii ympäristöministeriö. Hankkeessa tavoitteena on jätevesien ravinteiden talteenotto leväbiomassalla. Ravinteiden talteenotto mahdollistaa ravinnekuorman vähentämisen sekä levän käyttämisen ravinnelisänä esimerkiksi lannoitteissa. (Vanajavesikeskus, 2019)

Hankkeessa mukana olevat toimijat ovat Helsingin yliopiston Lammin biologinen asema, Hämeen ammattikorkeakoulu Oy, Tampereen yliopisto, Suomen ympäristökeskus ja Vanajavesikeskus. Hämeen ammattikorkeakoulun vastuu on selvittää levien käyttöä kaatopaikan suotovesien käsittelyssä. Suotovesien käsittelyä demonstroidaan Hämeenlinnassa sijaitsevalla Kiertokapula Oy:n hallinnoimalla Karanojan jätteidenkäsittelyalueella. (Vanajavesikeskus, 2019)

Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää ja seurata Karanojan jätteidenkäsittelyalueelle rakennettavaan leväkasvattamoon istutettavan levän kasvua ja ravinteiden sitomiskykyä. Kasvua seuraamalla voidaan päätellä optimaaliset ajankohdat harvestoida eli kerätä levää kasvattamosta, pitää huoli siitä, että biomassan tuotto pysyy jatkuvana sekä mahdollisesti kartoittaa erilaisten parametrien vaikutus käytetyn lajin kasvuun kaatopaikan suotovedessä ja Suomen kesän olosuhteissa. Käytetty kanta oli *Scenedesmus obliquus* Scene 3 ja se saatiin Helsingin yliopiston Lammin biologiselta asemalta. Kasvatuksen edetessä tasausaltaan suotovedessä luonnostaan elävä *Chlorella*-lajin mikrolevä syrjäytti ympppiä kasvatettaessa toistuvasti *S. obliquus* -mikrolevän. Tästä syystä *Chlorella*-lajin mikrolevää alettiin käyttämään kasvattamossa. Kirjallisuusselvityksessä tarkastellaan hieman *Chlorella vulgaris* -mikrolevää, sillä se on yleinen ja ikoninen *Chlorella*-lajin mikrolevä ja sen ominaisuudet ovat todennäköisesti hyvin lähellä altaassa kasvavaa lajia.

Tutkimuskysymykset:

- Mikä on mikrolevän kasvunopeus allaskasvatuksessa ja siihen vaikuttavat tekijät?
- Kuinka valittu mikrolevä kykenee sitomaan ravinteita (typpi ja fosfori) kaatopaikan suotovedestä allaskasvatuksessa?
- Voidaanko sameusmittausta käyttää leväkasvun seurantaan altaassa?
- Toteutuuko altaassa tasainen kierto ja homogeeninen sekoitus?

2 MIKROLEVÄT JA NIIDEN KASVATUS

Kasveilla ja levillä on yhteisiä piirteitä, mutta leviä ei kuitenkaan voida luokitella kasveiksi. Levät ei ole yhtenäinen ryhmä, vaan voivat olla keskenään hyvin erilaisia. Niin kasvit kuin levät tuottavat samoja varastoyhdisteitä ja molemmilla on samanlaisia puolustusmenetelmiä saalistajia ja loisia vastaan. Joillain levillä ja kasveilla on myös yhteneviä piirteitä niiden anatomiassa, mutta yksisoluisina ne poikkeavat korkeammista kasvilajeista. Korkeampien kasvien uskotaankin kehittyneen juuri viherlevistä. Levillä ei ole juuria, vartta, lehtiä eikä johtosolukkoa ja jokainen solu on lisääntymiskykyinen. Levät myös esiintyvät monenlaisina muodostelmina, aina yksittäisistä soluista monimutkaisiin lehtimäisiin muotoihin. Levät voidaan jakaa mikro- ja makroleviin, joista edelliset voivat olla niinkin pieniä halkaisijaltaan kuin 0,2–4,0 µm ja jälkimmäiset voivat kasvaa jopa 60 metriä pitkiksi. Leviin sisältyy esi- ja aitotumallisia lajeja eikä leville ole vielä löydetty välitöntä yhteistä kantaisää. Vaikka sinilevä eli *Cyanobacteria* on yhteyttävä bakteeri, eikä mikrolevä, sisällytetään se yleensä mukaan mikrolevistä puhuttaessa. (Barsanti & Gualtieri, 2014, s. 1–2; Wang & Lan, 2010, s. 3–4)

Monet levät ovat yksittäisiä soluja, joista osa pystyy liikkumaan flagellan avulla ja osa taas ei. Flagella on käytännössä liikkumiseen tarkoitettu siima. Jotkut levät taas muodostavat suuria yhdyskuntia. Yksisoluisten levien lisääntyminen tapahtuu jakaantumalla, eikä soluilla yhdyskunnissa ole tehtävänjakoa. (Barsanti & Gualtieri, 2014, s. 8–10)

Suurinta osaa levistä voidaan pitää fotoautotrofeina, eli ne ovat omavaraisia ja saavat energiansa auringosta ja hiilidioksidista. Hiilidioksidi toimii hiilenlähteenä hiilihydraateille ja ATP:lle (adenosiinitrifosfaatti). Monet levälajit ovat myös heterotrofeja ja voivat ottaa orgaanisen hiilen muista lähteistä, esimerkiksi hajottamalla muita soluja. Levää, joka on fotoautotrofinen ja heterotrofinen, kutsutaan miksotrofiksi. (Barsanti & Gualtieri, 2014, s. 16–17; Wang & Lan, 2010, s. 5–6, 17)

2.1 Mikrolevän kasvuun vaikuttavia tekijöitä

Mikrolevän kasvuun vaikuttavia tekijöitä ovat muun muassa valon intensiteetti, lämpötila, pH, liuenneen hapen konsentraatio ja ravinteet, kuten typpi ja fosfori sekä energianlähteenä toimiva hiili. Saannon maksimoimiseksi muut muuttujat kuin valo, eivät saisi rajoittaa kasvua. Hiilidioksidia syöttämällä voidaan säätää pH:ta samalla syöttäen mikrolevälle hiiltä energianlähteeksi ja kyllästämällä voidaan vaikuttaa ravinteiden pitoisuuksiin. Mikäli viljelmää ei sekoiteta kunnolla, happi alkaa paikallisesti inhiboimaan levää, tai pitoisuuksissa voi paikallisesti ilmetä puutteita. Lämpötilan säätäminen taas on verrattain hankalaa, mikä johtaa usein lämpötilan muutokseen suuren mittakaavan kasvatuksissa, jos ei haluta panostaa kalliisiin ratkaisuihin. (Béchet, Shilton & Guieysse, 2013, s. 1649)

Levät voivat olla paitsi fotoautotrofeja, myös heterotrofeja (taulukko 1), jolloin ne käyttävät orgaanista hiiltä muodostaakseen hiilihydraatteja, muita solurakenteita ja ATP:tä. Yleensä hiilen lähteenä toimii hiilidioksidi, mutta joissain tapauksissa on joidenkin mikrolevälajien käytettävä muita orgaanisen hiilen lähteitä, esimerkiksi toisia soluja. Hiilen lisäksi typpi, fosfori ja kalium ovat mikrolevien tärkeimpiä ravinteita, eikä ilman niitä mikrolevät pysty lisääntymään. Tärkeää fotoautotrofisille mikroleville on myös valon saanti, jotta yhteyttäminen on mahdollista. (Barsanti & Gualtieri, 2014, s. 16–17; Béchet ym., 2013, s. 1649–1650; de Godos, Arbib, Lara & Rogalla, 2016, s. 254; Wang & Lan, 2010, s. 5–6, 17)

Taulukko 1. Mikrolevien kasvutapoja (Perez-Garcia & Bashan, 2015, s. 62)

Growth mode	Energy source	Carbon source	Light availability requirements	Metabolism variability
Photo-autotrophic	Light	Inorganic	Obligatory	No switch between sources
Heterotrophic	Organic	Organic	No requirements	Switch between sources
Photoheterotrophic	Light	Organic	Obligatory	Switch between sources
Mixotrophic	Light and organic	Inorganic and organic	No obligatory	Simultaneous utilization

2.1.1 Valo

Mikrolevän kasvuun vaikuttaa oleellisesti valon intensiteetti. Mikäli valoa on liian vähän, rajoittaa fotosynteesiä fotonien puute. Jos valoa taas on liikaa, alkaa levässä olevat fotosynteesille oleelliset proteiinit sammumaan, mikä johtaa fotosynteesin hidastumiseen valoinhibition vuoksi. Levän kasvulle parasta olisi saada valaistus tällä välille. Yleisesti käytetty valon intensiteetti on välillä 100–200 µE $sec^{-1}m^{-2}$. Suhdetta yhden solun fotosynteesin ja valon intensiteetin välillä kuvataan usein PI-suhteella, missä P tarkoittaa fotosynteesin nopeutta ja I valon intensiteettiä. Tarkasta matemaattisesta mallista ei kuitenkaan ole yksimielisyyttä, täten malleja on useita. (Béchet ym., 2013, 1649–1650; Barsanti & Gualtieri, 2014, s. 227; Wang & Lan, 2010, s. 22)

Valon määrä on tärkeä ottaa huomioon varsinkin, kun levää kasvatetaan ulko-olosuhteissa. Päivänvalon intensiteetti on tavallisesti noin 2 000 µE $sec^{-1}m^{-2}$. Yleensä fotosynteesin saturaatiota tapahtuu valon intensiteetin ollessa 1 700–2 000 µE $sec^{-1}m^{-2}$. Ulkokasvatuksessa on tärkeää, että jokainen solu saisi valoa samalla intensiteetillä. Leväkasvuston konsentraatio on kuitenkin tärkeää pitää mahdollisimman korkealla, jotta maksimoidaan tuotto kaupallisessa tuotannossa. Suuri konsentraatio levää taas johtaa usein siihen, että valoa ei pääse tasaisesti kaikkialle, vaikka kasvustoa sekoitettaisiinkin hyvin. Yksittäisen solun valonsaanti voi myös vaihdella jatkuvasti sekoituksesta johtuen, mikä saattaa vähentää valon aiheuttamaa inhibitiota. (Béchet ym., 2013, s. 1649–1650; Wang & Lan, 2010, s. 22)

2.1.2 Hiilenlähde

Hiilenlähteet voidaan jakaa orgaanisiin ja epäorgaanisiin. Hetero- ja miksotrofiset mikrolevät käyttävät pääsääntöisesti orgaanisena hiilenlähteenä erilaisia sokereita, kuten glukoosia ja sakkaroosia. Epäorgaanisena hiilenlähteenä autotrofisille mikroleville toimii yleensä hiilidioksidi (CO_2). Orgaanisesta tai epäorgaanisesta hiilestä mikrolevät muodostavat hiilihydraatteja. Hiilihydraateista mikrolevät muodostavat monimutkaisia orgaanisia yhdisteitä, esimerkiksi rasvoja, öljyjä ja muita vastaavia aineita, jotka toimivat solujen rakennusaineina. Sivutuotteena mikrolevien metabolian ja lisääntymisen seurauksena syntyy happea (O^2) ja hydroksidi-ioneita (OH^-). Syntyvät hydroksidi-ionit aiheuttavat pH:n nousua liuoksessa, mikäli liuosta ei neutraloida hiilidioksidilla. (Thiansathit, Keener, Khang, Ratpukdi & Hovichitr, 2015, s. 79) Useimpien levälajien kasvunopeus nousee huomattavasti, kun liuoksen hiilidioksidipitoisuutta nostetaan 5–7 % :iin. Jos pitoisuus kuitenkin nousee liian korkeaksi, alkaa se inhiboimaan levän kasvua. (Schnurr & Allen, 2015, s. 424; Wang & Lan, 2010, s. 18)

2.1.3 Ravinteet

Tutkimusten mukaan mikrolevien kasvulle on oleellista ravinteiden, kuten hiilen, typen, fosforin ja kaliumin suhde (Kumar, Guria & Pathak, 2018, s. 1070). Antamalla mikroleville typpeä ja fosforia, voidaan nostaa mikrolevien biomassan kertymistä ja yleistä kasvunopeutta, mutta liian suuret määrät voivat alkaa inhiboimaan kasvua (Schnurr & Allen, 2015, s. 424–425). Jätevedet toimivat monesti hyvinä ja lähes ilmaisina typen ja fosforin lähteinä. Jätevesissä kasvatettavalle levälle suositellaan kuitenkin ylimääräistä hiilenlähdettä, kuten hiilidioksidia, sillä hiilen ja typen suhde jätevesissä on melko matala levän kasvatukseen. (de Godos ym., 2016, s. 254)

Mikrolevän alkuaineista koostuvasta rakenteesta voidaan saada vihjeitä, millainen typen ja fosforin suhde olisi optimaalinen niiden kasvulle. Stummin empiirinen kaava mikroleville on $C_{106}H_{263}O_{110}N_{16}P$. Kaava viittaisi typen ja fosforin moolisuhteeksi 7,2:1. On kuitenkin huomioitava eri lajien ja ympäristön vaikutus mikrolevien koostumukseen. Tutkimuksessa myös havaittiin, että vaikka typen ja fosforin suhde oli 2:1, *S. obliquus* -mikrolevät sitoivat fosforia kuitenkin yhtä tehokkaasti kuin sen ollessa 4:1 (Xin, Hongying, Ke & Ying-xue, 2010, s. 5498). Kun typen ja fosforin suhde oli 12:1, sitoivat levät ravinteita suhteella 10:1, kun taas suhde oli 20:1, levät sitoivat ravinteita suhteella 9:1. Kaikkea typpeä ei saatu sidottua liian vähäisen fosforipitoisuuden vuoksi. Mikäli mikroleville optimaalinen typen ja fosforin suhde on 7,2:1, tarkoittaisi tämä, että *S. obliquus* kykenisi sitomaan ylimääräistä typpeä ja fosforia, kun kasvualustan ravinteet eivät vastaa optimia. (Xin ym. 2010, s. 5498)

2.1.4 Lämpötila

Tyypillisesti suurin osa viljellyistä mikrolevistä sietää lämpötiloja väliltä 16–25 °C. Optimilämpötila useimmille mikroleville on noin 25 °C, mutta tämä voi vaihdella suuresti riippuen kasvualustasta, lajista ja mikroleväkannasta. Yleensä kasvatuksessa käytetään lämpötilaväliä 18–20 °C. Kasvatuksessa olisi kuitenkin hyvä käyttää lämpötiloja, joihin kasvatukseen kerätyt organismit ovat jo tottuneet luonnossa. Lämpötilan alittaessa 16 °C mikrolevien kasvu yleensä hidastuu ja yli 35 °C:n lämpötilat ovat monelle lajille tappavia. (Barsanti & Gualtieri, 2014, s. 227; Wang & Lan, 2010, s. 22)

2.1.5 pH

Yleisimmin viljellyille mikrolevälajeille käytetty pH on välillä 7–9, optimi on kuitenkin yleensä 8,2–8,7. On kuitenkin lajeja, jotka viihtyvät happamammassa tai emäksisemmässä ympäristössä. Mikrolevän metabolian seurauksena syntyvät hydroksidi-ionit aiheuttavat pH:n nousua liuoksessa, mikäli liuosta ei neutraloida hiilidioksidilla. Liian alhainen pH voi kuitenkin inhiboida levien kasvua. (Barsanti & Gualtieri, 2014, s. 227–228; Thiansathit ym., 2015, s. 79; Wang & Lan, 2010, s. 23)

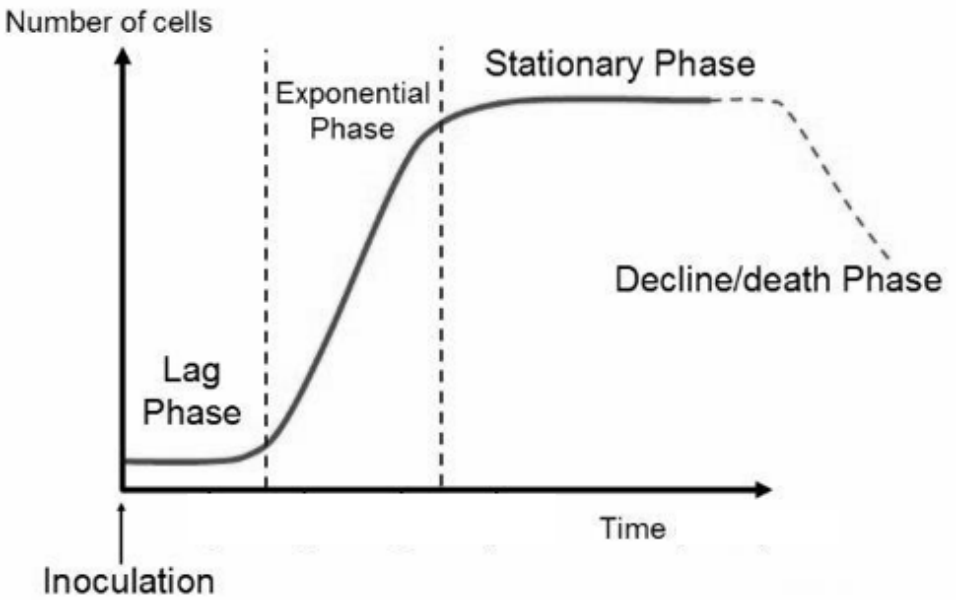
2.1.6 Sekoitus

Sekoituksella ehkäistään mikrolevän sakkautuminen pohjalle ja mahdollistetaan tasainen valon ja ravinteiden saanti. Sekoitus myös parantaa lämmön siirtymistä kasvatuksessa sekä kaasunvaihtoa kasvualustan ja ilman välillä. Kaasunvaihto mahdollistaa leville paremman hiilidioksidin saatavuuden ilmasta. Sekoituksen tarve riippuu paljon tilanteesta, sillä kaikki lajit eivät pysty kasvamaan kovassa virtauksessa ja monet tulevat toimeen täysin ilman sekoitusta. Yleensä kuitenkin pieni virtaus edesauttaa kasvua. (Barsanti & Gualtieri, 2014, s. 228; Wang & Lan, 2010, s. 25)

2.2 **Mikrolevän panoskasvatus**

Panoskasvatus on suosittu sen yksinkertaisuuden ja alhaisen hinnan vuoksi. Panoskasvatuksessa tilavuus on rajattu, eikä sieltä poisteta tai sinne lisätä materiaaleja kasvatuksen aikana. Mikrolevän tuottamat tuotteet ja solumassa kasvavat jatkuvasti, kunnes jokin tekijä esimerkiksi ravinteiden puute, alkaa rajoittamaan mikrolevän kasvua. Tämä voi lopulta johtaa mikrolevien kuolemiseen ravinteiden ehtyessä tarpeeksi. (Barsanti & Gualtieri, 2014, s. 253)

Mikrolevän kasvu voidaan jakaa kuuteen vaiheeseen. Ensimmäistä vaihetta kutsutaan lag-vaiheeksi, jolloin kasvunopeus on lähes nolla ja mikrolevä totuttelee uuteen kasvuympäristöönsä (kuva 1, s. 7). Toinen vaihe on kiihtyvä, missä kasvunopeus kasvaa, kunnes se saavuttaa maksimikasvunopeuden. Tätä vaihetta kutsutaan eksponentiaaliseksi vaiheeksi, ja populaation kasvu alkaa muuttamaan kasvuympäristöä. Neljäs vaihe on hidastuva, missä kasvunopeus laskee ja kasvuympäristön muutokset alkavat ilmentyä. Hidastuvan vaiheen jatkuessa saavutetaan stationäärivaihe, missä kasvunopeus on pysähtynyt ja jokin, esimerkiksi ravinne, on kulutettu loppuun. Viimeisenä vaiheena on laskeva vaihe, missä kasvunopeus on negatiivinen. (Barsanti & Gualtieri, 2014, s. 254)



Kuva 1. Mikrobikasvun vaiheet (Orbit Biotech™, 2018)

Lag-vaihetta voidaan kuitenkin minimoida ymppäämällä eksponentiaalisen kasvun vaiheessa olevaa ymppiä kasvualustaan. Eksponentiaalinen vaihe kestää kuitenkin melko vähän aikaa, sillä solujen määrän lisääntyessä ne alkavat varjostaa toisiaan, jolloin valon määrä laskee. Valon määrän lasku ei kuitenkaan ole ainoa syy kasvun hidastumiselle, vaikkakin tässä vaiheessa se on suurin. Kasvatuksen onnistumiselle tärkeintä on saada ylläpidettyä eksponentiaalisen kasvun vaihetta. Yleensä muissa, kuin eksponentiaalisen kasvun vaiheessa, solujen ominaisuudet, kuten solun koko, ravinteiden koostumus ja metaboliset toiminnot, vaihtelevat suuresti. Tästä syystä niistä analysoitujen tulosten määrittäminen hankaloituu. Vastaavasti eksponentiaalisen kasvun aikana solujen ominaisuudet taas pysyvät muuttumattomina. Kasvuajan määrittely on myös huomattavasti epätarkempaa, mikäli kasvatus tapahtuu luonnossa esiintyvässä kasvualustassa. (Barsanti & Gualtieri, 2014, s. 255)

2.3 **Mikrolevän jatkuvatoiminen kasvatus**

Jatkuvatoimisessa kasvatuksessa mikrolevän kasvuun tarvittavia resursseja ei päästetä koskaan ehtymään ja siinä ylläpidetään valittua kasvun vaihetta. Tämä saavutetaan lisäämällä tarvittava määrä tuoretta kasvualustaa ja poistamalla viljelmää lisätyn tilavuuden verran. Jatkuvatoiminen kasvatus voidaan jakaa kahteen kategoriaan, turbidostaattiseen ja kemostaattiseen. Turbidostaattinen kasvatus tarkoittaa sitä, että kasvualustaa lisätään vasta, kun solujen tiheys ylittää ennalta määrätyn pisteen. Solujen tiheyttä voidaan määrittää sameutta mittaamalla. Kemostaattisella kasvatuksella taas tarkoitetaan sitä, että uutta kasvualustaa lisätään aina tietyin väliajoin, riippumatta solujen tiheydestä. (Barsanti & Gualtieri, 2014, s. 256)

Jatkuvatoimisessa kasvatuksessa tärkeää on löytää oikeat ajankohdat lisätä kasvualustaa. Liian tiheä lisäys johtaa siihen, että viljelmää poistuu reaktorista nopeammin kuin siellä lisääntyy. Tämä johtaa lopulta viljelmän huuhtoutumiseen. Täysin päinvastainen ongelma taas syntyy, jos kasvualustaa lisätään liian harvoin. Tässä tapauksessa viljelmän ravinteet loppuvat ja viljelmä ei tuota niin hyvin kuin se voisi. (Barsanti & Gualtieri, 2014, s. 257)

2.4 **Mikrolevän puolijatkuvatoiminen kasvatus**

Puolijatkuvatoimisessa kasvatuksessa tuoretta kasvualustaa lisätään tietyin väliajoin viljelmään. Kun tarvittava määrä kasvualustaa on lisätty, annetaan viljelmän kasvaa haluttu aika, ja tehdään sama toimenpide uusiksi. Puolijatkuvatoimiselle kasvatukselle ominaista on osittainharvestointi. Eli osa viljelmästä harvestoidaan ja osa jätetään kasvamaan seuraavaan erään. Ongelmaksi saattaa kuitenkin muodostua kontaminantit, saalistajat, kilpailijat ja solujen metaboliasta syntyvät tuotteet. Tämä saattaa tehdä viljelmästä hyödyttömän myöhempää käyttöä varten. (Barsanti & Gualtieri, 2014, s. 256–257)

3 **CHLORELLA VULGARIS**

C. vulgaris on pyöreänmuotoinen mikroskooppinen solu, jonka halkaisija vaihtelee 2–10 µm välillä. Solu ei pysty liikuttamaan itseään ja lisääntyy suvuttomasti. Optimaalisissa olosuhteissa yksi solu jakaantuu 24 tunnin välein neljään tytärsoluun soluseinän sisällä. Lopulta soluseinä puhkeaa ja tytärsolut käyttävät emosolun jäänteet ravinnoksi. (Safi, Zebib, Merah, Pontalier & Vaca-Garcia, 2014, s. 265–278)

3.1 **Allaskasvatus**

Allaskasvatus on yleisin ja halvin tapa kasvattaa isossa mittakaavassa biomassaa. Auringonvalon maksimoimiseksi altaan optimaalinen syvyys on 15–50 cm. Kuitenkin ongelmia avonaisessa allaskasvatuksessa on veden haihtuminen, kontaminaatio, toiset levät ja bakteerit sekä mahdollinen riski saastuttaa ympäristöä. Myös vuodenaikojen vaihteluun, hiilidioksidin saantiin tai liialliseen auringon valolle altistumiseen ei voida vaikuttaa. Altaan sekoittaminen on yleisesti suositeltua ja käytettyä, sillä se mahdollistaa tasaisemman valonsaannon kaikille soluille. Biomassan kasvaessa alkaa toiset solut varjostamaan syvemmällä olevia soluja. (Safi ym., 2014, s. 265–278)

C. vulgaris ei tarvitse valoa, sillä se voi kasvaa myös heterotrofisesti, kunhan sillä on jokin orgaaninen hiilenlähde. Yleisiä hiilenlähteitä ovat asetaatti, glyseroli, glutamaatti ja glukoosi, joista viimeisimmällä saavutetaan paras kasvunopeus. Kuitenkin heterotrofinen kasvatus on kallista, ja sokereiden saatavuus voi aiheuttaa haasteita. Kuitenkin lajia on myös mahdollista kasvattaa miksotrofisesti, missä yhdistetään heterotrofinen kasvatus ja tyypillinen autotrofinen kasvatus. Miksotrofisessa kasvatuksessa *C. vulgaris* ei ole täysin riippuvainen valosta eikä orgaanisesta substraatista. Tässä kasvatuksessa saadaan hillittyä pimeään aikaan tapahtuvaa biomassan kasvun hidastumista, mikä normaalissa autotrofisessa kasvatuksessa johtaa yleensä pieneen potentiaalisen biomassan menetykseen. (Safi ym., 2014, s. 265–278)

3.2 **Ominaisuudet ja käyttö**

Täysikasvuisen *C. vulgaris* -mikrolevän biomassan kuivapainosta 42–58 % koostuu proteiineista ja optimaalisissa kasvuolosuhteissa rasvapitoisuus vaihtelee 5–40 %:n välillä. Hiilihydraattipitoisuus voi olla 12–55 %, mikäli kasvatuksessa on rajoitettu typen saantia. *C. vulgaris* sisältää myös pigmenttejä, kuten klorofylliä, eli lehtivihreää, ja karotenoideja sekä mineraaleja ja vitamiineja, kuten kaliumia, sinkkiä, magnesiumia ja useita eri vitamiineja. (Safi ym., 2014, s. 265–278)

Chlrorella-lajin mikrolevät, kuten *C. vulgaris* ovat varteenotettavia vaihtoehtoja tuotannon näkökulmasta, sillä ne kestävät hyvin haastavia olosuhteita ja kilpailijoita. Ongelmaksi on havaittu se, että vaikka rasva- ja tärkkelyspitoisuus kasvavat, biomassan tuotanto ja proteiinipitoisuus laskevat olosuhteiden ollessa epäsuotuisia. Toisin sanoen mikrolevä tuottaa stressaantuneessa tilassa enemmän rasvoja, mutta solujen jakaantumisen hidastuttua biomassan määrä laskee. Tästä syystä kokonaisuudessaan stressaavissa olosuhteissa kasvatetut levät saattavat tuottaa vähemmän rasvoja kuin suotuisissa olosuhteissa kasvatetut levät. Nämä ominaisuudet ovat johtaneet useiden eri kasvatustapojen kokeiluun esimerkiksi juuri rasvojen tai proteiinien tuottamiseksi. (Safi ym., 2014, s. 265–278; Wang & Lan, 2010, s. 18)

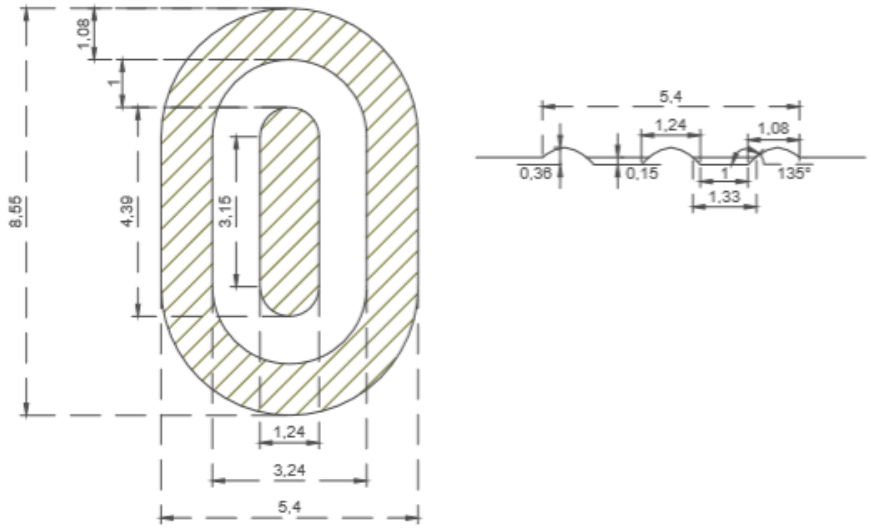
Ominaisuuksiensa ansiosta *C. vulgaris* soveltuu moniin eri käyttötarkoituksiin. Korkean rasvapitoisuuden vuoksi siitä olisi mahdollista tuottaa biodieseliä, kun taas hiilihydraattipitoisuus mahdollistaisi bioetanolin valmistuksen. Myös ihmisten tai eläinten ravinnoksi *C. vulgaris* on varteenotettava, mikäli sen kasvatuksessa on käytetty turvallista kasvualustaa. Leväkasvustoa voidaan soveltaa vesien puhdistuksessa, ja sillä on päästy hyviin tuloksiin ravinteiden sitomisessa ja sitä pidetään yhtenä parhaimmista mikrolevistä vesien puhdistukseen ammoniumintypen ja fosforin osalta. (Safi ym., 2014, s. 265–278)

4 LEVÄKASVATTAMON RAKENTAMINEN JA TOIMINTA

Leväkasvattamo rakennettiin osana työharjoittelua Leväsieppari-hankkeelle. Kasvattamo tuli rakentaa Karanojan jätteidenkäsittelylaitokselle toimivan Kiertokapula Oy:n tasausaltaan läheisyyteen. Kasvattamon rakennustyöt aloitettiin keväällä 2018 ja saatiin valmiiksi samana kesänä. Kasvattamo koostuu altaasta ja siihen kuuluvista laitteista ja rakennelmista sekä kasvihuoneesta.

4.1 Altaan suunnittelu ja valmistelu

Ensiksi mitoitettiin ja suunniteltiin allas AutoCad-ohjelmalla, sekä arvioitiin kustannuksia ja tarvittavia materiaaleja kokonaisuuteen liittyen. Näitä materiaaleja olivat esimerkiksi maa-aines ja sen määrä, erilaiset maanrakennukseen liittyvät materiaalit sekä itse altaan rakentamiseen tarvittavat materiaalit. Maanrakennustyöt, maa-aines ja maanrakennukseen liittyvät materiaalit järjesti Kiertokapula. Altaan sekoitukseen käytettävästä moottorista ja leväaltaaseen tulevasta allaskumista tehtiin tarjouspyynnöt. Maanrakennustöiden etenemistä valvottiin paikan päällä. Ainoat esitetyt vaatimukset altaalle oli, että se olisi noin 15 cm syvä ja siihen tulisi mahtua 2 m^3 vettä. Altaan mallina käytettiin usein levän kasvatuksessa käytettyä ”raceway”-tyyppiä (kuva 2). Muotoon ja tilavuuteen otettiin mallia Leväsieppari-hankekumppanin Tampereen Hiedanrannan leväaltaasta.



Kuva 2. Kuvassa leväaltaan suunniteltu mitoitus

4.2 **Rakennustyöt ja kasvatusten aloittaminen**

Maanrakennustöiden yhteydessä lisättiin altaaseen allaskumi ja alettiin rakentamaan kehikkoa sekoittimelle. Kehikon valmistuttua 2 m^3:n kokoinen allas itsessään oli valmis (kuva 3) ja seuraavaksi vuorossa oli kasvihuoneen rakentaminen. Samoihin aikoihin alkoi altaaseen istutettavan ympin kasvatus Hämeen ammattikorkeakoulun Visamäen kampuksen kellarin levä-reaktorissa. Ympin kasvettua tarpeeksi se siirrettiin Karanojalla sijaitsevaan ymppialtaaseen odottamaan kasvattamoon siirtämistä.

Kuva 3. Valmis allas, jossa kasvaa levää

Kasvihuoneen (kuva 4) rakentaminen osoittautui huomattavasti työläämmäksi kuin oli odotettu. Rakentamisessa ja toiminnassa oli odottamattomia haasteita. Altaan ilmastus hoidettiin 8 barin öljyttömällä kompressorilla ja altaan sekoittimena toimi 0,37 kW:n, 17 rpm:n kierukkavaihdemoottori.

Kuva 4. Altaan suojaksi rakennettu kasvihuone

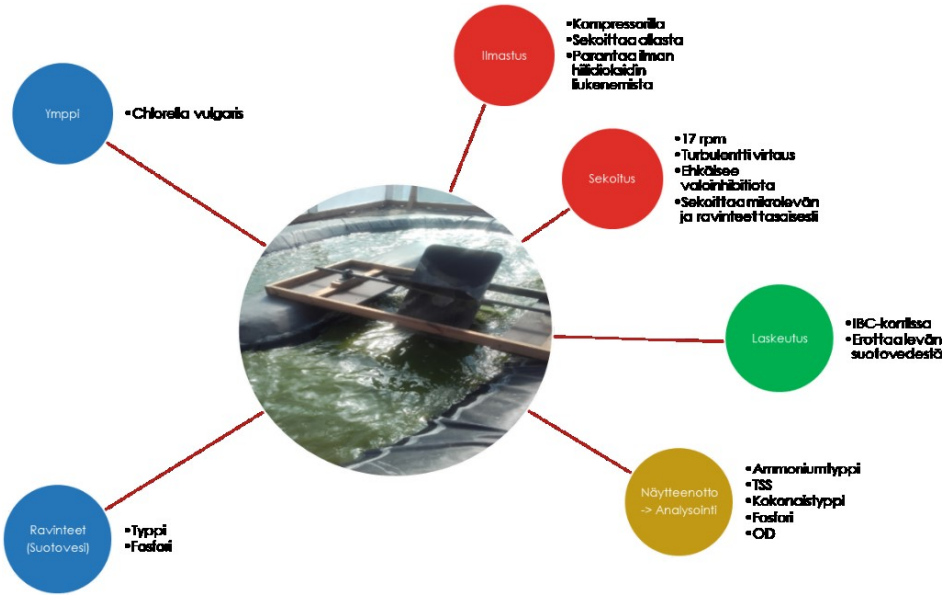
4.3 **Kasvattamon toiminta**

Levienkasvatusprosessi alkaa lisäämällä reaktoriin ymppiä ja suotovettä. Suotoveden on tarkoitus sisältää tarvittavat ravinteet levän kasvulle. Kasvattamon altaassa on jatkuva siipirattaalla toimiva sekoitus, ja ilmastus. Valon reaktori saa auringosta. Valaistusta ja lämmitystä ei ole kasvattamoon järjestetty, vaan ne ovat säästä riippuvaisia. Jäähdytyksestä vastaa ilmastointiluukut, joista katossa sijaitsevassa on vahalla toimiva säädinmekanismi, jossa vahan tilavuus muuttuu lämpötilan seurauksena.

Levämassan lisäännyttyä mahdollisimman suureen pitoisuuteen, pumpataan altaasta leväpitoista suotovettä IBC-konttiin laskeutumaan. Laskeuttamalla saadaan suurin osa levästä erotettua nesteestä kontin pohjalle. Neste voidaan poistaa kontista pumppaamalla.

Reaktoriin jätetty levä toimii seuraavan kasvatuksen ymppinä, ellei allasta pestä. Altaaseen pumpataan suotovettä, jossa ympin on tarkoitus kasvaa. Prosessi toistetaan uudestaan ja uudestaan. Mikäli allas pestään, kasvatetaan levä sille tarkoitetussa IBC-kontista leikatussa ymppialtaassa.

Koska kasvattamossa ei ole erillistä valaistusta tai lämmitystä, kasvattamossa voidaan vaikuttaa lähinnä vain itse levään, ravinteisiin, ilmastukseen ja sekoitukseen (kuva 5). Vaikkakin hiilidioksidisyöttö olisi hyväksi, ei resurssit tässä tapauksessa riittäneet sellaiseen. Tästä syystä päädyttiin syöttämään ilmaa kompressorin kautta altaaseen ja toivottiin ilman hiilidioksidin pitävän pH:ta matalampana. Menetelmän toimivuudesta ei ollut varmuutta. Etäseurattava automatiikka asennettiin kasvattamoon myöhemmin.



Kuva 5. Leväkasvattamon toimintaa kuvaavia tekijöitä

4.4 **Suotovesi**

Kaatopaikan suotovedellä tarkoitetaan jätevettä, joka on esimerkiksi suotautunut kaatopaikan jätteen läpi. Karanojalla suotovesi ajetaan tasausaltaaseen, josta se pumpataan puhdistettavaksi. Hämeenlinnan Seudun Vesi Oy puhdistaa Karanojan jätevedet, joita vuonna 2017 johdettiin viemäriverkkoon 51 596 m^3. Määrä vastaa keskimäärin 141 m^3 päivässä. Suotovedet on ympäristösäädösten vuoksi puhdistettava, sillä ne sisältävät muun muassa isoja määriä ravinteita ja muita haitallisia kemikaaleja (taulukko 2, s. 14), joita ei saa päätyä vesistöihin. (Kiertokapula Oy, 2017)

Taulukko 2. Jätevesien epäpuhtauksien arvoja ja sallittuja pitoisuuksia vuonna 2017 (Kiertokapula Oy, 2017)

		Kapula	Karanoja	Kapula	Karanoja
		Sallittu pitoisuus		Keskiarvo	Keskiarvo
pH		6.0 – 11.0	6.0 – 11.0	7.1	7.7
Sähkönjohtavuus	(mS/m)			290	363
BOD7 -ATU	(mg/l)			13	16
CODCr	(mg/l)			280	280
Kokonaisfosfori	(mg/l)			0.3	0.6
Kokonaistyppi	(mg/l)			110	113
NH4-N	(mgN/l)	50		100	107
Kiintoaine	(mg/l)			49	31
Syanidi	(mg/l)	0.5	0.5		<0.01
Kadmium	(mg/l)	0.01	0.005	0.0001	<0.001
Kromi	(mg/l)	1	1	0.01	0.02
Lyijy	(mg/l)	0.5	1	0.001	<0.001
Sinkki	(mg/l)	3	5	0.01	0.01
Elohopea	(mg/l)	0.01	0.005	0.0001	<0.001
Kloridi	(mg/l)	2,000	2 500 - 3 500	200	345
Sulfaatti	(mg/l)	400	400	80	258
TOC	(mg/l)			89	83

Jos kaatopaikkojen jätevedet voitaisiin puhdistaa kaatopaikalla, eikä niitä tarvitsisi ohjata vedenpuhdistamoille, voisivat kaatopaikat säästää rahaa vedenpuhdistusmaksuista. Joissain tapauksissa myös puhdistamot saattaisivat hyötyä tästä, kaatopaikan jätevesistä puhdistamoon kohdistunut kuormitus pienenisi. Mikrolevillä kaatopaikan jätevesien puhdistaminen voisi siis olla hyvä asia kaikille osapuolille.

4.5 **Näytteenotto**

Näytteenotto suoritettiin jokainen arkipäivä samasta kohdasta virtaavaa allasta. Kylmiöön menevät näytteet otettiin lasisiin säilöpulloihin ja pakastimeen menevät muovisiin pulloihin. Kasvatusten alussa ja lopussa otettiin kylmiöön ja pakastimeen meneviä näytteitä, muutoin vain kylmiöön meneviä näytteitä. Jotta voitiin kompensoida haihtunutta vesimäärää, lisättiin ennen jokaista näytteenottoa altaaseen vesijohtovettä, jotta altaan tilavuus olisi 2 m^3. Tasalaatuisuuden vuoksi allas sekoitettiin aina huolellisesti ennen näytteenottoa.

5 MIKROLEVÄN KASVATUS SEKOITUSALTAASSA

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli tehdä vähintään yksi panoskasvatus ja yksi puolijatkuva kasvatus. Panoskasvatuksilla selvitettiin levän kasvua ja ravinteiden sitomista kasvattamon olosuhteissa, jotta voitiin määrittää ajoparametrit puolijatkuvalle kasvatukselle. Esimerkiksi kasvunopeus saatiin pitkälti kartoitettua panoskasvatuksella, mikä auttoi määrittämään sopivan välin levän keruulle puolijatkuvassa kasvatuksessa. Työssä toteutettiin kolme panoskasvatusta ja yksi puolijatkuva kasvatus.

5.1 1. panoskasvatus

Ensimmäinen kasvatus aloitettiin perjantaina 13.7.2018 ja lopetettiin maanantaina 16.7.2018 *Chlorella*-lajin levällä. Syynä lyhyelle kasvatukselle oli odotettua runsaampi mikrolevän kasvu. Tämä aiheutti lieviä ongelmia suunnitelmien ja datan keruun kannalta, mutta näytti lupaavalta levän kasvatuksen kannalta. Koska näytteitä ei otettu viikonloppuna, saatiin ensimmäisestä panoskasvatuksesta näytteet vain kahdelta päivältä.

Suotoveden korkean ammoniumtyppipitoisuuden vuoksi kasvatus alkoi pumppaamalla altaaseen 1 300 litraa suotovettä ja 400 litraa vesijohtovettä. Vesijohtoveden oli tarkoitus hieman laimentaa ammoniumtyppipitoisuutta, jotta levä tottuisi korkeaan ravinnepitoisuuteen paremmin, vaikka ympp oltiinkin kasvatettu lähes 100 % suotovedessä. Suotovesi-vesijohtovesi-seokseen lisättiin vielä 700 millilitraa 85 %:sta fosforihappoa ja allas sekoitettiin huolellisesti. Fosforihapon lisäyksen syynä oli säätää aloitus pH hieman alemmaksi, jotta kasvatuksen aikana pH ei nousisi liian korkeaksi, aiheuttaen ammoniakin (NH_3) muodostumista ja mikrolevän kuolemista. Seoksen pH oli ennen fosforihapon lisäystä 7,45, ja lisäyksen jälkeen 6,77.

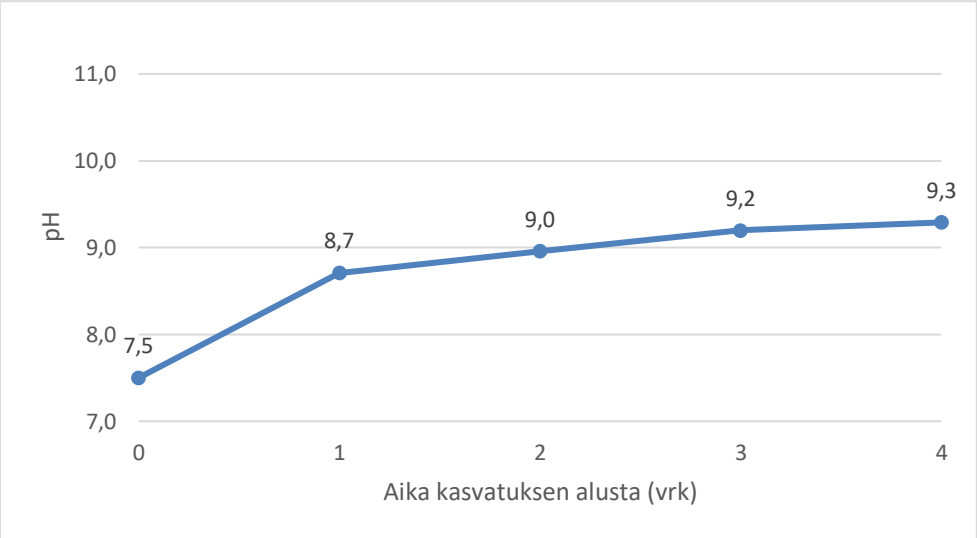
Fosforihapon lisäyksen ja altaan sekoituksen jälkeen lisättiin 300 litraa ymppiä käynnissä olevaan altaaseen. Ymppäyksen jälkeen suspension pH oli 6,95. Altaassa olevan 2 000 litran suspension annettiin tuottaa levää viikonlopun yli. Kasvatuksen lopussa suspension pH oli 9,43. Kasvatuksen aikana pH:ta ei säädetty millään tavalla alun fosforihapon lisäyksen lisäksi.

Maanantaina allas oli kauttaaltaan vihreänä mikrolevästä, joten päätettiin lopettaa ensimmäinen kasvatus ja tyhjentää allas seuraavaa erää varten. Altaan pinta oli kuitenkin laskenut haihtumisen vuoksi ja altaaseen oli lisättävä vesijohtovettä, jotta suspensiota olisi alkutilannetta vastaava määrä eli 2 000 litraa ja pitoisuusarvoin mitattavat tulokset ovat vertailukelpoisia. Allas sekoitettiin kunnolla ja altaasta pumpattiin 1 000 litraa leväsuspensiota IBC-konttiin (intermediate bulk container) ja 1 000 litraa jätettiin altaaseen seuraavan kasvatuksen ympiksi. Kontteja ei ollut tarpeeksi, jotta olisi voinut pumpata enemmän pois altaasta. IBC-kontin tarkoituksena oli toimia laskeutusastiana mikrolevän harvestointia varten.

5.2 **2. panoskasvatus**

Toinen panoskasvatus aloitettiin maanantaina 16.7.2018, jolloin edellinen kasvatus oli lopetettu. Altaassa jo olevaan 1 000 litraan lisättiin 1 000 litraa laimentamatonta suotovettä ja 120 ml 85 %:sta fosforihappoa. Fosforihappo sekoitettiin huolella suotoveteen, ennen suotoveden lisäystä, joten pH:ta ei voitu ottaa ympin ja suotoveden suspensiosta. Syynä 120 ml lisäykseen oli sama kuin 1. panoskasvatuksessa, mutta fosforihappoa ei ollut enempää, joten oli tyydyttävä 120 millilitraan. Lisäyksen jälkeen 2 000 litran suspension pH oli 7,50.

Kasvatusta seurattiin päivittäin ja aina ennen näytteenottoa altaaseen lisättiin vesijohtovettä. Suspension määrä haluttiin pitää kahdessa kuutiossa aina näytettä otettaessa. Kasvatus kesti neljä vuorokautta. Kasvatus lopetettiin perjantaina 20.7.2018 Suspension pH oli perjantaina 9,29, eikä siihen oltu kasvatuksen aikana vaikutettu millään tavalla, mutta oli koko kasvatuksen ajan ollut nousussa (kuva 6). Kasvatuksen lopettamiseen vaikutti korkea pH ja hyvin kasvanut mikrolevä. Altaasta pumpattiin tällä kertaa 1 700 litraa kahteen IBC-konttiin laskeutumaan ja altaaseen jätettiin 300 litraa ympiksi seuraavaa kasvatusta varten.

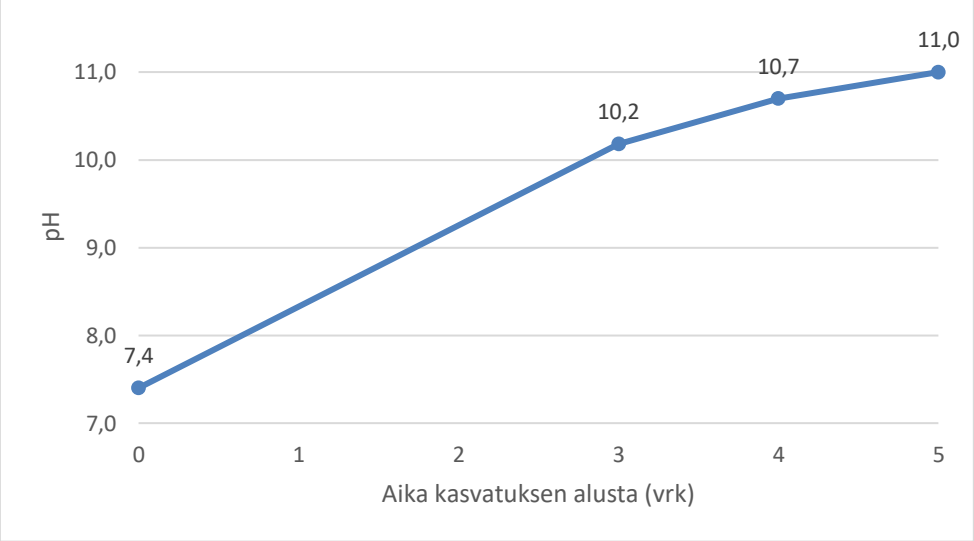


Kuva 6. Leväaltaan pH:n nousu toisen panoskasvatuksen aikana

5.3 **3. panoskasvatus**

Kolmas panoskasvatus aloitettiin perjantaina 20.7.2018 heti edellisen kasvatuksen jälkeen lisäämällä altaassa olevaan ymppiin 1 700 litraa laimentamatonta suotovettä. Tällä kertaa pH:n säädön suhteen ei tehty mitään. Kasvatuksen alussa pH oli 7,40. Kasvatus kesti viisi vuorokautta ja lopetettiin seuraavan viikon keskiviikkona 25.7.2018 Muuten kasvatus oli samanlainen kahden aikaisemman kasvatuksen kanssa. Koska kasvatus aloitettiin perjantaina, viikonlopun aikana ei ollut mahdollisuutta seurata kasvua. Vaikka maanantaina allas näytti vehreältä, päätettiin kasvatusta jatkaa ja seurata vielä muutama päivä.

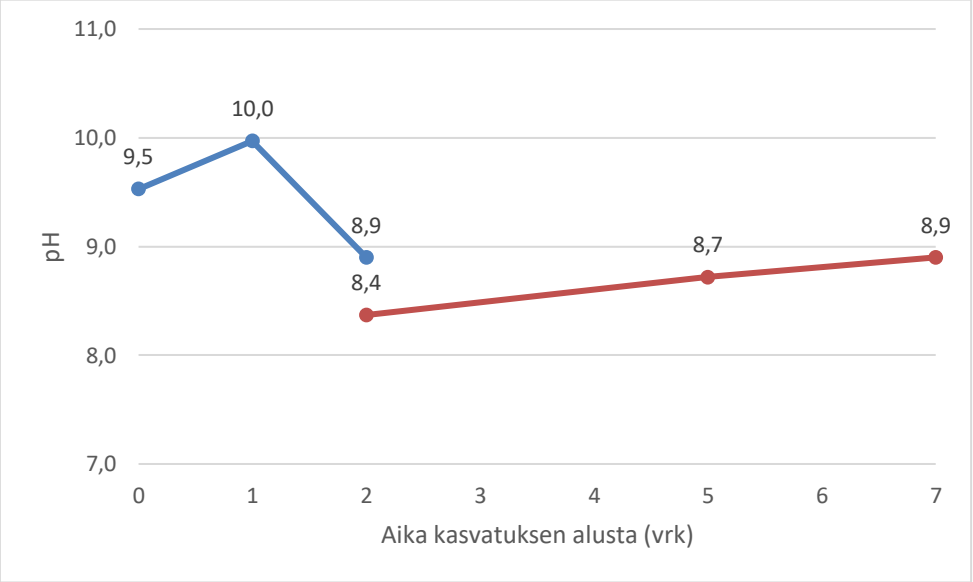
Keskiviikkona suspension pH oli 11,00, joka oli kasvatuksen aikana ollut jatkuvassa nousussa (kuva 7). Altaasta pumpattiin 1 000 litraa IBC-konttiin. Tarkoituksena oli jatkaa puolijatkuvalla kasvatuksella, joten ymppiä jätettiin hieman enemmän.



Kuva 7. Leväaltaan pH:n nousu kolmannen panoskasvatuksen aikana

5.4 Puolijatkuva kasvatus

Puolijatkuva kasvatus aloitettiin 25.7.2018 lisäämällä 1 000 litraan ymppiä 1 000 litraa laimentamatonta suotovettä. Suspension pH:ta ei säädetty mitenkään, vaan oli kasvatuksen alussa jo 9,53 ja vaihteli paljon kasvatuksen aikana (kuva 8). Puolijatkuvassa kasvatuksessa pumpattiin kaksi kertaa viikossa 400 litraa kahteen tynnyriin ja lisättiin 400 litraa suotovettä aina tilalle. Kuitenkin vain yksi tyhjennys ja täyttö ehdittiin tekemään, sillä täytön yhteydessä altaaseen joutui suotoveden mukana rauta(III)nitraattia. Kemikaali värjäsi veden samean ruskeaksi ja sai levän flokkautumaan, minkä johdosta levä alkoi vajoamaan pohjalle. Tästä syystä kasvatus päätettiin lopettaa. Kemikaalin voidaan myös olettaa vaikuttavan ensimmäisen lisäyksen jälkeisten analyysien tuloksiin joissain määrin. Kasvatus lopetettiin tiistaina 31.7.2018 ja allas tyhjennettiin kokonaan ja pestiin.



Kuva 8. Puolijatkuvan kasvatuksen pH:n vaihtelu. Päivänä 3 oli tyhjennys ja täyttö

6 ANALYYSIT JA MENETELMÄT

Analyysit suoritettiin Hämeen ammattikorkeakoulun Visamäen kampuksen laboratorioissa. Käytetyt menetelmät perustuivat standardimenetelmiin. Kaikki käytetyt laitteet, välineet ja tarvikkeet ovat laboratorioissa. Perehdytys menetelmiin ja laitteisiin on tapahtunut Hämeen ammattikorkeakoulun henkilökunnan johdolla. Jokaisessa menetelmässä, paitsi OD:ssa, näytteistä tehtiin 3 rinnakkaista.

Kokonaistypen (N-tot) määrityksessä tehtiin leväsuspensiolle ja suspensiosta sentrifuugilla erotetulle nesteelle. Jälkimmäiselle tehtiin myös ammoniumtyppimääritykset. Kokonais- ja ammoniumtyppimääritysten tarkoitus oli selvittää levään suotovedestä sitoutuneen typen määrää, jotta voitiin arvioida levän kykyä käyttää suotovedestä ravinteita kasvuunsa.

Kiintoainemääritys eli TSS ja OD-määritys tehtiin leväsuspensiolle. Määritelmien tarkoitus oli altaaseen kasvaneen levän määrää ja verrata menetelmien tuloksia keskenään. Tulosten vertaamisella voitiin arvioida voisiko nopeampaa OD-menetelmää käyttää TSS:n sijasta arvioimaan levän määrää altaassa. TSS- ja kokonaistyppipitoisuuksien avulla voitiin myös selvittää, paljon levä todellisuudessa sitoo typpeä itseensä kasvun aikana.

Osa menetelmistä, kuten fosfori ja nitraattityppi, olivat pikamenetelmiä. Fosforimääritys tehtiin suspensiosta ruiskusuodatetulle näytteelle ja menetelmällä oli tarkoitus selvittää levän kykyä käyttää suotovedestä fosforia kasvuunsa. Nitraattitypen määrittämisellä oli tarkoitus selvittää, paljonko suotovedessä on nitraattityppeä verrattuna ammoniumtyppeen, ja samalla selvittää paljon levä sitoo nitraattitypestä itseensä.

6.1 **OD-mittaus**

OD eli Optical density mittaa nesteen sameutta. OD-mittauksessa käytettiin leväspesifistä aallonpituutta, mikäli on *C. vulgaris* -levällä 686 nm ja tarkoituksena analysoida kuinka sameaa mikrolevä on nesteestä tehnyt. Käytännössä sameampi neste tarkoittaa suurempaa määrää levää. Analyysit suoritettiin Shimadzu UV-1800 spektrofotometrillä.

6.2 **Kiintoaine**

Kiintoainemääritys (TSS) tehdään kuivattamalla näytteestä suodatettua ainesta (SFS-EN-872:en/2015). Menetelmä perustuu alipaineella suodattamiseen ja uunissa kuivattamiseen, ja siinä käytetään imusuppiloa ja -pulloa. Ennen suodattamista kuivataan suodatinpaperit 105 °C:ssa 24 tuntia. Suodatinpaperina käytettiin Whatmanin™ GF/C™ 1,2 µm suodatinpapereita. Suodatinpaperit asetettiin upokkaisiin tai haihdutusmaljoihin ja laitettiin uuniin kuivumaan. Kun suodatinpaperit olivat olleet uunissa 24 tuntia tai enemmän, ne jäähdytettiin eksikaattorissa ja punnittiin. Tämän jälkeen otettiin käyttöön imupullo ja -suppilo. Suodatinpaperi asetettiin suppiloon ja kostutettiin RO-vedellä. Näytettä kaadettiin mittalasista tai pipetoitiin automaattipipetistä 10–50 ml, riippuen levämassan määrästä. Pinseteillä otettiin suodatinpaperi ja asetettiin se samaan upokkaaseen tai haihdutusmaljaan, mistä se oli otettu ja astia laitettiin uuniin 105 °C:een 24 tunniksi. Kun aika tuli täyteen, laitettiin astiat eksikaattoriin jäähtymään ja punnittiin.

Kiintoaineen määrä saadaan laskettua kaavalla 1.

$$TSS = \frac{m_2 - m_1}{V} \quad (1)$$

Jossa,
TSS = kiintoaine (g/ml)
m_2 = massa kuivauksen jälkeen (g)
m_1 = massa ennen suodatusta (g)
V = suodatettu määrä näytettä (ml)

6.3 **Kokonaistyppi**

Kokonaistyppi määritettiin Kjeldahl-menetelmällä käyttäen Kjeltec™ 8400 -laitteistoa. Kokonaistyppeä määritettäessä näytteen orgaaninen aine hajotetaan rikkihapolla, ja nitraatti- ja nitriittitypet pelkistetään reagenssillä ammonium-muotoon. Poltossa rikkihapon vaikutuksesta typpi sitoutuu ammoniumsulfaatiksi ($(NH_4)_2SO_4$), ja hiilidioksidi (CO_2), vesi (H_2O) sekä poltossa muodostuva rikkidioksidi (SO_2) haihtuvat. Ammoniumsulfaatista vapautetaan ammoniakki natriumhydroksidilla. Ammoniakki tislataan boorihappoliuoksella (H_3BO_3) indikaattorin kanssa. Seuraavaksi ammoniakki takaisintitrataan rikkihapolla ja tästä voidaan laskea typen määrä hapon kulutuksesta. Koska kaikki typpi näytteessä on muutettu samaan muotoon, antaa laite tulokseksi kokonaistypen. Typen todellisen määrän pystyy laskemaan samalla tavalla kuin ammoniumtypen, mutta standardin kokonaistyppipitoisuuden pitäisi olla 1,25 mgN/l. (Opetushallitus, n.d.)

Ensiksi typenpolttoputkiin lisättiin lusikankärjellinen määrä kiehumakiviä ja kaadettiin näytettä enintään 50 millilitraa. Valmistettiin glysiinistandardi ja lisättiin sitä putkeen 50 millilitraa. Kahteen putkeen lisättiin myös 50 ml RO-vettä. RO-vedellä täytetyt putket toimivat nollanäytteinä Putkiin lisättiin kjeldahl-tabletit ja 8 millilitraa 98 %:sta rikkihappoa. Putket laitettiin FOSS Labtec™ DT220 Digestor -polttokennostoon, polttokennosto ja FOSS SR 219 Scrubber -neutralointilaitteisto käynnistettiin ohjeiden mukaisesti. Laitteen ilmoittaessa polton olevan valmis, odotetiin näytteiden jäähtyvän noin 170 °C:een. Kun näytteet olivat jäähtyneet 170 °C:een, nostettiin ne sivuun jäähtymään. Kun näytteet olivat jäähtyneet huoneenlämpöisiksi, voitiin ne analysoida tislauslaitteella kokonaistypelle tarkoitetulla ohjelmalla. Polttolaitteet sammutettiin ohjeiden mukaisesti ja tislauslaite antoi kokonaistypen määrälle tuloksen.

6.4 **Ammoniumtyppi**

Ammoniumtypen määritys on samanlainen kuin kokonaistypen määritys ilman polttoa ja se suoritettiin Kjeltec™ 8400 -laitteistolla. Ensiksi näytteet sentrifugoitiin 12 000 rpm 10 minuuttia. Sentrifugoidut näytteet dekantoitiin dekantterilasiin ja dekantterilasista näytettä kaadettiin enintään 50 millilitraa Kjeldahl-putkiin. Putket asetettiin tislauslaitteeseen, ja käynnistettiin ammoniumtypen määrittämiseen tarkoitettu ohjelma. Ennen näytteitä laite pestiin ja analysoitiin blank, eli nollanäyte, ja ammoniumsulfaattistandardi. Laite antoi tuloksen yksikössä mgN/l, josta voitiin laskea korjauskertoimen ja näytemäärän avulla todellinen ammoniumtypen määrä kaavalla 2.

$$\left(\frac{std}{std_{laite}}\right) * \left(\frac{c_{laite}}{V_{näyte}}\right) = c_{ammoniumtyppi} \quad (2)$$

Jossa,
std = vakio 0,5 mgN/l, mikä standardiliuoksen pitoisuuden pitäisi olla
std_{laite} = laitteen antama pitoisuus [mgN/l] standardille
c_{laite} = laitteen antama ammoniumtypen konsentraatio litraa näytettä kohti (mgN/l)
$V_{näyte}$ = typenpolttoputkeen kaadetun näytteen tilavuus (l)
$c_{ammoniumtyppi}$ = todellinen ammoniumtypen määrä näytteessä (mgN/l)

6.5 **Nitraattityppi**

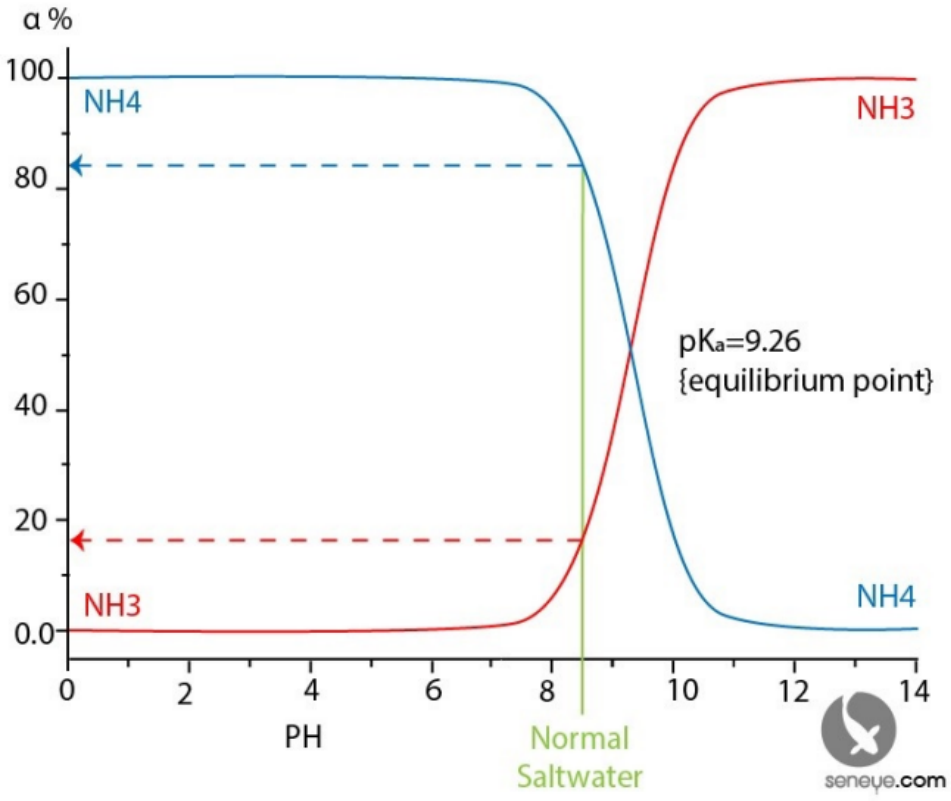
Nitraattityppi oli tarkoitus määrittää Hach Lange LCK 339 -menetelmällä, mutta sitä voidaan käyttää vain, mikäli näytteen COD-pitoisuus on alle 200 mg/l. Nitraattityppeä ei voitu määrittää, sillä näytteiden COD-pitoisuus osoittautui niin korkeaksi, ettei menetelmällä saada tarkkoja tuloksia. Laimentaminen ei myöskään ollut mahdollista, sillä COD:n laskiessa nitraattitypen määrä laski näytteissä niin alhaiseksi, ettei laite voinut antaa tuloksia. (Hach, n.d.a.)

6.6 **Fosfori**

Pikamenetelmällä Hach Lange LCK 349 voidaan määrittää fosfaatit ja kokonaisfosfori. Mikäli näytteet hydrolysoidaan pikamenetelmän mukaan, testi antaa kokonaisfosforin määrän näytteessä. Fosforimääritykset tehtiin ruiskusuodatetusta näytteestä. Menetelmä on spektrofotometrinen ja sen raja-arvojen ollessa 0,15–4,50 mg/l, piti näytteitä laimentaa RO-vedellä kertoimilla 25, 50 ja 100. Laimennoksen jälkeen näytekyvettiin pipetoitiin 2 ml näytettä ja kyvettiin suljettiin. Näytettä ravistettiin kunnolla ja laitettiin LT 200 -laitteeseen 100 °C:een yhdeksi tunniksi. Kyvettien annettiin tämän jälkeen jäähtyä huoneenlämpöisiksi. Kun kyvetit olivat jäähtyneet, ne ravistettiin kunnolla, ja kyvettiin lisättiin 0,2 ml reagenssi B:tä. Alkuperäisen korkin tilalle vaihdettiin reagenssikorkki C ja käännettiin kyvettejä muutaman kerran ylös ja alas. 10 minuutin jälkeen heilutettiin kyvettejä vielä muutama kerta ja laitettiin Hach Lange DR 2800 -spektrofotometriin. Laite antoi tulokseksi milligrammaa fosforia per litraa näytettä. (Hach, n.d.b.)

7 **TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU**

Kasvatuksissa havaittiin pH:n korkeaa nousua kasvatusten aikana. Ilmasta saatu hiilidioksidi ei vaikuta yksin riittävän alentamaan pH:ta. Korkea pH voi inhiboida levän kasvua altaassa sekä tarpeeksi korkeissa lukemissa saada ammoniumtypen (NH_4^+) haihtumaan ammoniakkina (NH_3) (kuva 9, s. 23). Mikäli pH:ta olisi saatu hallittua paremmin, olisi tuloksissa voinut olla eroja saatuihin tuloksiin verrattuna. Esimerkiksi kiintoaineen määrä olisi voinut olla korkeampi tai typen reduktio pienempi.



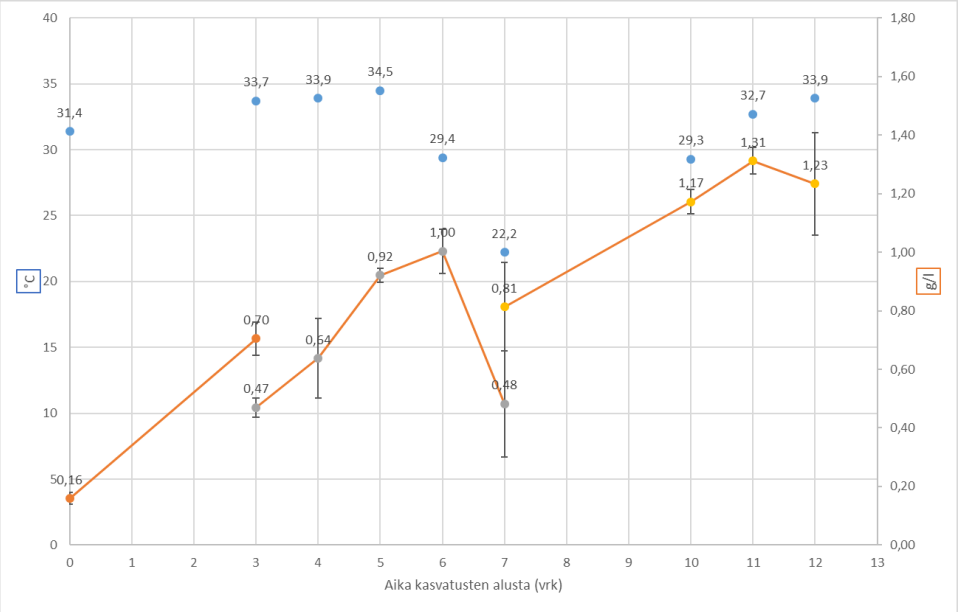
Kuva 9. pH:n vaikutus ammoniakkiin ja ammoniumtyppeen (Seneye LTD, 2018)

7.1 **Leväkasvu**

Levän määrä altaassa vaihteli kasvatuksesta toiseen. Tuloksista voidaan havaita, että optimaalinen kasvatusaika altaassa oli noin 4–5 vuorokautta, minkä jälkeen levän kiintoaineen pitoisuus sekä OD_{686} alkoivat laskemaan (Liite 1). Parhaimmillaan levän kiintoainepitoisuus oli 1,31 g/l. Tämä tarkoittaa 2 000 litran altaassa noin 2,6 kg kiintoainetta. Altaalla voitaisiin tulosten valossa parhaimmillaan tuottaa panoskasvatuksella kuukaudessa noin 17,3 kg kiintoainetta.

Puolijatkuvassa kasvatuksessa leväsuspensiota pumpattiin noin 400 litraa 3–4 vuorokauden välein, ja päivittäinen kiintoainepitoisuus vaihteli 1,2 g/l ja 0,9 g/l välillä. Levää voitaisiin siis saada parhaimmillaan 4,1 kg kuukaudessa. On kuitenkin huomattava, että mikäli puolijatkuvassa kasvatuksessa pumpataan vain 400 litraa kerralla, on 3–4 vuorokautta liian harvoin. Vaihtoehtoisesti pumpattavaa määrää voitaisiin kasvattaa tai levän talteenottoväliä voitaisiin pienentää.

Tuloksien perusteella ei voida sanoa, onko kasvihuoneen lämpötilalla ollut vaikutusta levän kasvuun. Päivittäinen lämpötila pysyi tasaisena kasvihuoneen vaikutuksesta, mutta yöllistä lämpötilaa ei mitattu. Kolmannen kasvatuksen osalta vaikuttaisi, että matalammat lämpötilat on johtanut korkeampaan kiintoainepitoisuuteen, mutta kiintoainepitoisuus on myös lähtötilanteessa suurempi kuin aikaisemmissa kasvatuksissa (kuva 10).



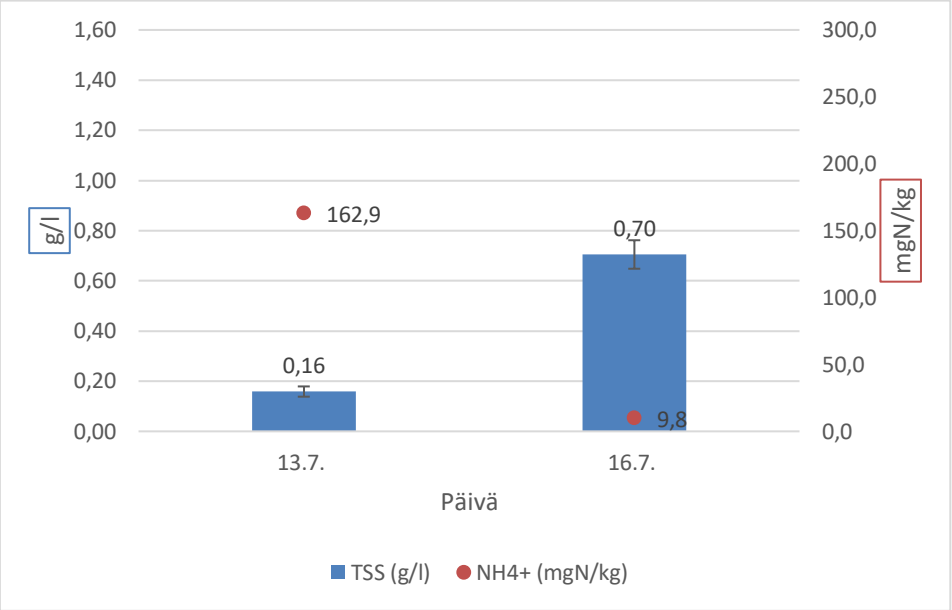
Kuva 10. Kasvihuoneen lämpötilat ja kiintoaineen pitoisuudet panoskasvatusten aikana

7.2 **Ravinteiden vähenemä**

Ravinteiden vähenemää tarkasteltiin fosfori-, kokonais- ja ammoniumtyppianalyyseistä saaduista tuloksista. Tarkastelulla selvitettiin tarkemmin, kuinka paljon typpeä ja fosforia sitoutuu suotovedestä levään kasvatusten aikana, paljon ravinteita jää suotoveteen ja häviääkö ravinteita jotain muuta kautta altaasta. Tuloksista voidaan tulkita levän tehokkuutta käyttää ravinteita kasvuunsa.

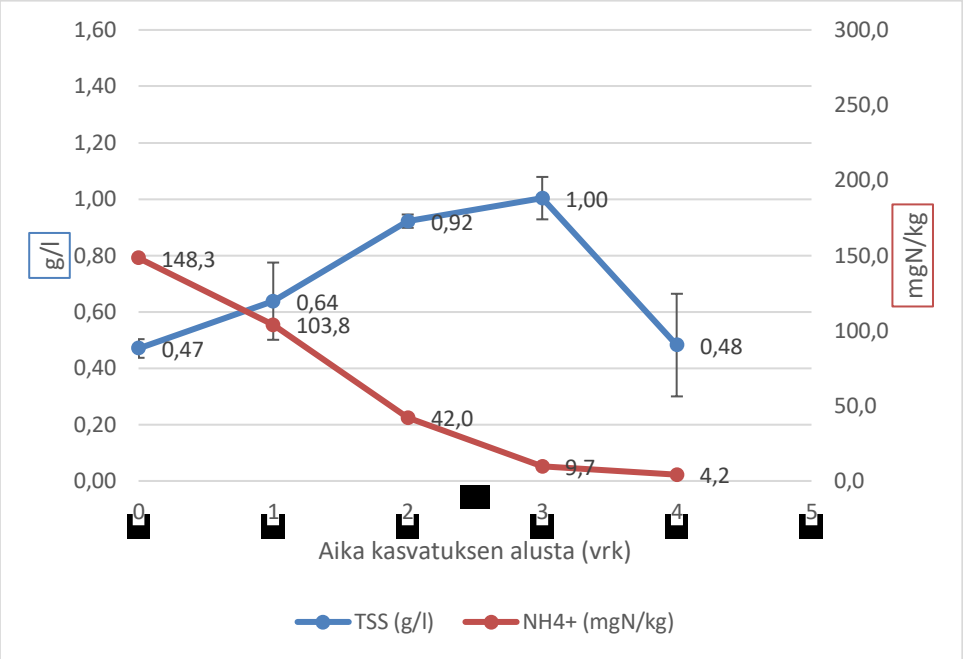
7.2.1 Ammoniumtyppi

Ensimmäisessä kasvatuksessa ongelmana oli, että siitä ei juurikaan saatu kerättyä kasvun aikaista dataa. Kasvatus aloitettiin perjantaina ja lopetettiin maanantaina, eikä viikonloppuisin otettu näytteitä, joten kovin selvää kuvaa kiintoaineen määrän kasvusta tai ammoniumtypen laskusta ei saatu. Tuloksista voidaan kuitenkin huomata ammoniumtypen selvä väheneminen kiintoaineen määrän kasvaessa (kuva 11, s. 25).



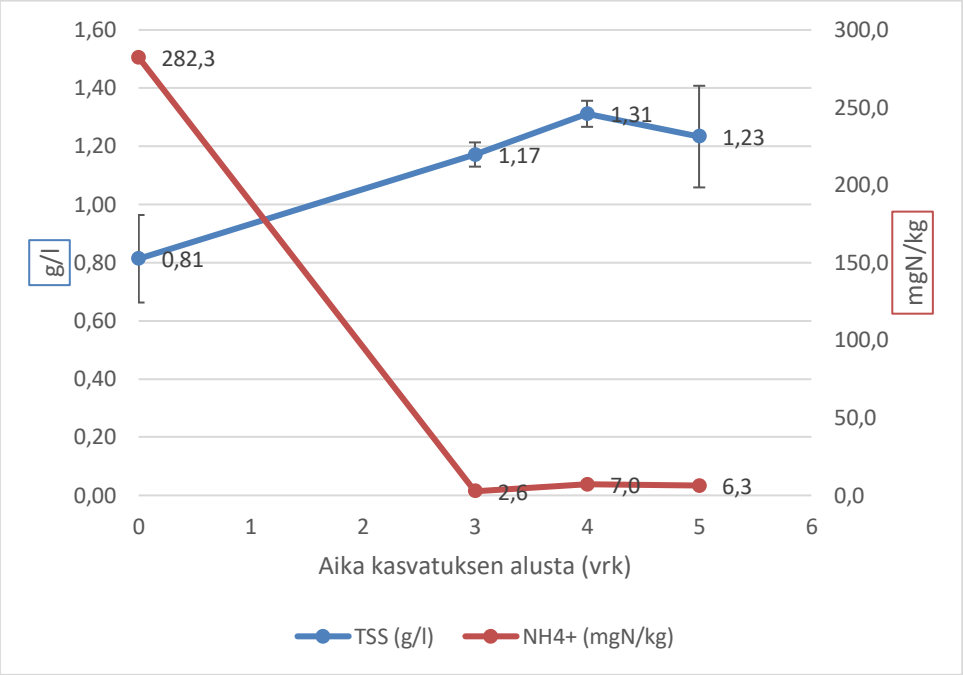
Kuva 11. Suotoveden ammoniumtyppi- ja kiintoainepitoisuudet ensimmäisessä kasvatuksessa

Toisesta kasvatuksesta dataa saatiin huomattavasti enemmän. Tuloksista voidaan kuitenkin havaita ammoniumtyppipitoisuuksien laskevan tasaisesti kolmen vuorokauden aikana kiintoainepitoisuuksien, eli levämäärän kasvaessa. (kuva 12, s. 26). Kiintoaineen määrän lasku kolmen vuorokauden jälkeen saattoi johtua alhaisesta ammoniumtypen määrästä, mikä aiheutti ravinteiden puutetta mikroleville. Ravinteiden puute taas saattoi johtaa mikrolevien kuolemaan. Kiintoaineen vähenemistä tukevat myös OD-mittauksilla saadut tulokset (Liite 1). Kiintoainepitoisuusmääritykset tehtiin aina samana päivänä, kun näyte otettiin, joten näytteiden välistä sekaannusta ei ole voinut tapahtua.



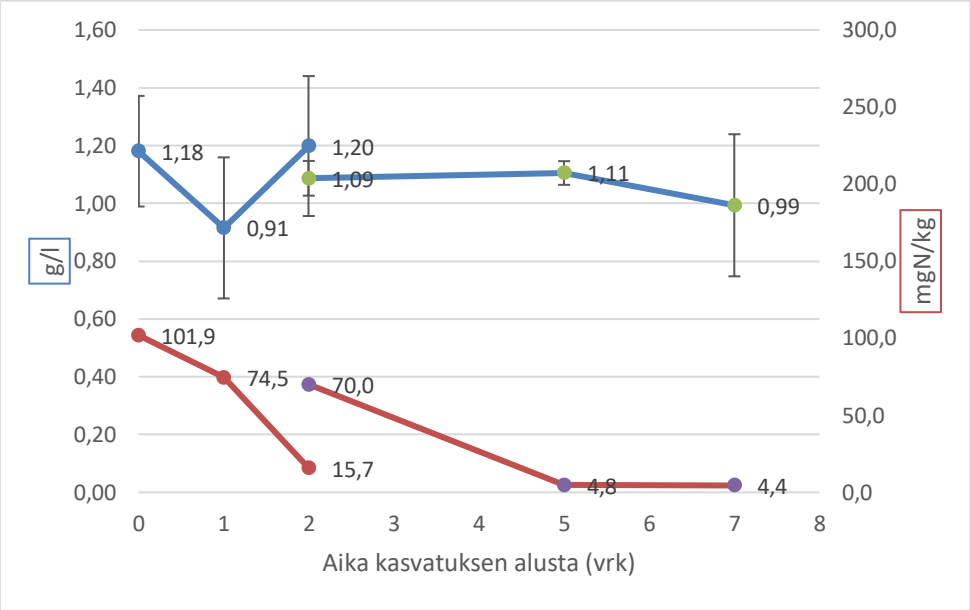
Kuva 12. Suotoveden ammoniumtyppi- ja kiintoainepitoisuudet toisessa kasvatuksessa.

Kolmas kasvatus alkoi perjantaina, joten viikonlopulta ei saatu dataa. Tuloksissa näkyy huomattava ammoniumtypen vähenemistä kolmen vuorokauden aikana (kuva 15, s. 27). Kiintoaineen määrän nousua on havaittavissa neljän ensimmäisen vuorokauden aikana jonkin verran, vaikka ei kuitenkaan samoissa määrin kuin aikaisemmissa kasvatuksissa. Tämän jälkeen kasvu kuitenkin hidastuu ja kiintoaineen määrä lähtee jopa laskemaan neljäntenä vuorokautena. Kiintoaineen määrän laskua tukee OD-mittauksilla saadut tulokset (liite 1). Kolmannessa kasvatuksessa ammoniumtypen määrä oli alussa myös huomattavasti aikaisempia kasvatuksia suurempi.



Kuva 13. Suotoveden ammoniumtyppi- ja kiintoainepitoisuudet kolmannessa kasvatuksessa

Neljännessä kasvatuksessa siirryttiin puolijatkuvaan kasvatusmalliin. Kasvatuksen kolmantena päivänä poistettiin altaasta mikrolevää ja lisättiin suotovettä. Tuloksista voidaan havaita selvää ammoniumtypen määrän kasvua (kuva 14, s. 28). Kiintoaineen määrä pysyy koko kasvatuksen määrän suhteellisen korkeana. Suotoveden lisäyksen yhteydessä altaaseen joutui rauta(III)nitraattia, mikä saattoi aiheuttaa virhettä kiintoaineen määrää analysoitaessa. Kemikaali myös värjäsi veden ruskeaksi, mikä saattoi aiheuttaa OD-mittauksella saatuihin tuloksiin (liite 1). Osa kasvatuksesta kuitenkin sijoittui viikonlopulle, joten täysin tarkkaa dataa viikonlopulta ei ollut saatavissa. Viikonlopun aikana (3.–4. vrk) on havaittavissa selvä ammoniumtypen määrän väheneminen. Kiintoaineen määrän nousua ei kuitenkaan viikonlopun aikana juuri ollut. Mutta tämä saattoi johtua kemikaalin vaikutuksesta.



Kuva 14. Suotoveden ammoniumtyppi- ja kiintoainepitoisuudet puolijatkuvassa kasvatuksessa

7.2.2 Typen vähenemätarkastelu

Panoskasvatusten tuloksista voitiin laskea, kuinka paljon ravinteita saatiin poistettua suotovedestä. Ravinteiden poistuminen laskettiin kaavalla 3.

$$\frac{c_0 - c_1}{c_0} * 100\% = reduktio\% \qquad (3)$$

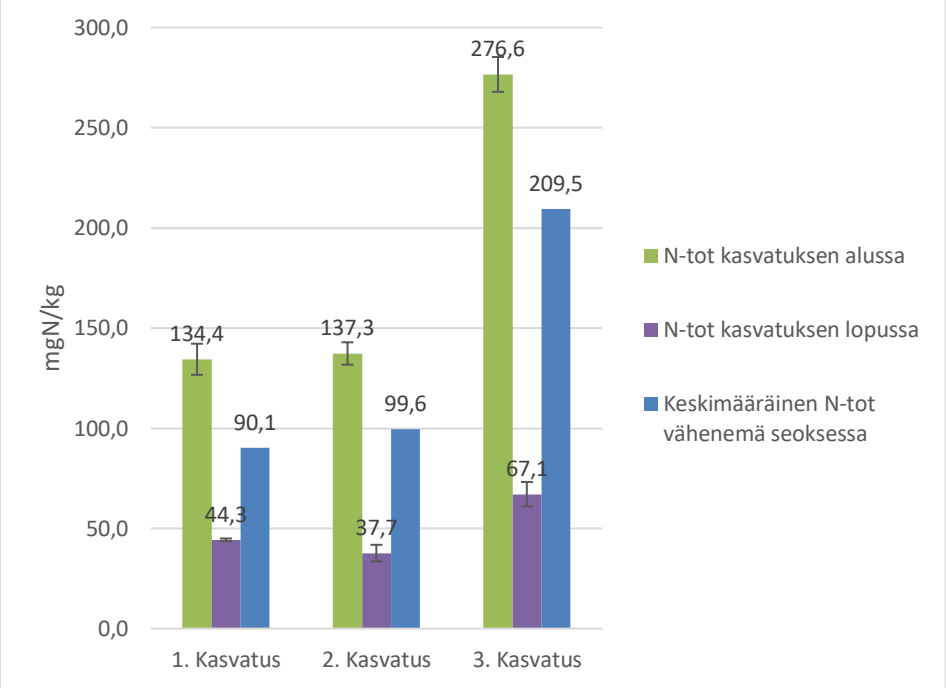
jossa,
c_0 = Ravinteiden konsentraatio kasvatuksen alussa (mg/kg tai mg/l)
c_1 = Ravinteiden konsentraatio kasvatuksen lopussa (mg/kg tai mg/l)

Kaavalla (3) laskemalla saatiin kaikissa kasvatuksissa ammoniumtypen keskimääräiseksi reduktioksi yli 94 %. Kuitenkaan fosforin ja kokonaistypen kanssa ei päästy yhtä hyviin tuloksiin ainakaan kahdessa ensimmäisessä kasvatuksessa (taulukko 3).

Taulukko 3. Suotoveden ravinteiden keskimääräinen vähenemä panoskasvatuksissa

	Ravinteiden väheneminen suotovedestä		
	NH4+	Suotoveden N-tot	Fosfori
1. kasvatus	94,0 %	75,7 %	46,4 %
2. kasvatus	97,2 %	78,7 %	44,5 %
3. kasvatus	97,8 %	92,2 %	88,3 %

Panoskasvatusten aikaista typpi vähenemää seurattiin myös kokonaistyppianalyysi tulosten perusteella (liite 2). Vähenemästä voidaan päätellä, kuinka paljon typpeä on haihtunut ammoniakkina ja kuinka paljon typpeä on sitoutunut levään. Leväsuspension ravinnereduktion pitäisi olla olematon, mikäli ravinteita ei altaasta jollain tavalla poistu. Tuloksista voidaan kuitenkin havaita typen häviämistä (kuva 15). Kokonaistypen vähenemä altaasta kolmen ensimmäisen kasvatuksen aikana vaihteli 67–76 %:n välillä.



Kuva 15. Panoskasvatusten aikana tapahtunut kokonaistypentypen vähenemä

Analyysitulosten osoittamasta typen vähenemästä johtuen oli oleellista selvittää, kuinka paljon typpeä levä käytti solumassan tuottamiseen kasvatuksen aikana ja kuinka paljon siitä on mahdollisesti vapautunut ilmaan.

Ammoniumtyppipitoisuuksista saadaan laskettua typen vähenemä kaavalla 4.

$$(c_0 - c_1) * V_{allas} = m_N \qquad (4)$$

jossa,

c_0 = ammoniumtypen pitoisuus kasvatuksen alussa (kgN/l)
c_1 = ammoniumtypen pitoisuus kasvatuksen lopussa (kgN/l)
V_{allas} = kasvatusaltaan tilavuus (l)
m_N = suotovedestä poistuneen ammoniumtypen massa (gN)

Levämassan kasvua kasvatuksen aikana voidaan laskea kaavalla 5.

$$(c_1 - c_0) * V_{allas} = m_{levä} \quad (5)$$

jossa,
c_1 = levän pitoisuus kasvatuksen lopussa (g/l)
c_0 = levän pitoisuus kasvatuksen alussa (g/l)
V_{allas} = kasvatusaltaan tilavuus (l)
$m_{levä}$ = altaaseen kasvaneen levän massa (g)

Jos käytetään Stumm:n empiiristä kaavaa mikroleville, $C_{106}H_{263}O_{110}N_{16}P$, voidaan altaaseen kasvaneen levän moolimassasta laskea typen suhteellinen osuus kaavalla 6 (Xin ym. 2010, s. 5498).

$$\frac{M(N_{levä})}{M(Levä)} * 100\ \% = M\%_{levä,N} \quad (6)$$

jossa,
$M(N_{levä})$ = levän empiirisen kaavan typen moolimassa (g/mol), 224,2 g/mol
M(Levä) = levän empiirisen kaavan moolimassa (g/mol), 3 553,3 g/mol
$M\%_{Levä,N}$ = Levän empiirisen kaavan typen moolimassan suhde levän moolimassaan, 6,3 %

Altaaseen kasvaneen levän ja sen sisältämän typen moolimassojen suhteen avulla voidaan laskea massojen suhde kaavalla 7.

$$M\%_{Levä,N} * m_{levä} = m_{levä,N} \quad (7)$$

jossa,
$M\%_{Levä,N}$ = Levän empiirisen kaavan typen moolimassan suhde levän moolimassaan, 6,3 %, kaava 6
$m_{levä}$ = altaaseen kasvaneen levän massa (g)
$m_{levä,N}$ = levään sitoutuneen typen massa (gN)

Ilmaan mahdollisesti vapautuneen typen massa saadaan laskettua kaavalla 8.

$$m_N - m_{levä,N} = m_{N,haihtunut} \quad (8)$$

jossa,
m_N = suotovedestä poistuneen typen massa (gN), kaava 4
$m_{levä,N}$ = levään sitoutuneen typen massa (gN), kaava 7
$m_{N,haihtunut}$ = ilmaan vapautuneen typen massa (gN)

Ilmaan vapautuneen typen määräksi kaikesta poistuneesta typestä saatiin ammoniumtyppianalyyseistä saaduista tuloksista kaavoilla (4–8) 77–99 % (taulukko 4, s. 31). Mikäli toinen kasvatus olisi lopetettu päivää aikaisemmin, olisi ilmaan vapautuneen typen osuus ollut 99 %:n sijaan vain 71 % (taulukko 4, s. 31). Tuloksista voidaan päätellä levän sitoneen maksimissaan noin 30 % suotoveden typestä. Jos levää kasvatetaan liian pitkään, saattaa typen sitominen olla vain noin muutama prosentti.

Taulukko 4. Ilmaan vapautuneen ja levään sitoutuneen typen laskennalliset määrät perustuen suotoveden ammoniumtyppituloksiin

Panoskasvatus	Ilmaan vapautunut typpi (gN)	Levään sitoutunut typpi (gN)	Ilmaan vapautuneen typen osuus suotovedestä poistuneesta typestä
1. kasvatus	237,3	68,9	77 %
2. kasvatus*	286,6	1,5	99 %
3. kasvatus	499,1	53,0	90 %
*) Jos 2. kasvatus olisi lopetettu päivää aikaisemmin, olisi tulokset olleet kasvatuksen osalta seuraavat:			
	209,9	67,3	71 %

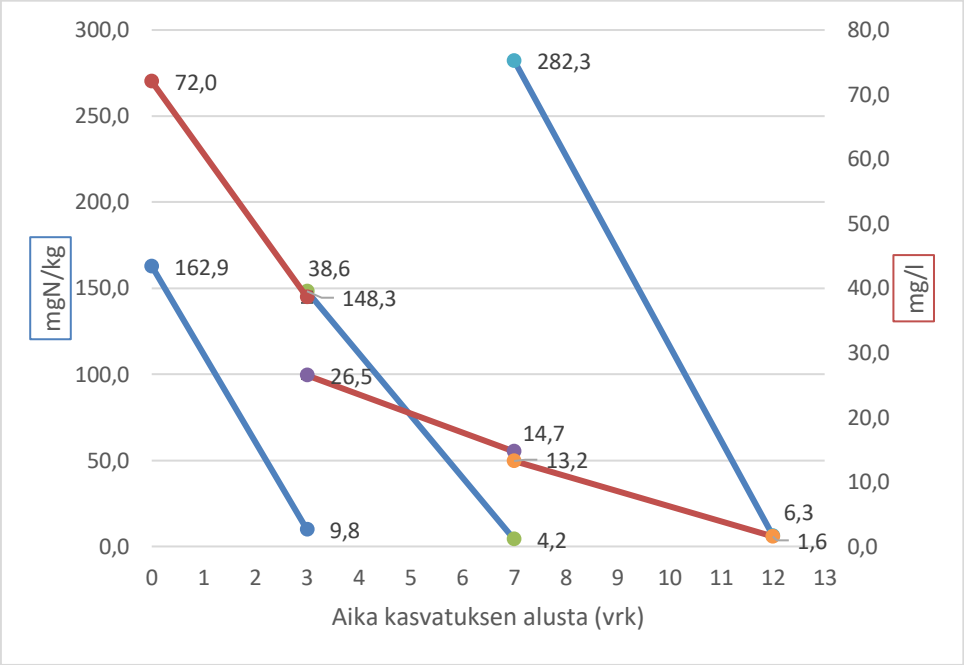
Kokonaistyppimäärityksistä saatujen tulosten perusteella laskettu ilmaan haihtuneen typen osuus eroaa hieman ammoniumtyppianalyysien tuloksista suoritettujen laskujen tuloksista (taulukko 5). Kuitenkin molemmista voidaan havaita levän sitovan typpeä vähemmän kuin mitä siitä vapautuu ilmaan. Nämä tulokset vahvistavat oletusta siitä, että osa typestä vapautuu kasvatuksen aikana ammoniakkina ilmaan pH:n noustessa.

Taulukko 5. Ilmaan vapautuneen ja levään sitoutuneen typen laskennalliset määrät perustuen leväsuspension kokonaismäärityksiin

Panoskasvatus	Leväsuspension kokonaistyppimäärityksen mukaan ilmaan poistunut typpi (gN)	Levään sitoutunyt typpi (gN)	Ilmaan vapautuneen typen osuus suotovedestä poistuneesta typestä
1. kasvatus	111,3	68,9	62 %
2. kasvatus	197,8	1,5	99 %
3. kasvatus	366,0	53,0	87 %

7.3 **Fosfori-typpi-suhteen tarkastelu**

Altaaseen lisätyn suotoveden fosforipitoisuuteen vaikutti paljon siihen lisätty fosforihappo, mutta tuloksista voidaan kuitenkin havaita sen huomattavaa vähenemistä kasvatusten aikana. Kahden ensimmäisen kasvatuksen aikana voidaan havaita, että fosforin pitoisuudet ovat lähestulkoon puolittuneet, kun taas kolmannessa kasvatuksessa fosforista jäi jäljelle vain noin kymmenys alkuperäisestä (kuva 16, s. 32). Fosforihappoa lisättiin ensimmäisen ja toisen kasvatuksen alussa, mutta ei kolmannen kasvatuksen alussa. Toisen kasvatuksen alussa lisättiin huomattavasti vähemmän fosforihappoa kuin ensimmäisen kasvatuksen alussa. Kuitenkaan ammoniumtyppeä ja fosforia ei saatu täysin pois suotovedestä. Liian pienet määrät näitä ravinteita aiheuttavat nopeasti mikrolevän kasvun pysähtymistä.



Kuva 16. Suotoveden ammoniumtyppi- ja fosforipitoisuudet eri kasvatuksissa

7.4 Virhearviointi

Muutaman näytteen ammoniumtyppipitoisuudet olivat korkeampia kuin kokonaistyppipitoisuudet (liite 2). Suhteellinen ero näissä kolmessa näytteessä olivat ensimmäisessä kasvatuksessa 17,5 %, toisessa 7,5 % ja kolmannessa 2 %. Tämän ei pitäisi olla mahdollista. Virhe on systemaattinen ja näkyy aina kasvatuksen alussa otetussa näytteessä. Analyysit tehtiin eri typenpoltoissa. Epäselvää on, onko näytteiden pakastuksella voinut olla vaikutusta asiaan. Putket ovat saattaneet typenpolton aikana kuohua, mikä on saattanut johtaa typen määrän vähenemiseen putkessa. Ammonium- ja kokonais-typpinäytteet ovat täysin samoja, ainoa ero oli niiden säilytyksessä. Uusia kokeita ei voinut tehdä, sillä näytteitä kului muihin analyyseihin odotettua enemmän.

8 JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA

Tässä työssä havaittiin, että 3–4 vuorokautta käytetyssä leväkasvattamossa ja tutkituissa olosuhteissa on riittävä aika tuottaa tässä opinnäytetyössä kasvatettua mikrolevää suotovedessä. Viidentenä vuorokautena mikrolevän kasvu alkaa hidastumaan. Kuitenkin muuttujia on paljon aina lämpötilasta valoisuuteen, ja ulkoilman olosuhteisiin on mahdotonta vaikuttaa. Näissä kokeissa vaikutti, ettei korkealla lämpötilalla (30–35 °C) ollut vaikutusta levän kasvuun. Myös suotoveden ravinnepitoisuudessa on isoja vaihteluita, millä voi olla suuria vaikutuksia mikrolevän kasvuun. Vaikuttaisi kuitenkin, että olosuhteista ravinteilla ja pH:lla on ollut suurin vaikutus levän kasvuun altaassa. Valon, lämpötilan tai hiilidioksidin vaikutusten arviointia ei pystytty tekemään, sillä valon ja lämpötilan mittaamiseen tarkoitetut anturit saatiin käyttöön vasta myöhemmin.

Tuloksien perusteella voidaan kuitenkin päätellä mikrolevän kykenevän sitomaan ravinteita suotovedestä. Vaikkakin suurin osa typestä haihtuisikin ammoniakkina ilmaan, on se poissa vedestä. Tosin ammoniakki pitäisi tällöin ottaa talteen, eikä sitä saisi päästää ilmaa. Mikäli kuitenkin tavoitteena on saada täysin puhdasta vettä, ei näiden tulosten valossa se ainakaan ole käytetyssä kasvattamossa mahdollista. Joissain tutkimuksissa on *Chlorella vulgaris* -mikrolevällä päästy epäorgaanisen typen osalta 86 % ja fosforin osalta 78 % (Abdel-Raouf, Al-Homaidan & Ibraheem, 2012). Näihin lukuihin verrattuna tässä opinnäytetyössä saadut tulokset ovat typen osalta jopa parempia. Fosforin osalta päästään parempiin tuloksiin vasta kolmannessa kasvatuksessa. Fosforitarkastelua vaikeutti se, että kahdessa ensimmäisessä kasvatuksessa altaaseen oli lisätty fosforihappoa.

Mikäli vertaillaan tuloksia HS-Veden vedenpuhdistamoille asetettuihin vaatimuksiin, jäävät tuloksista saadut arvot fosforin osalta kauas vaatimuksista kahdessa ensimmäisessä kasvatuksessa (taulukko 6, s. 34). Ammoniumtypen osalta kaikissa kasvatuksissa ja fosforin osalta kolmannessa kasvatuksessa päästään suhteellisen lähelle tavoiteltuja arvoja. Mahdollisesti kahdessa ensimmäisessäkin kasvatuksessa fosforin osalta oltaisiin päästy lähemmäs tavoitetta, jos fosforihappoa ei olisi lisätty altaaseen. Levällä puhdistamalla saadaan suurin osa ravinteista uudelleen kiertoon toisin kuin monella muulla puhdistusmenetelmällä, missä esimerkiksi typpi päästetään ilmaan N_2-muodossa. On myös syytä pohtia leväkasvatuksen ja perinteisesti käytettyjen vedenpuhdistusmenetelmien kustannuksia. (HS-vesi, n.d.)

Taulukko 6. Leväkasvatuksella saadut tulokset ja HS-Veden vedenpuhdistamoille asetettuja poistuvan veden puhtausvaatimuksia

	Leväkasvatuksella saadut tulokset			Vaadittu veden puhtaus		
	1. kasvatus	2. kasvatus	3. kasvatus	Lammin puhdistamo	Toijalan puhdistamo	Paroisten puhdistamo
Ammoniumtyppi (mg/l)	9,8	4,2	6,3	4	8	4
Fosfori (mg/l)	38,6	14,7	1,6	0,5	0,3	0,3
Reduktio NH4+	94 %	97 %	98 %	90 %	-	-
Reduktio P	46 %	44 %	88 %	92 %	95 %	95 %

Suotovedessä kasvatetulle mikrolevälle voisi olla monia käyttökohteita, ja suotovesi voisi toimia hyvänä ravinnelähteenä mikrolevälle, mikäli sopiva käyttökohde löydetään. Yksi esimerkki voisi olla mikrolevän käyttäminen lannoitteena, mutta vielä on epäselvää, onko suotovedessä kasvatettu levä soveltuvaa lannoitteeksi. Suoto- tai jätevedessä kasvatetussa levässä voi kuitenkin ilmetä ongelmia kontaminaatioon, kuten haitta-aineiden kertymiseen liittyen (Wang & Lan, 2010, s. 18).

Mikrolevän biomassan kasvattamiseen tässä rakennettu leväallaskasvattamo ja tutkittu suotovesi soveltuu hyvin. Haasteita kuitenkin ilmenee levän talteenotossa, mikäli tavoitteena on saada lähes kaikki levä talteen. Levän erottaminen liittyvät haasteet vaativat vielä lisää työtä. Myöskään OD-mittauksella ei voi määrittää levän määrää kovinkaan tarkasti, mutta pintapuoliseen arvioon mahdollisesti toimiva vaihtoehto.

Valitettavasti tasaista kiertoa ja homogeenistä sekoitusta ei voinut tässä työssä mittauksin varmistaa. Silmämääräisesti pystyttiin vain toteamaan, että levä sekoittui altaassa hyvin, eikä vajonnut pohjalle tai kerääntynyt epätasaisesti altaaseen. Kuitenkaan näytteiden homogeenisyydessä on vaihtelua, esimerkiksi tulosten hajonnat ovat joissain tapauksissa melko suuria. Tämä viittaisi siihen, ettei ihan toivottuun tasalaatuisuuteen päästy näytteitä käsiteltäessä. Hajonta tuloksissa voi johtua näytteiden käsittelystä, eikä välttämättä merkitse, ettei altaassa olisi tapahtunut homogeenistä sekoitusta.

Jatkokokeissa voisi pyrkiä kasvuolosuhteiden parempaan säätämiseen. Tärkein kehityskohde olisi ehkä juurikin pH:n säätömahdollisuus. Vaikkakin ulkona sijaitseva allas on säiden armoilla, esimerkiksi ylimääräisellä valaistuksella, ravinteiden lisäyksellä, pH:n säädöllä voitaisiin vaikuttaa niin biomassan määrään kuin suotoveden ravinteiden vähenemään. Myös eri mikrolevälajeilla voisi suotoveden käsittelyssä päästä erilaisiin puhdistustuloksiin. Eri lajit voisivat tuoda levälle myös uusia käyttösovelluksia vedenpuhdistuksen rinnalle.

LÄHTEET

Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A. & Ibraheem, I. B. M. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi journal of biological sciences*, *19*(3), s. 257–275. Haettu 15.4.2019. https://www.doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005

Barsanti, L. & Gualtieri, P. (2014). *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. CRC press. Haettu 4.6.2018. Ebook Central -tietokanta.

Béchet, Q., Shilton, A. & Guieysse, B. (2013). Modeling the effects of light and temperature on algae growth: state of the art and critical assessment for productivity prediction during outdoor cultivation. *Biotechnology advances*, *31*(8), s. 1648–1663. Haettu 20.5.2018. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.014

De Godos, I., Arbib, Z., Lara, E. & Rogalla, F. (2016). Evaluation of high rate algae ponds for treatment of anaerobically digested wastewater: effect of CO2 addition and modification of dilution rate. *Bioresource technology*, *220*, s. 253–261. Haettu 21.5.2018. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.056

Hach. (n.d.a.) Nitrate cuvette test 0.23-13.5 mg/L NO3-N. Haettu 13.2.2019 osoitteesta https://uk.hach.com/nitrate-cuvette-test-0-23-13-5-mg-l-no-sub-3-sub-n/product?id=26370291438

Hach. (n.d.b.) Phosphate (Ortho/Total) cuvette test 0.05-1.5 mg/L PO4-P. Haettu 13.2.2019 osoitteesta https://uk.hach.com/phosphate-ortho-total-cuvette-test-0-05-1-5-mg-l-po-sub-4-sub-p/product?id=26370291448

HS-vesi. (n.d.) Jätevesien käsittely. Haettu 1.4.2019 osoitteesta https://hsvesi.fi/vesi-ja-vesihuolto/jatevesien-kasittely/

Kiertokapula Oy. (2017) Vuosikatsaus 2017. Jätevedet. Haettu 18.4.2019 osoitteesta https://www.kiertokapula.fi/wp-content/uploads/2018/05/Vesien-tarkkailu-2017-taulukot-210518.pdf

Kumar, A., Guria, C. & Pathak, A. K. (2018). Optimal cultivation towards enhanced algae-biomass and lipid production using Dunaliella tertiolecta for biofuel application and potential CO2 bio-fixation: Effect of nitrogen deficient fertilizer, light intensity, salinity and carbon supply strategy. *Energy*, *148*, s. 1069–1086. Haettu 19.5.2018. https://doi.org/10.1016/j.energy.2018.01.042

Opetushallitus. (n.d.) Laboratorioanalyysit. Kokonaistypen määritys jätevedestä. Haettu 10.4.2019 osoitteesta http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/ymparistoanalyysit_kokonaistypen_maaritys_jatevedesta.html

Orbit Biotech™. (2018). Bacterial Growth Curve. Haettu 14.4.2019 osoitteesta https://orbitbiotech.com/bacterial-growth-curve-generation-time-lag-phase-log-phase-exponential-phase-decline-phase/

Perez-Garcia, O. & Bashan, Y. (2015). Growth modes of algae (microalgae) cultivation. Haettu 1.2.2019 osoitteesta https://doi.org/10.1007/978-3-319-20200-6_3

Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y. & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of Chlorella vulgaris: a review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 35, s. 265–278. Haettu 6.6.2018. https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007

Schnurr, P. J. & Allen, D. G. (2015). Factors affecting algae biofilm growth and lipid production: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews, 52,* s. 418–429. Haettu 19.5.2018. https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.090

Seneye LTD. (2018) Water chemistry. What is ammonia NH3 & NH4. Haettu 18.4.2019 osoitteesta http://answers.seneye.com/en/water_chemistry/what_is_ammonia_NH3_NH4

SFS-EN-872:en. (2005) Water quality. Determination of suspended solids. Method by filtration through glass fibre filters. SFS Online. Haettu 1.2.2019 osoitteesta https://online.sfs.fi

Thiansathit, W., Keener, T. C., Khang, S. J., Ratpukdi, T. & Hovichitr, P. (2015). The kinetics of Scenedesmus obliquus microalgae growth utilizing carbon dioxide gas from biogas. *Biomass and bioenergy*, *76*, s. 79–85. Haettu 19.5.2018. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.03.012

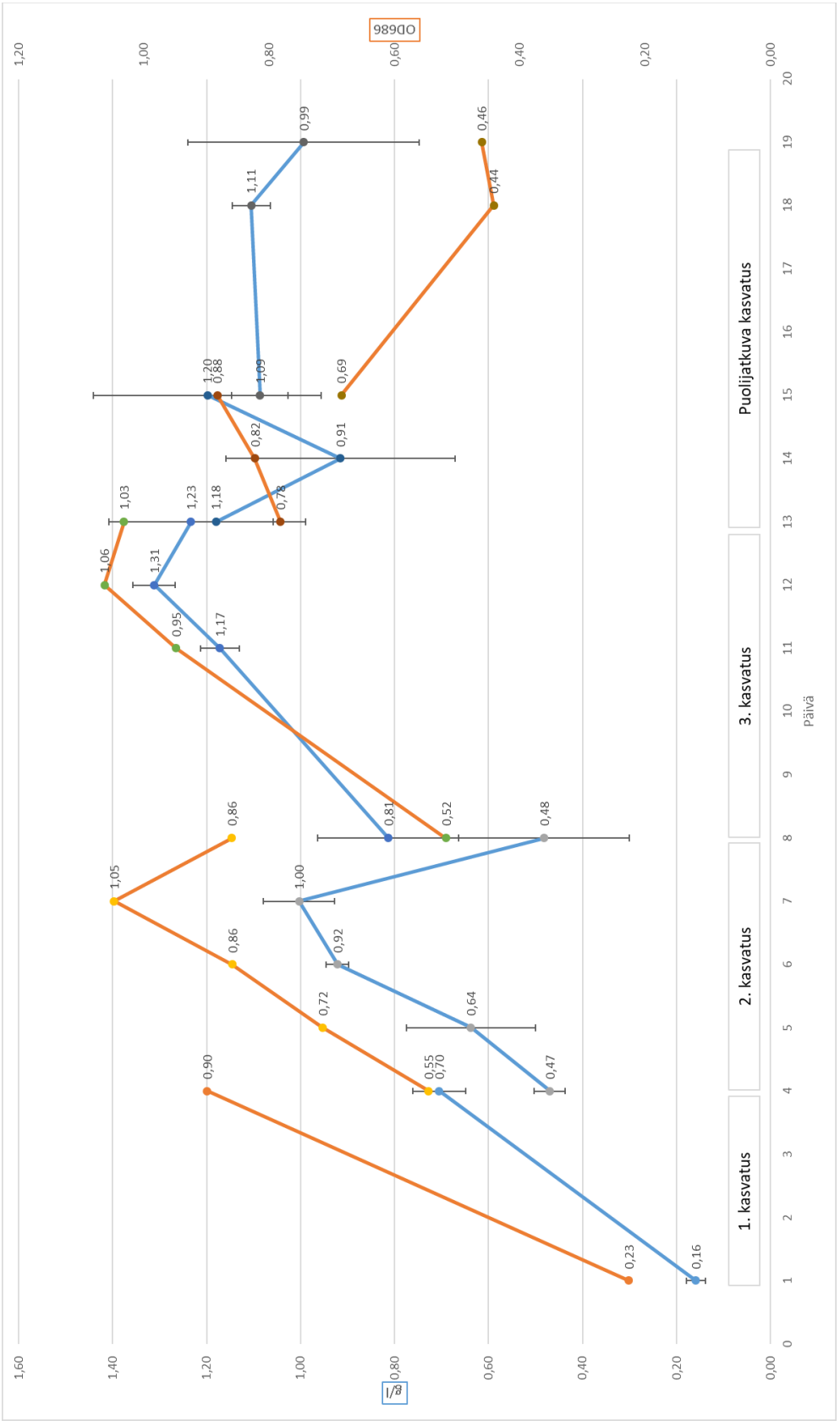
Vanajavesikeskus. (2019) Leväsieppari-hanke – ravinteet talteen ja kiertoon luonnonmukaisesti. Haettu 14.4.2019 osoitteesta https://www.vanajavesi.fi/levasieppari-hanke-ravinteet-talteen-ja-kiertoon-luonnonmukaisesti/

Wang, B. & Lan, C. (2010). *Microalgae for Biofuel Production and CO2 Sequestration*. Nova Science Publishers, Inc. Haettu 11.4.2019. E-book Central -tietokanta

Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G. & Ying-xue, S. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga Scenedesmus sp. *Bioresource technology*, *101*(14), s. 5494–5500. Haettu 21.5.2018. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.016

Liite 1

Leväsuspension kiintoainepitoisuudet ja OD_{686}-tulokset eri kasvatuksissa.



Liite 2

Analyysitulosten keskiarvot ja -hajonnat

Ymppi	TSS (g/l)	Stdev TSS	NH4+ (mgN/kg)	Stdev NH4+	N-tot (mgN/l)	Stdev N-tot	Suotoved-en-N (mgN/l)	Stdev suotovesi N	Fosfori (mg/l)	Keskihajon-ta fosfori	OD 750	OD 686 (leväspesifi-nen)	pH
13.7.	0,61	0,01	49,79	0,23	85,79	1,80	54,48	3,91	69,17	3,89	0,45	0,54	8,23
1. Kasvatus													
13.7.	0,16	0,02	162,90	0,91	134,44	7,75	112,08	2,52	72,03	0,21	0,20	0,23	6,95
16.7.	0,70	0,06	9,77	0,60	44,31	0,68	27,21	2,08	38,60	0,87	0,78	0,90	9,43
2. Kasvatus													
16.7.	0,47	0,03	148,25	0,68	137,32	5,59	118,99	4,64	26,50	0,56	0,49	0,55	7,50
17.7.	0,64	0,14	103,79	0,30	-	-	-	-	-	-	0,63	0,72	8,71
18.7.	0,92	0,02	41,99	1,51	-	-	-	-	-	-	0,75	0,86	8,96
19.7.	1,00	0,08	9,66	0,08	-	-	-	-	-	-	0,89	1,05	9,20
20.7.	0,48	0,18	4,19	0,09	37,68	4,14	25,35	0,71	14,71	0,08	0,74	0,86	9,29
3. Kasvatus													
20.7.	0,81	0,15	282,31	1,05	276,60	8,69	268,03	1,98	13,23	0,10	0,47	0,52	7,40
23.7.	1,17	0,04	2,63	0,86	-	-	-	-	-	-	0,80	0,95	10,18
24.7.	1,31	0,04	7,01	1,12	-	-	-	-	-	-	0,90	1,06	10,70
25.7.	1,23	0,17	6,26	0,04	67,08	6,10	21,03	0,77	1,55	0,00	0,91	1,03	11,00
4. Kasvatus													
25.7.	1,23	0,19	101,93	0,27	-	-	-	-	-	-	0,70	0,78	9,53
26.7.	1,18	0,24	74,48	1,26	-	-	-	-	-	-	0,73	0,82	9,97
27.7.	1,20	0,24	15,69	0,05	-	-	-	-	-	-	0,79	0,88	8,90
27.7.	1,09	0,06	70,02	0,17	-	-	-	-	-	-	0,62	0,69	8,37
30.7.	1,11	0,04	4,83	0,42	-	-	-	-	-	-	0,42	0,44	8,72
31.7.	0,99	0,25	4,45	0,09	-	-	-	-	-	-	0,44	0,46	8,90