

# MIKROLEVIEN KASVATUS KALAPROSESSIVEDESSÄ



Ammattikorkeakoulututkinnon opinnäytetyö

Bio- ja elintarviketekniikka, insinööri (AMK)

Syky 2023

Iida Pirnes

Wilma Silvennoinen

Bio- ja elintarviketekniikan koulutus

Tiivistelmä

Tekijä Iida Pirnes & Wilma Silvennoinen

Vuosi 2023

Työn nimi Mikrolevien kasvatus kalaprosessivedessä

Ohjaajat Satu Kivimäki & Ulla Moilanen

---

## TIIVISTELMÄ

Opinnäytetyön tilaajana oli Vesistä biovoimaa ja ravinteita, eli BioVeRa-hanke. Hankkeen tavoitteena on vähentää Kanta-Hämeen alueella teollisuusvesien kuormittavuutta ja saada niistä ravintoaineet hyötykäyttöön. Hankkeen pääidea on biokaasu-levä-biojalostamo, joka tuottaa toimiessaan biokaasua sekä mikrolevämassaa. Biomassaa on tarkoitus tuottaa mikroleväkasvatuksilla. Opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää mikä mikroleväkanta tuottaa massallisesti parhaan lopputuloksen kalaprosessivesikasvatuksissa. Työ suoritettiin Hämeen ammattikorkeakoulun Hämeenlinnan kampuksella laboratoriotiloissa. Tutkimuksissa käytetty kalaprosessivesi saatiin Riihimäellä sijaitsevalta Rasmixilta.

Tutkimuksen aikana selvitettiin, millaisia sivuvirtakasvatuksia aikaisemmin on tehty ja mitä eri mikroleväkantoja näissä kasvatuksissa on käytetty. Aikaisemmista tutkimuksista myös selvitettiin, millaisia menetelmiä mikrolevien sivuvirtakasvatuksissa oli käytetty. Näiden perusteella tutkittaviksi leviksi valittiin *Euglena gracilis*, *Scenedesmus obliquus*, *Spirulina maxima* sekä *Selenastrum* sp. Levät löytyivät HAMK:n laboratorioista valmiiksi. Kasvatuksia suoritettiin yhteensä neljä. Jokainen kasvatusjakso kesti yhteensä kuusi päivää.

Parhaan massallisen lopputuloksen antoi *E. gracilis*, jonka suurimmaksi kuivapainotulokseksi saatiin 9,44 g/l. Toinen potentiaalinen mikrolevä kasvatusten perusteella oli *S. obliquus*, jonka paras kuivapaino oli 7,12 g/l. *S. maxima* ja *Selenastrum* sp. -kantojen kasvatukset eivät onnistuneet kalaprosessivedessä.

Avainsanat Mikrolevä, kasvatus, kalaprosessivesi

Sivut 61 sivua ja liitteitä 27 sivua

Degree Programme in Biotechnology and Food Engineering

**Abstract**

Author Iida Pirnes & Wilma Silvennoinen

Year 2023

Subject Microalgae Cultivation in Fish Process Water

Supervisors Satu Kivimäki and Ulla Moilanen

---

## ABSTRACT

This thesis was commissioned by the BioVera project on Biopower and Nutrients from Water. The goal of the project is to reduce the load of industrial waters in the Kanta-Häme region and to obtain nutrients from them. The basic concept is a biogas-algae biorefinery, which generates biogas and biomass when operating. Biomass is to be produced by microalgae cultivation. The aim of this thesis was to find out which microalgae strains achieve the best result in fish processing water cultivation. The research was conducted at Häme University of Applied Sciences' Hämeenlinna campus in its laboratory facilities. The fish processing water used in the studies was obtained from Rasmix, which is a company located at Riihimäki.

During the project, previously produced types of side stream cultures and the different strains of microalgae used in these cultures were examined. Previous studies focused on the techniques used for growing microalgae in side streams. Based on these, *Euglena gracilis*, *S. obliquus*, *Spirulina maxima*, and *Selenastrum sp.* were chosen as the algae to be examined. The algae were already available at HAMK's laboratories. A total of four cultivation processes were carried out. Each cultivation period lasted for a total of six days.

*E. gracilis* provided the best mass result, with a maximum dry weight result of 9.44 g/l.

Another potential microalgae based on the cultivations was *S. obliquus*, which had the best dry weight of 7.12 g/l. The cultivation attempts with *Selenastrum sp.* and *S. Maximian* failed to grow in the fish processing water.

Keywords Microalgae, cultivation, fish processing water

Pages 61 pages and appendices 27 pages

## Sisällys

1	Johdanto .....	1
2	Mikrolevät .....	2
3	Mikrolevien kasvatust nestemäisissä sivuvirroissa .....	3
3.1	Sivuvirtojen käyttö mikroleväkasvatuksissa .....	3
3.2	Sivuvirtakasvatukseen sopivat mikrolevät .....	6
3.3	Kasvatustmenetelmät mikrolevien sivuvirtakasvatuksissa .....	11
4	Mikrolevien rooli kestävässä kehityksessä .....	14
5	Kasvatukseen valitut mikrolevät .....	15
5.1	<i>Mikrolevä E. gracilis</i> valinta .....	15
5.2	<i>Mikrolevä S.obliques</i> valinta .....	15
5.3	<i>Mikrolevä S. maxima</i> valinta .....	15
5.4	<i>Mikrolevä Selenastrum</i> sp. valinta .....	16
6	Työn menetelmät .....	17
6.1	Kalaprosessiveden käsittely .....	17
6.2	Kalaprosessiveden ravintoainemääritykset .....	18
6.2.1	Kokonaisfosforin, liukoisen fosforin sekä fosfaatin määrittely .....	18
6.2.2	pH:n määrittely .....	19
6.2.3	COD:n määrittely .....	19
6.2.4	Ammoniumtypen ja kokonaistypen määrittely .....	20
6.3	Mikrolevän kasvatust + näytteenotto .....	22
6.4	Kuiva-ainemääritykset .....	23
7	Tulokset ja tulosten tarkastelu .....	25
7.1	Kalaprosessiveden ravintoainemääritykset .....	25
7.1.1	Kokonaisfosforin, liukoisen fosforin sekä fosfaatin määrittely .....	25
7.1.2	pH:n määrittely .....	26
7.1.3	COD:n määrittely .....	27
7.1.4	Kokonaistypen ja ammoniumtypen määrittely .....	27
7.2	Kasvatust 1, <i>E. gracilis</i> .....	28
7.3	Kasvatust 2, <i>S. Obliques</i> .....	34
7.4	Kasvatust 3, <i>S. Maxima</i> .....	39
7.5	Kasvatust 4, <i>Selenastrum</i> sp. ....	44

8	Kasvatusten johtopäätökset.....	51
9	Yhteenveto .....	57
	Lähteet.....	59

## Kuvat, taulukot ja kaavat

Kuva 1.	<i>C. vulgaris</i> .....	7
Kuva 2.	<i>Spirulina</i> .....	8
Kuva 3.	<i>E. gracilis</i> .....	9
Kuva 4.	<i>Selenastrum</i> sp.....	10
Kuva 5.	<i>S. obliquus</i> .....	11
Kuva 6.	Kokonaisfosforin, liukoisen fosforin ja fosfaatin pitoisuus kalaprosessivedessä.	26
Kuva 7.	Kalaprosessiveden kokonais- ja liukoisen COD:n pitoisuudet. ....	27
Kuva 8.	Kalaprosessiveden ammoniumtyypen ja kokonaistypen pitoisuudet.....	28
Kuva 9.	Kasvatus 1. kasvukäyrät perustuen <i>E. gracilis</i> -levän kuivapainoon (g/l).....	29
Kuva 10.	1.kasvatus, <i>E. gracilis</i> , näytteiden prosessivesipitoisuus 100 %.....	29
Kuva 11.	1.kasvatus, <i>E. gracilis</i> , näytteiden prosessivesipitoisuus 75 %.....	30
Kuva 12.	1.kasvatus, <i>E. gracilis</i> , näytteiden prosessivesipitoisuus 50 %.....	31
Kuva 13.	1.kasvatus, <i>E. gracilis</i> , Näytteiden prosessivesipitoisuus 25 % .....	31
Kuva 14.	1.kasvatus, <i>E. gracilis</i> , näytteiden prosessivesipitoisuus 0 %.....	32
Kuva 15.	1.kasvatus, kontrollinäytteet. ....	32
Kuva 16.	<i>E. gracilis</i> mikroskooppikuva, kasvatuspäivä 5, näytteen prosessivesipitoisuus 50 %. .....	33
Kuva 17.	<i>E. gracilis</i> mikroskooppikuva, päivä 6, näytteen prosessivesipitoisuus 100 %.	33
Kuva 18.	<i>E. gracilis</i> -levän kasvatuksessa muodostunutta ei toivottua kasvustoa 100 % kalavettä sisältäneessä näytteessä kuudentena kasvatuspäivänä. ....	34
Kuva 19.	Kasvatuksen 2. kasvukäyrät perustuen <i>S.obliquus</i> in kuivapainoon (g/l).. ....	35
Kuva 20.	2.kasvatus, <i>S.obliquus</i> , päivät 0, 3–6. Näytteen prosessivesipitoisuus 100 %.	35
Kuva 21.	2.kasvatus, <i>S.obliquus</i> , päivät 0, 3–6. Näytteen prosessivesipitoisuus 75 %.	36
Kuva 22.	2.kasvatus, <i>S.obliquus</i> , päivät 0, 3–6. Näytteen prosessivesipitoisuus 50 %.	37
Kuva 23.	2.kasvatus, <i>S.obliquus</i> , päivät 0, 3–6. Näytteen prosessivesipitoisuus 25 %.	37
Kuva 24.	2.kasvatus, <i>S.obliquus</i> , päivät 0, 3–6. Näytteen prosessivesipitoisuus 0 %.	38

Kuva 25. 2.kasvatus, kontrollinäytteet, päivät 0, 3–6. ....	38
Kuva 26. <i>S.obliquus</i> mikroskooppikuvassa, näytteen prosessivesipitoisuus 0 %,.....	39
Kuva 27. <i>S.obliquus</i> kuvattuna mikroskoopilla, näytteen prosessivesipitoisuus 100 %, päivä 6.....	39
Kuva 28. Kasvatuksen 3. kasvukäyrät perustuen <i>S. maxima</i> -levän kuivapainoon (g/l)....	40
Kuva 29. 3.kasvatus, <i>S. maxima</i> , päivät 0, 3–6. Näytteen prosessivesipitoisuus 100 %. 40	
Kuva 30. 3.kasvatus, <i>S. maxima</i> , päivät 0, 3–6. Näytteen prosessivesipitoisuus 75 % ..	41
Kuva 31. 3.kasvatus, <i>S. maxima</i> , päivät 0, 3–6. Näytteen prosessivesipitoisuus 50 % ..	42
Kuva 32. 3.kasvatus, <i>S. maxima</i> , päivät 0, 3–6. Näytteen prosessivesipitoisuus 25 % ..	42
Kuva 33. 3.kasvatus, <i>S. maxima</i> , päivät 0, 3–6. Näytteen prosessivesipitoisuus 0 % ....	43
Kuva 34. 3.kasvatus, kontrollinäytteet, päivät 0, 3–6. ....	43
Kuva 35. <i>S. maxima</i> kuvattuna mikroskoopilla, näytteen prosessivesipitoisuus 0 %, päivä 6.....	44
Kuva 36. <i>S. maxima</i> kuvattuna mikroskoopilla, näytteen prosessivesipitoisuus 100 %, päivä 6.....	44
Kuva 37. Kasvatuksen 4. kasvukäyrät perustuen <i>Selenastrum</i> sp. -levän kuivapainoon (g/l). ....	45
Kuva 38. 4.kasvatus, <i>Selenastrum</i> sp., päivät 0, 3–6. Näytteen prosessivesipitoisuus 100 %. ....	46
Kuva 39. 4.kasvatus, <i>Selenastrum</i> sp., päivät 0, 3–6. Näytteen prosessivesipitoisuus 75 % . ....	46
Kuva 40. 4.kasvatus, <i>Selenastrum</i> sp., päivät 0, 3–6. Näytteen prosessivesipitoisuus 50 % . ....	47
Kuva 41. 4.kasvatus, <i>Selenastrum</i> sp., päivät 0, 3–6. Näytteen prosessivesipitoisuus 25 % . ....	47
Kuva 42. 4.kasvatus, <i>Selenastrum</i> sp., päivät 0, 3–6. Näytteen prosessivesipitoisuus 0 % . ....	48
Kuva 43. 4.kasvatus, kontrollinäytteet, päivät 0, 3–6. ....	48
Kuva 44. <i>Selenastrum</i> sp. kuvattuna mikroskoopilla. Näytteen prosessivesipitoisuus 0 %, kasvatuspäivä 6.....	49
Kuva 45. <i>Selenastrum</i> sp. kasvatuksen sisältämää rihmastoja mikroskooppikuvassa. Näytteen prosessivesipitoisuus 100 %, kasvatuspäivä 6, rinnakkaisnäyte 1. ....	49

Kuva 46. <i>Selenastrum</i> sp. kasvatuksen sisältämää rihmastoa mikroskooppikuvassa. Näytteen prosessivesipitoisuus 100 %, kasvatuspäivä 6, rinnakkaisnäyte 2. ....	50
Kuva 47. Kasvatuksen sisältämää rihmastoa mikroskooppikuvassa. Näytteen prosessivesipitoisuus 100 %, kasvatuspäivä 6, rinnakkaisnäyte 3. ....	50
Kuva 48. 3. kasvatuksessa käytettyä pH säädettyä kalaprosessivettä, jonka pohjalla paljon sakkaa. ....	53
Kuva 49. Kontrollinäyte 7 kuudentena kasvatuspäivänä. ....	56
Taulukko 1. Mikroleväkasvatuksessa käytetyt elintarviketuotannon nestemäiset sivuvirrat ja niissä kasvatetut mikroleväkannat .....	5
Taulukko 2. Kalaprosessiveden saanto ja sedimentin määrä.....	18
Taulukko 3. Kasvatussuunnitelma .....	23
Taulukko 4. Näytteenottosuunnitelma .....	23
Taulukko 5. Kuiva-ainemäärityksen pipetoitavan näytteen määrä. ....	24
Taulukko 6. pH:n määrityksen tulokset.....	26
Kaava 1. Ammonium typen pitoisuus .....	21
Kaava 2. Typpipitoisuus .....	22
Kaava 3. Kuivapaino.....	24

## Liitteet

Liite 1	Mikrolevien eri teollisuusalojen sivuvirtakasvatukset
Liite 2	Kuiva-ainemäärityksen tulokset
Liite 3	NaOH-valmistusohje
Liite 4	Combo medium-valmistusohje

## 1 Johdanto

Mikrolevät ovat pieniä vesieliöitä, joilla on kyky muuntaa hiilidioksidia hapeksi ja orgaaniseksi aineeksi (Vale ym. 2020, ss. 382-384). Mikroleviä voidaan käyttää monissa käytännön sovelluksissa esimerkiksi sivuvirtojen hyödyntämisessä. Sivuvirrat ovat sivutuotteita tai jätevirtoja, joita syntyy tavaroiden, elintarvikkeiden ja palveluiden tuotannossa. Nämä virrat sisältävät usein arvokkaita resursseja, jotka voidaan ottaa talteen ja käyttää uudelleen, mikä auttaa vähentämään jätettä ja edistämään kestävyyttä. (Luoma-aho, 2018) Kasvattamalla mikroleviä sivuvirroissa on mahdollista poistaa ravinteita ja muita arvokkaita komponentteja ja muuttaa ne käyttökelpoiseksi luonnonvaraksi.

Työn tilaajana toimii BioVera hanke. BioVeran hankkeen tarkoitus on vähentää Kanta-Hämeen alueella teollisuusvesien kuormittavuutta ja löytää biokaasutuotantoon uusia potentiaalisia syötteitä. Kokeellisessa osiossa kasvatusalustana käytetty kalaprosessivesi saatiin Rasmixilta, jonka yritystoiminta keskittyy erityisesti biohajoavien, öljypohjaisten materiaalien kierrätykseen ja jalostukseen.

Tämän opinnäytetyön tavoitteena on tutkia mikroleviä vastaamalla tutkimuskysymyksiin, jotka ovat seuraavat:

1. Mitkä mikroleväkannat sopivat parhaiten kalaprosessivesikasvatukseen?
2. Millainen kasvatusmenetelmä mahdollistaa suurimman mikrolevämassan kasvun sivuvirtakasvatuksessa?
3. Mikä mikroleväkanta tuottaa suurimman massallisen lopputuloksen Rasmixin kalaprosessivedessä?

Kasvatukseen valittiin neljä erilaista mikroleväkantaa, jotka ovat *Euglena gracilis*, *Scenedesmus obliquus*, *Spirulina maxima* ja *Selenastrum* sp. Jokaista kantaa kasvatettiin yhteensä viikon ajan. Kasvatuksien olosuhteet vastasivat täysin toisiaan. *Spirulinan* kasvatus poikkesi hieman muista, sillä sen pH säädettiin sille optimaaliseksi parhaan kasvatustuloksen aikaansaamiseksi.

## 2 Mikrolevät

Mikrolevät ovat pienikokoisia, 5–50 µm alkueliöitä (Bejor ym., 2013, ss. 1-2). Ne ovat yksisoluisia eliöitä, joita ei luokitella kasveiksi, eläimiksi tai sieniksi. Mikrolevät ovat monimuotoisia ja löytyvät erilaisista elinympäristöistä, kuten makeasta vedestä, meriympäristöistä ja maaperästä. Mikroleviä on tunnistettu yli 25 000 lajia. Ne voidaan luokitella eukaryoottisiksi pieneliöksi tai prokaryoottisiksi, kuten syanobakteereiksi. Mikrolevät voidaan myös lajitella aineenvaihdunnassa käytetyn energian ja hiililähteen mukaan auto-, hetero- ja miksotrofisiin kasvutapoihin. (Rikkinen, 1999, ss. 35-36; Vale ym., 2020, s. 382)

Autotrofit pystyvät tuottamaan omaa ravintoa epäorgaanisista aineista. Ne tuottavat energiaa fotosynteesin yhteyttämisen avulla eli auringosta tulevaa energiaa hiilidioksidin ja veden muuntamiseen orgaaniseksi aineeksi. Näillä mikro-organismeilla on pigmenttejä, kuten klorofylliä, joiden avulla ne voivat vangita auringonvaloa ja muuntaa sen kemialliseksi energiaksi fotosynteesin avulla. Vaihtoehtoisesti jotkin autotrofiset mikrolevät voivat saada energiaa epäorgaanisista yhdisteistä, kuten nitraateista, ammoniakista tai sulfaateista. Niillä on merkittävä rooli vesiekosysteemeissä alkutuottajina, jotka tarjoavat elintärkeän ravinnon ja hapen lähteen muille organismeille ja edistävät ekosysteemin yleistä tasapainoa. (Vale ym., 2020, ss. 382-383, 399; Salbitani & Carfagna, 2021, ss. 2-5; Maltsev ym., 2021)

Heterotrofit eivät pysty tuottamaan omaa ravintoaan. Ne saavat tarvitsemansa energian ja ravintoaineet hajottamalla orgaanista ainetta. (Dodds, 2007, ss. 314, 329) Miksotrofit pystyvät käyttämään sekä autotrofisia että heterotrofisia ravitsemustapoja. Ne voivat tuottaa energiaa fotosynteesin kautta tai löytävät ravintoa muista lähteistä. (Sieracki, 2019, ss. 493, 498) Mikrolevät voivat kasvaa valoisissa, sekä pimeissä *olosuhteissa*.

Mikrolevien koostumus riippuu lajista ja elinympäristöstä. Ne voivat sisältää esimerkiksi proteiineja, rasvoja, hiilihydraatteja, hivenaineita ja muita ravintoaineita. (Wells ym., 2016, s. 3) Jotkut mikrolevälajit voivat sisältää fykosyaniinia tai astaksantiinia, jotka antavat niille värin. Mikrolevän sisältävä pigmentti auttavat niitä suojautumaan auringonvalolta. Jotkut mikrolevälajit sisältävät runsaasti proteiineja ja muita ravinteita, kun taas toisissa voi olla enemmän pigmenttejä tai muita erityisiä yhdisteitä. (Morais ym., 2018; Patel ym., 2022)

Mikrolevien erityinen koostumus voi vaihdella suuresti lajista ja ympäristöolosuhteista

riippuen. Lisäksi mikrolevien koostumukseen voivat vaikuttaa lämpötila ja ravinteiden saatavuus ympäristössä. (Gonçalves ym., 2019)

### **3 Mikrolevien kasvatusta nestemäisissä sivuvirroissa**

Sivuvirta viittaa jonkin prosessin tai kokeen aikana syntyviin sivutuotteisiin tai materiaaleihin, jotka eivät ole pääkohteen keskeisiä tavoitteita. Elintarviketeollisuuden prosesseissa syntyy sivuvirtoja, esimerkiksi juustonvalmistuksen sivuvirtana syntyy heraa, joka ei ole varsinaisesti halutun tuotteen osa. Nämä sivuvirrat voivat kuitenkin olla arvokkaita muihin tarkoituksiin, kuten lääketieteelliseen tai teolliseen käyttöön, ja niiden hyödyntäminen on tärkeää resurssitehokkuuden ja kestävyuden näkökulmasta. (Sitra, 2019; University of Helsinki, 2023)

Mikrolevien viljelyä nestemäisissä elintarviketuotantojen sivuvirroissa pidetään ihanteellisena skenaariona erityisesti mikroleväraaka-aineen saamiseksi biopolttoaineiden käyttöön (Wang ym., 2015, ss. 619-625). Mikroleviä voidaan tuottaa myös korkealaatuisen proteiinin sekä luonnonpigmenttien takia (Han & Zhou, 2021).

Mikrolevien käyttö biopolttoaineiden tuotannossa ja jäteveden käsittelyssä on herättänyt maailmanlaajuisia kiinnostusta, sillä liiallinen riippuvuus uusiutumattomista energialähteistä ja fossiilisten polttoaineiden ehtyminen, on herättänyt tarpeen kehittää uusia ekologisia tapoja tuottaa biomassaa biopolttoaineiden raaka-aineeksi. (Acebu ym., 2022, s. 352) Myös maailmanlaajuiset ympäristöongelmat, esimerkiksi puhtaan veden riittämätön saanti monissa eri kehitysmaissa sekä lukuisat orgaaniset ja epäorgaaniset epäpuhtaudet jätevesissä, ovat muodostumassa ongelmaksi. (Wollmann ym., 2019, ss. 860-871) Samaan aikaan elintarvikkeiden prosessointi ja kulutus kasvaa hurjaa vauhtia, jonka seurauksen myös erilaiset tuotantosivuvirrat kasvavat. Pelkästään Suomessa syntyvien sivuvirtojen määrä on vuosittain satojatuhansia tonneja. (Vainikainen, 2017)

#### **3.1 Sivuvirtojen käyttö mikroleväkasvatuksissa**

Mikrolevien kasvatuksissa on kokeiltu käyttää erilaisten elintarviketehtaiden sivuvirtoja. Yksi hyvä esimerkki tästä on meijerilaitosten sivuvirrat. Yksi syistä on viime aikoina kasvanut

maidon ja erilaisten kaura- ja maitotuotteiden kulutus. Tämän seurauksena meijerit tuottavat suuria määriä erilaisia sivuvirtoja, kuten heraa, nestemäistä raaka-ainehävikkiä ja huuhteluvesiä. (Choi, 2016) Jätevettä syntyy noin 2,5 litraa jokaista vastaanotettua maitolitraa kohti (Aho & Hilden, 2014, ss. 194-195). Toinen syy meijerisivuvirtojen käyttöön mikroleväkasvatuksissa on niiden korkea orgaanisen aineen pitoisuus, joka tekee käsittelemättömistäkin meijerisivuvirroista hyvän kasvualustan erilaisille mikroleville. (Choi, 2016)

Meijerisivuvirtojen lisäksi toista yhtä suosittua elintarviketeollisuuden alaa, jonka sivuvirtoja olisi käytetty mikroleväkasvatuksissa, ei ole. Lupaavia tuloksia on kuitenkin saatu esimerkiksi tofutuotannon sivuvirtana syntyvästä tofuhierasta, (Wang & Tian, 2018) soijakastiketuotannossa syntyvästä soijakastikejätteestä, (Han & Zhou, 2021) emävedestä, jota syntyy hiivantuotannossa (Mercier, 2018) ja sitruunahappotuotannon aikana syntyvästä jätevedestä. (Li & Wang, 2013) Kaikki käytetyt sivuvirrat löytyvät taulukosta Taulukko 1. Mikroleväkasvatuksessa käytetyt elintarviketuotannon nestemäiset sivuvirrat ja niissä kasvatetut mikroleväkannat

Kalojen perkuujätteiden öljyksi puristamisen prosessissa syntyvää sivuvirtaa ei ole ennen käytetty mikrolevien kasvatuksessa. Kuitenkin kalan kiertovesikasvatuksesta saatavaa kalankasvatusaltaiden kiertovettä, joka on rikastettu kalalietteellä, on kokeiltu käyttää mikrolevien kasvatusliuoksina. (Eskola, 2018, ss. 17-27; Tossavainen, 2018)

Taulukko 1. Mikroleväkasvatuksessa käytetyt elintarviketuotannon nestemäiset sivuvirrat ja niissä kasvatetut mikroleväkannat

Teollisuuden ala/ tuotantoprosessi	Käytetty sivuvirta	Kasvatettu levä	Lähde
Meijeriteollisuus, juustonvalmistus	juustohera	<i>Chlorella vulgaris</i>	(Gonçalves ym., 2019)
Maissin märkäjauhatus	maissiviina (corn steep liquor)	<i>Chlorella vulgaris</i>	(Gonçalves ym., 2019)
Sokeriruokoalkoholin valmistus	sokeriruokovinassi	<i>Chlorella vulgaris</i>	(Gonçalves ym., 2019)
Meijeriteollisuus, juustonvalmistus	juustohera	<i>Chlorella vulgaris</i>	(Abreu ym., 2012)
Makeisteollisuus	makeistuotannon jätevesi	<i>Arthospira (spirulina) platensis</i>	(El-Kassas ym., 2015)
Meijeriteollisuus	meijerituotannon jätevesi	<i>Chlorella sorokiniana</i>	(Hamidian & Zamani, 2022)
Meijeriteollisuus	meijerituotannon jätevesi	<i>Chlorella vulgaris</i>	(Sudhanthiran & Perumalsamy, 2022)
Melassin tuotanto	punajuurivinassi	<i>Spirulina platensis</i>	(Coca ym., 2015)
Meijeriteollisuus	meijerituotannon jätevesi	<i>Chlorella vulgaris</i>	(Choi, 2016)
Soijakastike tuotanto	soijakastikejäte	<i>Spirulina maxima</i>	(Han & Zhou, 2021)
Lihanjalostus	eri lihanjalostusvaiheiden jätevedet	<i>Chlorella sp.</i>	(Lu ym., 2015)
Tislausprosessi	tislaamon jätevesi	<i>Spirulina sp.</i>	(Krishnamoorthy ym., 2019)
Tofun tuotanto	tofuherajätevesi	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	(Wang & Tian, 2018)
Elintarviketeollisuus	elintarviketeollisuuden jätevesi	<i>Cladophora sp. ja Spyrogyra sp.</i>	(Mureed ym., 2018)
Elintarviketeollisuus	ruokatehtaan jätevesi	<i>Botryococcys sp.</i>	(Gani ym., 2016)
Kalankasvatuslaitos	kalankasvatusaltaan kiertovesi	<i>Selensastrum sp. ja euglena gracilis mix</i>	(Eskola, 2018)
Kalankasvatuslaitos	kalankasvatusaltaan kiertovesi	<i>Selensastrum sp. ja euglena gracilis</i>	(Tossavainen, 2018)
Hiivantuotanto	emävesi	<i>Euglena gracilis</i>	(Mercier, 2018)
Sitruunahappotuotanto	sitruunahappojätevesi	<i>Chlorella vulgaris</i>	(Li & Wang, 2013)

### 3.2 Sivuvirtakasvatukseen sopivat mikrolevät

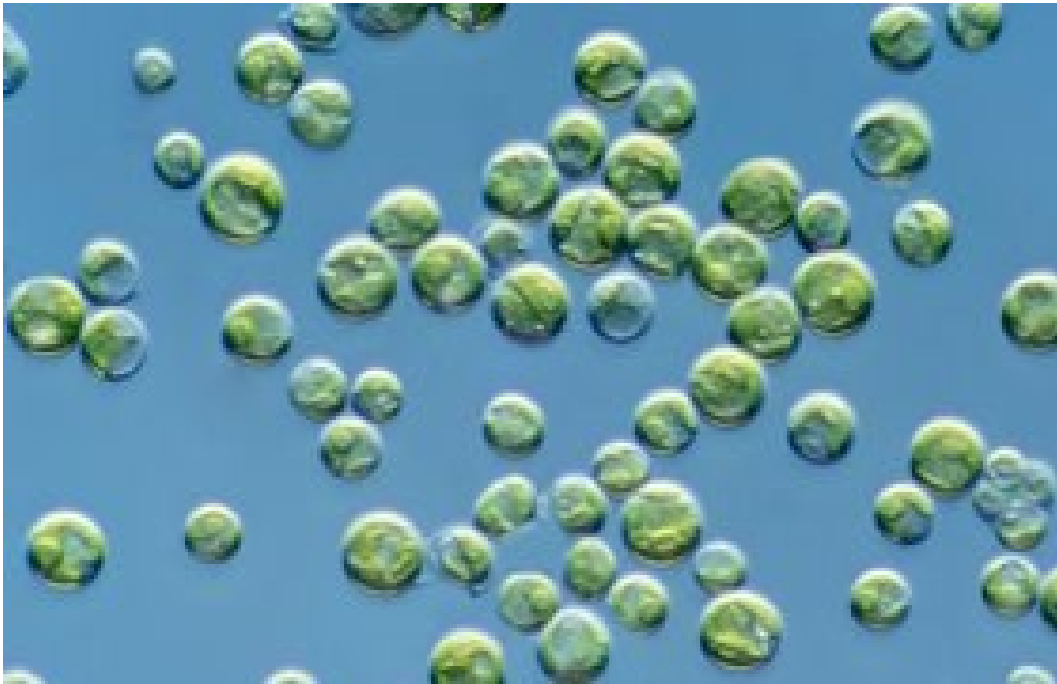
Elintarviketuotannon sivuvirtakasvatuksissa suosituimpia mikroleväkantoja ovat *Chlorella vulgaris*, *Arthrospira platensis (spirulina)* sekä *E. gracilis*. Näiden lisäksi yksittäisiä mikroleviä on kasvatettu erilaisissa sivuvirroissa. Esimerkiksi Malesiassa, ruokatehtaan jätevedessä on kasvatettu *Botryococcus* sp. mikrolevää. (Gani ym., 2016) Toinen hyvä esimerkki on *Spyrogyra* sp. - ja *Cladophora* sp. -levän kasvatusta määrittelemättömän elintarviketehtaan jätevedessä. Näistä kuitenkin *Cladophora* sp. tuotti enemmän biomassaa. (Mureed ym., 2018)

*C. vulgaris* on pallomainen yksisolainen aitotumallinen makean veden levä. Rakenne näkyy kuvassa Kuva 1. *C. vulgaris*. Sen pääaineenvaihduntatapa on fotosynteesi, sillä se sisältää yli 2 % klorofylliä. Sen energian lähteenä toimii siis pääosin auringonvalo. (Soccol ym., 2013, s. 409)

*C. vulgaris* sisältää huomattavan määrän vitamiineja, erilaisia mineraaleja, antioksidantteja, amino- ja rasvahappoja ja hyvin imeytyvää proteiinia. Tämän vuoksi sitä suositetaan erityisesti ravintolisänä. (Panahi ym., 2016) Sillä on myönnetty GRAS- sertifikaatti (Generally Recognized As Safe), eli sitä voidaan käyttää ravintona ilman terveydellistä riskiä. (Soccol ym., 2013, s. 408) Toinen *C. vulgaris*- levän käyttötapa on tuottaa siitä biodieseliä, sillä se sisältää runsaasti öljyä. (Panahi ym., 2019)

Mikroleväkasvatuksen näkökulmasta sitä on loistava kasvattaa erilaisissa sivuvirroissa, sillä se sietää suuria ympäristön vaihteluita. Käytännössä sen ominaiskasvunopeus on vakio, kun pH on yli 4,2. (Soccol ym., 2013, s. 409) *C. vulgaris* -levällä on myös korkea biomassan maksimipitoisuus, jopa 4,25 g/l. (Liu ym., 2021)

Kuva 1. *C. vulgaris* (Micropia, 2015)

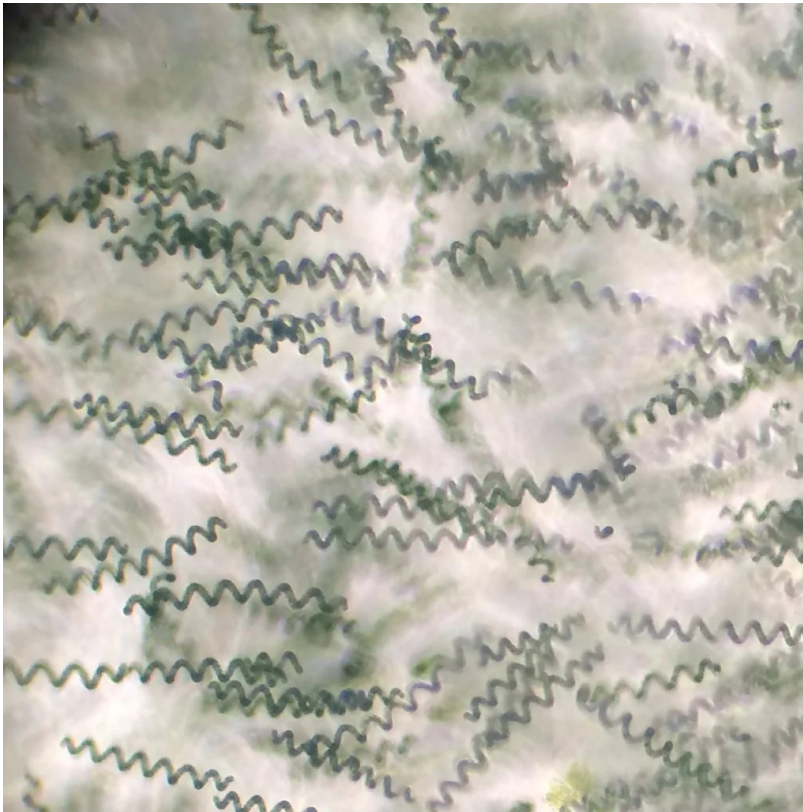


*Spirulina* on siniviherlevä, joka kuuluu syanobakteereihin. Sitä viljellään ensisijaisesti sen rikkaan ravintosisällön ja vahvan sinisen pigmentin vuoksi. Se on monisoluinen esitumallinen mikrolevä. Rakenteeltaan *Spirulina* on kierteinen, kuten kuvasta Kuva 2. *Spirulina* (Algae research and supply, 2018) voidaan nähdä. Fotosynteesin aikana se muuttaa kasvatusalustassa olevat ravinteet solumateriaaliksi ja vapauttaa samalla happea. (Soccol ym., 2013, s. 408-409)

*Spirulina* sisältää suuren määrän proteiineja, noin 50–70 % painostaan. Se myös sisältää hiilihydraatteja, rasvoja, karotenoideja, vitamiineja sekä monia kivennäisaineita, kuten rautaa, magnesiumia, kalsiumia, fosforia sekä kaliumia. Tämän vuoksi se luokitellaan superfoodiksi. Kuten *C. vulgaris*, *Spirulina* -leväkin on saanut GRAS-sertifikaatin. Tämän lisäksi se on saanut virallisen hyväksynnän proteiinien, vitamiinien ja kivennäisaineiden lähteenä FDA:lta (Food and Drug Administration). (Soccol ym., 2013, s. 408-409)

Sen biomassan kokonaistuotannon arvioidaan olevan noin 12 000 tonnia vuodessa. Luonnossa *Spirulina* kasvaa subtrooppisissa emäksissä järvissä, joiden lämpötila on yli 35 astetta. (Masojidek & Torzillo, 2014)

Kuva 2. *Spirulina* (Algae research and supply, 2018)



*E. gracilis* on mikrolevä, joka kuuluu silmälevien ryhmään, tarkemmin *euglena*-sukuun. Luonnossa se kasvaa makean veden lammikoissa ja pienissä vesistöissä, joissa on runsaasti ravinteita tarjolla. (Briggs, 2021) Muodoltaan se on soikean sukkulamainen, kuten kuvasta Kuva 3. *E. gracilis* voidaan nähdä. Soluseinän sijasta, solun ulkopinnalla on solukalvo, jota peittää ohut limakerros. Tätä solukalvoa kutsutaan periplastiksi. (Rikkinen, 1999, ss. 97-100)

*E. gracilis* sopeutuu helposti erilaisiin kasvuympäristöihin. Se voi kasvaa auto- tai heterotrofisesti erilaisissa olosuhteissa. Se sietää suuria orgaanisten epäpuhtauksien pitoisuuksia, esimerkiksi meijereiden jätevesiä. *E. Gracilis* pystyy elämään laajalla pH-alueella. (Barsanti & Gualteri, 2020)

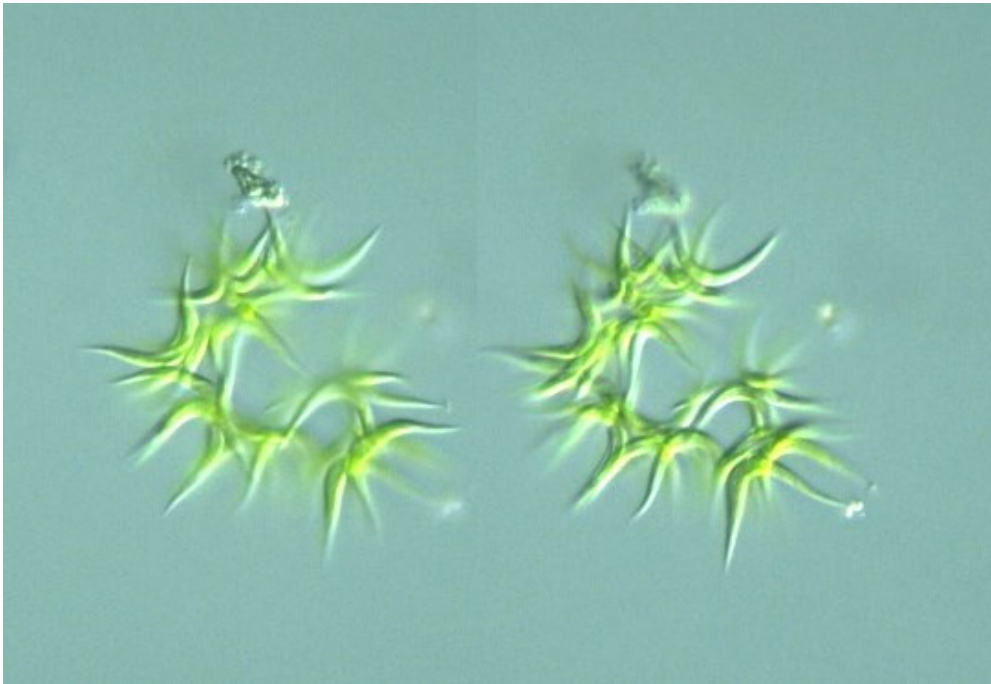
Kuva 3. *E. gracilis* (Busby, 2015)



*Selenastrum* sp. on viherlevä, joka kuuluu *Clorophyta*-sukuun. Se on makean veden mikrolevä, jota tavataan järvissä, lammissa ja joissa. Tämä mikrolevä viihtyy parhaiten leudoissa ja lämpimissä vesissä. *Selenastrum* sp. on muodoltaan sirppimäinen ja solujen kärjet ovat terävät. Kuvassa Kuva 4. *Selenastrum* sp. nähdään tarkemmin solujen muotoa. *Selenastrum* sp. kasvaa yleensä 4–16 solun ryppäissä. (Guiry & Guiry, 2021)

*Selenastrum* sp. kantaa pidetään potentiaalisena vaihtoehtona biopolttoaineisiin valmistuksen raaka-aineena sen korkean lipidisaannon vuoksi. Ummalyman ja Singhin tutkimuksessa *Selenastrum* sp. soluista tehdyn mikroleväöljyn rasvahappokoostumuksen todettiin omaavan oikeat ominaisuudet biopolttoaineen tuotantoa varten. (Ummalyman & Singh, 2022)

Kuva 4. *Selenastrum* sp. (server, 2015)

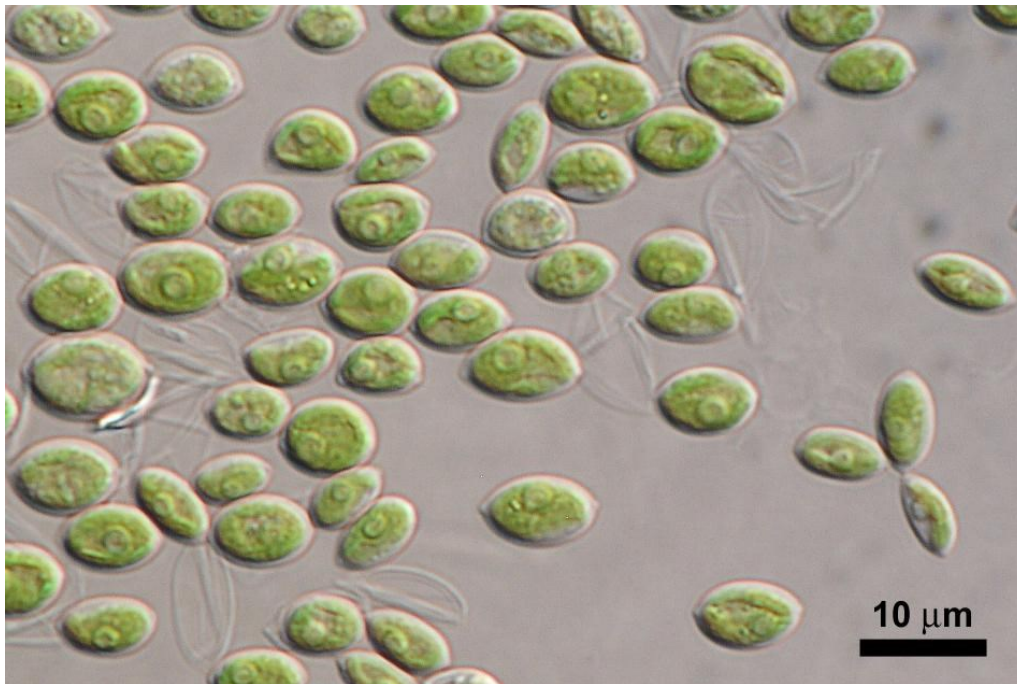


*Scenedesmus obliquus* ei noussut esille aikaisemmissa sivuvirtakasvatuksissa, mutta se on mielenkiintoinen ihmisravinnoksikin sopiva levä. *S. obliquus* on viherlevä, joka kuuluu *Scenedesmus*-mikrolevien sukuun. *Scenedesmus*-suvun lajit ovat tärkeä osa makean veden kasviplanktonia. (Tikkanen, 1986, s. 202) Ne kasvavat makeanveden järvissä sekä murtovesissä. Muodoltaan nämä mikrolevät ovat sukkulamaisia, kuten *E. gracilis*. Kuvassa Kuva 5. *S. obliquus* on nähtävillä tarkemmin *S. obliquus* -levän rakennetta. (Soccol ym., 2013, ss. 409-410)

*S. obliquus* ryhmittyy yleensä 4, 8 tai 16 leväsolun ryhmiin kasvaessaan. Poikkeuksena kuitenkin viljellyt *S. obliquus* -solut, jotka eivät muodosta solupesäkkeitä vaan pysyvät erillisinä. Nämä mikroleväsolut ovat yksiytimisiä ja ne sisältävät kloroplasteja, eli viherhiukkasia ja pyrenoideja. (Soccol ym., 2013, ss. 409-410)

*S. obliquus* -levää käytetään tällä hetkellä eniten biomassan tuotannossa. Sen käyttöä ravintona tai ravintolisänä tutkitaan parhaillaan, sillä *S. obliquus* sisältää muun muassa paljon proteiineja. Sen kuivapainosta 53 % on proteiineja, 29 % hiilihydraatteja, 15 % rasvoja ja 5 % mineraaleja ja kivennäisaineita. (Soccol ym., 2013, s. 409-410)

Kuva 5. *S. obliquus* (CCALA, 2020)



### 3.3 Kasvatusmenetelmät mikrolevien sivuvirtakasvatuksissa

Monet tätä opinnäytetyötä varten tutkitut sivuvirtakasvatukset ovat olleet pienimuotoisia, kokeellisia, laboratorioissa, esimerkiksi kasvatuskaapeissa tehtyjä kasvatuksia. Kasvatuksista kerätyistä tiedoista koottiin taulukko, joka on opinnäytetyön liitteenä 1.

Isomman mittakaavan kasvatuksista ei ollut mainintoja, mutta fotobioreaktorikasvatuksista löytyi kuitenkin kaksi esimerkkiä. *Spirulina* sp. mikrolevää oli kasvatettu fotobioreaktorissa tislaamon jätevedessä (Krishnamoorthy ym., 2019) sekä melassin tuotannosta saatavassa punajuurivinassissa oli kasvatettu *S. platensis* -levää putkimaisessa fotobioreaktorissa. (Coca ym., 2015)

Suurin osa mikrolevistä oli kasvatettu laimentamattomissa sivuvirroissa. Kuitenkin esimerkiksi sokeriruokovinassia, maissiviinaa sekä makeistehtaan jätevettä oli laimennettu erittäin paljon. Sokeriruokovinassin pitoisuus kasvatuksessa oli 2 %, maissiviinan pitoisuus 1 % ja makeistehtaan jätevesipitoisuus oli 8,50 %. (Rebeca Gonçalves ym., 2018; El-Kassas ym., 2015) Esimerkkejä pienemmistäkin laimennoksista löytyi, sillä tofuherajätevesi oli

laimennettu 60 % pitoisuuteen (Wang & Tian, 2018) ja erään elintarviketehtaan jätevesi 50 % pitoisuuteen (Mureed ym., 2018).

Kasvatuslämpötila vaihteli jonkin verran kasvatettavan mikrolevän mukaan. Osassa tutkituista sivuvirtakasvatuksista lämpötilaa ei ollut esitetty, mutta esimerkiksi *Spirulina* sp. -levällä kasvatuslämpötila oli 25–28 °C (Han & Zhou, 2021). *C. vulgaris* -levän kasvatuslämpötila vaihteli 27–32 °C välillä (Rebeca Gonçalves ym., 2018; Abreu ym., 2012, Choi, 2016). *C. pyrenoidosa* -levää oli kasvatettu 25°C lämpötilassa (Wang & Tian, 2018). Hieman alemmissa kasvatuslämpötiloissa viihtyivät *Selenastrum* sp. ja *E. gracilis*, joiden kasvatuslämpötilat vaihtelivat 20–25 °C välillä (Eskola, 2018; Tossavainen, 2018; Mercier, 2018).

Joidenkin tutkittujen kasvatusten alussa kasvatusalustana toimineen sivuvirran pH:ta oli säädetty. pH vaihteli 6–8 välillä, jota voidaan pitää melko neutraalina. Esimerkiksi *C. vulgaris* -levän kasvatuksessa juustoherasta, maissiviinasta sekä sokeriruokovinassista laimennettujen kasvatusalustojen pH oli säädetty pH-arvoon 6,8 (Rebeca Gonçalves ym., 2018). Suurimmassa osassa tutkittavista sivuvirtakasvatuksista pH:n säätöä ei ollut tehty tai mainittu.

Kasvatusajan kesto vaihteli 7–20 päivän välillä. Eniten käytetty kasvatusaika oli kuitenkin noin kaksi viikkoa. Lyhin, seitsemän päivän, kasvatusaika oli kokeessa, jossa määrittelemättömän elintarviketehtaan jätevedessä oli kasvatettu *Cladophora* sp. ja *Spyrogyra* sp. mikroleviä. (Mureed, ym., 2018) Pisin kasvatusaika (20 päivää) oli tutkimuksessa, jossa *Selenastrum* sp. ja *Euglena gracilis* mikroleviä kasvatettiin kalan kasvatusalaiden kiertovedessä (Tossavainen, 2018).

Valointensiteetti vaihteli jonkin verran eri tutkimusten välillä, samoin valosyklin vaihtelut. Valointensiteetin vaihteluväli oli 35-250µmol/ m<sup>2</sup> s. Valon kestossa oli kahta variaatiota. Toisessa valoa annettiin koko kasvatuksen ajan ja toisessa variaatiossa valoa annettiin 16 tunnin ajan ja pimeää 8 tuntia. (Choi, 2016; Eskola, 2018; Wang & Tian, 2018)

Käytännössä siis yhtä oikeaa, kaikille mikroleville sopivaa kasvatusmenetelmää ei ole olemassa. Jokaisella mikrolevällä on olemassa tietyt kasvuolosuhteet, joissa kyseinen

mikrolevä kasvaa parhaiten. Mikroleviä voisikin verrata ihmisiin, jotkut pitävät pimeästä ja viileästä, toiset taas valoisasta ja lämpimästä.

## 4 Mikrolevien rooli kestävässä kehityksessä

Mikrolevillä on tärkeä rooli kestävässä kehityksessä. Niiden avulla voidaan edistää ympäristön, taloudellisen ja sosiaalisen kestävyiden alueita. (Olab ym., 2022) Mikrolevät kykenevät fotosynteesiin, sekä muuntamaan hiilidioksidia hapeksi, sekä orgaaniseksi aineeksi. Tämä prosessi auttaa poistamaan ylimääräistä hiilidioksidia ilmakehästä, joka voi vähentää kasvihuonekaasuja ja hidastaa ilmastonmuutosta. Mikroleviä voidaan käyttää jätevesien käsittelyssä ja epäpuhtauksien poistamisessa ympäristöstä. Näin mikrolevät auttavat suojelemaan vesivaroja ja parantamaan vesiekosysteemien yleistä terveyttä. (Merlo ym., 2021; Olabi ym., 2022)

Fossiilisten polttoaineiden liiallisen kulutuksen ja maapallon öljy- ja maakaasuvarojen ehtymisen vuoksi, on mietittävä uusia, kestäviä vaihtoehtoja vanhojen tilalle. Mikrolevät ovat potentiaalinen raaka-aine tulevaisuuden viherpolttoaineille, esimerkiksi biodieselille, joka on energialähteenä uusiutuva, myrkytön, biohajoava sekä CO<sub>2</sub> neutraali. (Xin ym., 2011)

Taloudellisessa kestävydessä mikroleviä voidaan käyttää erilaisten tuotteiden valmistuksessa esimerkiksi biopolttoaineet, rehut ja lannoitteet. Tämä tuo uusia työmahdollisuuksia ja edistää näiden tuotteiden tuotannon ja jalostuksen taloudellista kehitystä. (Merlo ym., 2021; Olabi, ym., 2022)

Sosiaalisessa kestävydessä mikrolevien avulla voidaan käsitellä elintarviketurvallisuutta ja ravitsemukseen liittyviä kysymyksiä. Tietyt mikrolevälajit mahdollistavat ihmisille tai eläimille ravinnon lähdeitä niiden runsaan proteiinipitoisuuden ja muiden tärkeiden ravintoaineiden ansiosta. Mikrolevien sosiaalista kestävyttä lisää myös se, ettei niitä varten tarvitse kasvattaa ravintoa. Tällöin jää enemmän tilaa viljellä ihmisravinnoksi sopivaa viljaa. Mikroleviä voidaan myös käyttää kosmetiikan ja ravintolisien kaltaisten tuotteiden valmistukseen antamalla kuluttajille terveydellisiä hyötyjä. (Merlo ym., 2021; Olabi, ym., 2022)

## 5 Kasvatukseen valitut mikrolevät

Kasvatukseen valittiin mikrolevät Hämeen ammattikorkeakoulun mikrolevävaraston ja saatavuuden mukaan. Kasvatukseen valittiin näistä potentiaalisimmat ja kiinnostavimmat.

### 5.1 Mikrolevä *E. gracilis* valinta

*E. gracilis* valittiin kasvatukseen, sillä BioVeRa-hankkeen aikaisemman vaiheen tutkimuksessa oli todettu sen kasvavan hyvin kalaprosessivedessä (Kroon & Hessels, 2023). Sen käyttöä tulevaisuuden vihreän polttoaineen raaka-aineena on pohdittu. Tulevaisuudessa *E. gracilis* -levää voitaisiin hyödyntää myös ihmiselle tärkeiden omega-3-rasvahappojen saannissa. *E. gracilis* – levän kasvatusliuoksena käytettiin EG-liuosta.

### 5.2 Mikrolevä *S.obliquus* valinta

*S.obliquus* valittiin tutkimukseen ilman minkäänlaisia ennako-oletuksia, sillä aikaisemmissa sivuvirtakasvatuksissa ei ollut yhtään mainintaa sen käytöstä. Sitä on tutkittu melko vähän, mutta yleisesti sitä kuitenkin pidetään lupaavana raaka-aineena biodieselin tuotannossa. (Wang ym., 2015) Myös se, että *S.obliquus* sisältää paljon proteiinia (53 % kuivapainosta) ja sopii siksi ihmisravinnoksi, innosti kokeilemaan *S.obliquus* -levän kasvatusta kalaprosessivedessä. (Soccol ym., 2013, s. 409-410) Mikrolevän kasvatusliuoksena käytettiin BBM-liuosta.

### 5.3 Mikrolevä *S. maxima* valinta

*S. maxima* -levän kasvatuksessa huomioitiin BioVeRa-hankkeen aikaisemman vaiheen projekti sekä tutkimus *S. maxima* -levän kasvatuksesta soijatuotannon sivuvirrassa (Han & Zhou, 2021). BioVeRa-hankkeen aikaisemmassa tutkimuksessa *S. maxima* -levää kasvatettiin vastaavassa kalaprosessivedessä samanlaisissa olosuhteissa, kuin tässä kasvatuksessa. Tuon tutkimuksen aikana mikrolevä ei lähtenyt kasvuun, vaan viimeisenä kasvatuspäivänä kasvatuspullojen sisältö oli muuttunut ruskeaksi. (Kroon & Hessels, 2023) Han & Zhou olivat tutkimuksessaan säätäneet sivuvirran pH:ta, jonka seurauksena levän kasvu oli parantunut merkittävästi. He tekivät tutkimuksessaan huomion, että *S. maxima* -levän kasvulle

optimaalisin pH arvo oli 8. (Han & Zhou, 2021) Edellisten tutkimusten innoittamana, kalaprosessiveden pH nostettiin 1M NaOH:n avulla arvoon 8.

Kiinnostusta *S. maxima* -levän kasvattamiseen lisäsi myös sen loistavat ravintoarvot sekä ajatus sen hyödyntämisestä arvojakeena elintarviketeollisuudessa myöhemmin. Tämän levän kasvatusliuoksena käytettiin Sp. medium liuosta.

#### **5.4 Mikrolevä *Selenastrum* sp. valinta**

*Selenastrum* sp. valittiin mukaan kasvatukseen, sillä sen kasvatusta oli kokeiltu kahdessa aiemmassa tutkimuksessa kalan kiertovesikasvatusaltaiden vesissä (Eskola, 2018; Tossavainen, 2018). Vaikka tämän kasvatuksen kalaprosessivedellä sekä kalankasvatusaltaan vedellä on paljon eroavaisuuksia, ajateltiin sitä silti kokeilla. *Selenastrum* sp. valikoitui kokeisiin myös siksi, että sitä pidetään potentiaalisena raaka-aineena biodieselille. (Chakravarty & Mallick, 2019) Kasvatusliuoksena *Selenastrum* sp.-kannan kasvatuksissa käytettiin COMBO medium -liuosta.

## 6 Työn menetelmät

Työ toteutettiin Hämeenlinnan ammattikorkeankoulun laboratorio olosuhteissa tammi-maaliskuun aikana. Työ aloitettiin puhdistamalla saatu kalaprosessivesi kasvatusalustaksi mikroleville. Tästä vedestä määritettiin ravintoaineet eri puhdistusvaiheiden aikana, jolloin voidaan verrata mitä ravinteita katoaa mistäkin puhdistusvaiheesta.

Mikroleväympit kasvatettiin olosuhdekaapissa ennen varsinaista kasvatuksen toteutumista kalaprosessiveteen. Mikrolevät viljeltiin viiteen erilaiseen kalaprosessivesipitoisuuksiin.

Kasvatus kesti kuusi päivää ja jokaisena päivänä otettiin näytettä talteen kuiva-ainemäärittystä varten.

### 6.1 Kalaprosessiveden käsittely

Työn kalaprosessivesi saatiin Riihimäellä toimivalta Rasmixilta. Rasmix puristaa kalan käsittelyjätteistä kalaöljyä, jonka sivutuotteena syntyy kalaprosessivettä.

Rasmixin kalaprosessivettä säilytettiin kylmässä, jonka seurauksena vesi jähmettyi hyytelömäiseksi. Prosessiveden käsittelyn aluksi hyytelömäinen kalaprosessivesi lämmitettiin haaleassa vesihauteessa, jonka seurauksena se saatiin takaisin nestemäiseen olomuotoon. Kun kalaprosessivesi oli nestemäistä, prosessivettä kaadettiin sentrifugipulloihin noin pullon puoliväliin saakka. Tämän jälkeen pullot punnittiin. Pullot asetettiin sentrifugiin (ThermoScientific, Sorvall Lynx 4000, Saksa) niin, että saman painoiset pullot ovat sentrifugin vastakkaisilla puolilla. Sentrifugia pyöritettiin 10 minuutin ajan 12 000 kierrosta minuutissa.

Sentrifugauksen jälkeen kalaprosessivesi suodatettiin kahteen kertaan. Ensin kalaprosessivedelle suoritettiin esisuodatus suppilon ja kahvinsuodatuspaperin avulla. Kun esisuodatus oli tehty, suodatettiin prosessivesi uudelleen imupumpun (Vacumbrand, Diaphragm vacuum pump, Saksa) avulla. Imupumppu käynnistettiin, jonka jälkeen esisuodatettu prosessivesi kaadettiin varovasti büchner-suppilon, johon oli laitettu suodatinpaperi. Prosessiveden annettiin suodattua hitaasti büchner-pulloon. Suodatettu prosessivesi siirrettiin säilöpulloihin, jonka jälkeen prosessivesi autoklaavattiin nestesterilointiohjelmalla 121 °C ja 21 minuuttia (sterilointi aika).

Työn aikana punnittiin kolmen eri sentrifugipullon painot, jotta saatiin selville kalaprosessiveden saanto ja paljonko sedimenttiä erottuu pullon pohjalle sentrifugauksen aikana. Tulokset merkittiin taulukkoon 2.

Taulukko 2. Kalaprosessiveden saanto ja sedimentin määrä.

Nesteen todellinen paino (g)	Sedimentin määrä (g)	Sedimentin m-%
217,5	11,5	5,0
219,2	12,8	5,5
233,1	13,9	5,6

## 6.2 Kalaprosessiveden ravintoainemääritykset

Kalaprosessiveden eri käsittelyvaiheista säästettiin näytteitä, jotta niistä saatiin määritettyä erilaisia ravintoaineita, ja kuinka eri käsittelyt vaikuttavat ravintoaineiden pitoisuuksiin.

Eilaisia kalaprosessivesinäytteitä oli neljä, jotka nimettiin seuraavasti: raaka 1, raaka + esisuodatus 2, raaka + esisuodatus + imusuodatus 3 ja raaka + esisuodatus + imusuodatus + autoklaavi 4.

### 6.2.1 Kokonaisfosforin, liukoisen fosforin sekä fosfaatin määrittäminen

Kokonaisfosforin, liukoisen fosforin sekä fosfaatin määrittämistä varten näytteistä tehtiin 1:1000 laimennokset. Näistä laimennoksista suodatettiin osa liukoisen fosforin määrittämistä varten Acrodisc 32 mm Syringe Filter with 0.8–0.2 µm Supor membrane-ruiskusuodattimilla. Kokonaisfosfori sekä liukoinen fosfori määritettiin suodatusta lukuun ottamatta täysin samalla tekniikalla.

Työ aloitettiin merkitsemällä Hach-putket. Korkeista irrotettiin suojafolio. Putkiin pipetoitiin 2 ml näytettä, jonka jälkeen korkit kiinnitettiin putkiin ylösalaisin. Tämä siksi, että korkin ”yläpäässä” oli reagenssijauhe. Putkia sekoitettiin, kunnes korkissa ollut reagenssi oli sulanut kokonaan näytteeseen. Putkia lämmitettiin 15 minuutin ajan 200 °C lämpöuunissa (Hach

Lange GmbH, LT 200, Saksa) jonka jälkeen niiden annettiin jäähtyä huoneenlämpöön. Putkia sekoitettiin ja niihin lisättiin 0,2 ml reagenssi B:tä. Lisäyksen jälkeen korkit vaihdettiin C-korkkeihin ja putkia sekoitettiin pyöryttämällä niitä muutamia kertoja ja ne jätettiin seisomaan 10 minuutin ajaksi. Tämän jälkeen putkia käännettiin muutamia kertoja ja niiden pinta pyyhittiin linssipaperilla. Putket analysoitiin yksi kerrallaan spektrofotometrillä (Hach Lange, DR 3900, Saksa) joka tunnisti automaattisesti luettavan näytteen tyyppin putkissa olevan viivakoodin mukaan.

Fosfaatin määrittäminen suoritettiin niin sanotulla lyhyellä menetelmällä, jossa näyte suodatettiin ensin Acrodisc 32 mm Syringe Filter with 0.8–0.2 µm Supor membrane ruiskusuodattimilla. Tämän jälkeen Hach-putkiin pipetoitiin 2 ml suodatettua näytettä sekä 0,2 ml reagenssi B:tä. Putkiin vaihdettiin C-korkit ja putkia sekoitettiin, kunnes korkissa ollut reagenssi oli sulanut näytteeseen. Putkien annettiin seisoa 10 minuutin ajan, jonka jälkeen niitä käännettiin muutamia kertoja. Tämän jälkeen putket pyyhittiin linssipaperilla ja putket analysoitiin yksi kerrallaan spektrofotometrillä. Kokonaisfosforin, liukoisen fosforin ja fosfaatin tulokset kerrottiin laimennoskertoimella 1000.

### **6.2.2 pH:n määrittäminen**

Näytteiden pH määritettiin elektronisen pH-mittarin (VWR, pH 1100L, Saksa) avulla. Ennen käyttöä pH-mittari kalibroitiin kolmella puskuriliuoksilla, joiden pH-arvot olivat 4, 7 ja 10. Tämän jälkeen mittari oli valmis käytettäväksi. Mittarin elektrodi asetettiin näytteeseen ja annettiin olla, kunnes pH-mittarin näytön lukema lakkasi liikkumasta.

### **6.2.3 COD:n määrittäminen**

Chemical Oxygen Demand (jatkossa COD) eli kemiallinen hapen kulutus määritettiin liukoisena-, sekä kokonais- COD:na. COD:n määrittämistä varten näytteet laimennettiin suhteessa 1:100. Liukoista COD määrittämistä varten näyte suodatettiin Acrodisc 32 mm Syringe Filter with 0.8–0.2 µm Supor membrane ruiskusuodattimilla.

Määrittäminen aloitettiin sekoittamalla nimettyjä Hach-putkia, kunnes korkeissa ollut reagenssi oli sulanut kokonaan. Putkiin pipetoitiin 2 ml näytettä, jonka jälkeen putkia sekoitettiin jälleen.

Putkia lämmitettiin kahden tunnin ajan 148 °C lämpöuunissa (Hach Lange GmbH, LT 200, Saksa) jonka jälkeen putket ravistettiin kunnolla. Tämän jälkeen putkien annettiin jäähtyä 18–20 °C. Putket pyyhittiin linssipaperilla ja analysoitiin spektrofotometrillä (Hach Lange, DR 3900, Saksa), joka tunnistaa näytetyypin automaattisesti Hach-putkissa olevan viivakoodin avulla.

COD:n määrittämisen oikeellisuuden todentamista varten valmistettiin standardinäyte, jossa Hach putkeen pipetoitiin varsinaisen näytteen sijasta Wastewater Influent Inorganics Quality Control Standard -liuosta. Standardinäytteen pitäisi antaa tulokseksi n. 500 mg/l. COD:n laskennallinen määrä saatiin kertomalla spektrofotometriltä saadut tulokset laimennoskertoimella 100.

#### **6.2.4 Ammoniumtyypen ja kokonaistypen määrittäminen**

Ammoniumtyypen määrittäminen aloitettiin valmistelemalla Kjelttech 8400 laitteeseen (Foss, Kjelttech 8400, Kiina) sopivat näyteputket. Jokaisesta näytteestä tehtiin kolme rinnakkaisnäytettä, jonka mukaan putket nimettiin. Jokaiseen näyteputkeen pipetoitiin 1 ml näytettä, jonka jälkeen näyte punnittiin ja paino otettiin ylös. Näyteputkiin lisättiin RO-vettä 50 ml. Samalla valmistettiin standardinäyte pipetoimalla putkeen valmista standardiliuosta 5 ml ja lisäämällä tämän jälkeen standardinäytteeseen 50 ml RO-vettä. Standardiliuoksena käytettiin ammoniumsulfaattia, jonka pitoisuus oli 2,0 mg/l. Näytteiden ja standardin lisäksi valmistettiin kaksi blankoputkea, joihin mitattiin 50 ml RO-vettä.

Ennen analysoinnin aloittamista tarkastettiin, että kaikkia laitteen tarvitsemia reagensseja oli tarpeeksi. Tämän jälkeen laitteella ajettiin pesuohjelma kaksi kertaa läpi. Pesuohjelman jälkeen laitteesta valittiin analyysiohjelma ja analyysikohteeksi blankoputket. Molemmat analyysiohjelma ajettiin molemmille blankoputkille. Tämän jälkeen analyysikohteeksi valittiin standardi, ja standardiputki analysoitiin.

Varsinaisten näytteiden analysointia varten analyysiohjelmasta valittiin NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ohjelma. Näyteputki asetettiin koneeseen varovasti ja näytteen paino syötettiin ohjelmaan. Tämän jälkeen analyysiohjelma laitettiin päälle ja ohjelman mentyä läpi, laite antoi suoran tuloksen.

Kun kaikki näyteputket oli analysoitu, koneelle suoritettiin, vastaavasti kuin alussa, pesuohjelma kaksi kertaa. Kjeltech 8400 -koneen tulosten avulla laskettiin ammonium typen pitoisuus laskukaavan 1 avulla.

(1)

$$\text{Ammoniumtypen pitoisuus} = \frac{\text{tulos} * 2}{\text{standardi}}$$

Kokonaistypen määrittäminen aloitettiin valmistelemalla polttolaitteisto sekä numeroimalla kjeltec-putket. Putkiin lisättiin noin puolikas ruokalusikallinen kiehumakiviä. Tämän jälkeen putkiin punnittiin näytettä noin 0,5 g. Putkeen lisättiin deionisoitua vettä niin, että lopputilavuudeksi saatiin noin 50 ml. Samalla valmisteltiin standardinäyte sekä kaksinollanäytettä. Standardinäytteeseen mitattiin 50 ml glysiinin käyttöliuosta ja nollanäytteisiin mitattiin 50 ml deionisoitua vettä. Glysiinin käyttöliuoksen pitoisuus oli 2,51 mg/l.

Kun näytteet oli valmisteltu, jokaiseen putkeen lisättiin laminaarikaapissa yksi kjeldahl-katalyyttitabletti pinseteillä sekä annosteltiin 8 ml 98 % rikkihappoa. Tämän jälkeen putket nostettiin polttolaitteeseen ja niiden sijainnit kirjattiin ylös. Kaasunpoistokansi nostettiin putkien päälle ja skrubberin letku kiinnitettiin kaasunpoistolaitteeseen. Tämän jälkeen skrubberi valmisteltiin käyttöä varten ja märkäpoltto käynnistettiin. Märkäpoltto suoritettiin 370 °C 1,5 tunnin ajan. Polttoajan päätyttyä laitteisto jäähdytettiin alle 190 asteiseksi.

Näytteiden tislausta varten ne viilennettiin huoneenlämpöiseksi. Tislaus ja titraus suoritettiin Kjeltec 8400-laitteella (Foss, Kjeltech 8400, Kiina). Laitteelle suoritettiin kaksi kertaa pesuohjelma, jonka jälkeen valittiin analyysiohjelmaksi N-tot. Tämän jälkeen analysoitiin kaksi nollanäytettä, joiden jälkeen oli standardinäytteen vuoro. Näiden jälkeen analysoitiin varsinaiset näytteet. Analyysiohjelman syötettiin ennen analysoitavaa näytettä näytteen paino, jonka jälkeen laite analysoi näytteen. Kun kaikki näytteet oli analysoitu, suoritettiin laitteelle vielä kaksi pesuohjelmaa, kuten analyysien aluksikin. Mukailen (Hämeen Ammattikorkeakoulu, 2023) Todellinen typpipitoisuus laskettiin analysointituloksista alla olevalla kaavalla 2.

(2)

$$\text{Typpipitoisuus} = \frac{\text{laitteen antama tulos}}{\text{näytemäärä}} \times \frac{\text{Standardiliuoksen laskennallinen typpipitoisuus}}{\text{Standardinäytteen tulos}}$$

### 6.3 Mikrolevän kasvatus + näytteenotto

Ennen kasvatuksia tarvittavia mikroleväymppejä kasvatettiin olosuhdekaapissa 25 asteen lämpötilassa 12:12 -tunnin valo-pimeäsyklissä. Valon intensiteettinä käytettiin 50  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ .

Kasvatukset toteutettiin kasvatussuunnitelman mukaisesti, joka on nähtävillä taulukossa Taulukko 3. Kasvatussuunnitelma. Jokaiseen kasvatukseen varauduttiin sterilioimalla autoklaavissa (MLS-3751L, Panasonic, Japani ja alankomaa) RO-vettä, mittalaseja, sekä vanulla peitetyt, näytteenottoputkilla varustetut Erlenmeyerit.

Varsinaiset kasvatukset aloitettiin varmistamalla laminaarikaapin puhtaus. Mikrolevät viljeltiin erilaisiin kalaprosessivesipitoisuuksiin kasvatussuunnitelman mukaan. Viljelyt aloitettiin jokaisen kasvatuksen kohdalla näytteestä, johon tuli pelkkä kasvatusliuos ja mikrolevä. Erlenmeyereihin mitattiin kasvatusliuosta 180 ml ja mikroleväymppeä 20 ml. Tämän jälkeen viljelyitä jatkettiin korkeimman kalaprosessivesipitoisuuden omaavasta viljelmästä alhaisinta pitoisuutta kohti. Kalaveden sekä RO-veden määrät mitattiin kasvatussuunnitelman mukaan eri näytteisiin niin, että jokaisessa mikroleväviljelmässä oli yhteensä 200 ml kalavettä, RO-vettä sekä mikroleväymppeä. Poikkeuksena olivat jokaiseen kasvatukseen tehdyt kontrollinäytteet. Kontrollinäytteitä tehtiin kaksi rinnakkaista ja ne sisälsivät pelkkää kalaprosessivettä 180 ml. Kontrollinäytteistä seurattiin, kasvaako pelkässä kalaprosessivedessä sinne kuulumatonta kasvustoa.

Viljelyn jälkeen jokaisesta leväviljelmästä otettiin näytteet kuiva-ainemäärityksiä varten näytteenottosuunnitelman mukainen määrä (30 ml). Näytteenottosuunnitelma näkyvillä taulukossa Taulukko 4. Näytteenottosuunnitelma. Tämän jälkeen leväviljelmät vietiin olosuhdekaappiin (Aralab, Fitoclima 600 Plhv, Portugali). Kaapin lämpötila oli jokaisen kasvatuksen ajan +25 °C. Valo- pimeäsykli kasvatuksissa oli 12 h/ 12 h. Valon intensiteetiksi







oli asetettu 150 µmol. Olosuhdekaapissa viljelmät asetettiin satunnaisessa järjestyksessä ravistelijaan (B.Braun Biotech International, Certomat R, Saksa) Ravistelijan tarkoituksena oli estää levän laskeutuminen pohjaan sekä edistää kaasujen vaihtoa kasvatuksen aikana.

Ravistelija pyöri koko kasvatuksen ajan 125 kierrosta minuutissa.

Näytteitä kuiva-ainemääriä varten otettiin näytteenottosuunnitelman mukaan, joka on näkyvillä taulukossa Taulukko 4. Näytteenottosuunnitelma. Kasvatuspäivinä 0, 3–6 kaikkien näytteen ottojen yhteydessä mikroleväviljelmien paikat vaihdettiin uuteen satunnaiseen järjestykseen, jotta valon määrä jakautuu mahdollisimman tasaisesti viljelmien kesken.

Näytteiden ottojen yhteydessä kaikki rinnakkaisnäytteet kuvattiin.

Taulukko 3. Kasvatussuunnitelma

							Näytteistä kolme rinnakkaista, poikkeuksena kontrollit, joita vain kaksi.
	100 %	75 %	50 %	25 %	0 %	Kontrollit 100 %	
Kasvatusliuoksen määrä (ml)	0	0	0	0	180	0	
Kalaveden määrä (ml)	180	135	90	45	0	180	
RO-veden määrä (ml)	0	45	90	135	0	0	
Levän määrä (ml)	20	20	20	20	20	0	

Taulukko 4. Näytteenottosuunnitelma

Näytteenottosuunnitelma	
Päivä	Näytteen määrä
0.päivä	30 ml
3.päivä	20 ml
4.päivä	20 ml
5.päivä	20 ml
6.päivä	10 ml

## 6.4 Kuiva-ainemääriykset

Kuiva-ainemääriyksessä taarattiin upokkaat, joihin oli laitettu suodatinpaperi. Taarauksessa kuunnettiin lämpökaappi (Thermocenter, Salvislab, Sveitsi) 105-asteiseksi ja laitettiin upokkaat lämpökaappiin vähintään 20 tunnin ajaksi. Taarauksen jälkeen upokkaat

jäähdytettiin eksikaattorissa, jonka jälkeen ne punnittiin vaa'alla. Punnituksen jälkeen nestemäinen näyte suodatettiin taaratun suodatinpaperin läpi imupumpun avulla. Jokaisen näytesuodatuksen alussa suodatinpaperi kasteltiin Ro-vedellä ja tämän jälkeen käynnistettiin imupumppu ja pipetoitiin 5–25 ml näytettä suodattimeen. Pipetoitavan näytteen määrä vaihteli kasvatus päivän mukaan. Näytteiden määrät merkitty taulukkoon Taulukko 5. Kuiva-ainemäärityksen pipetoitavan näytteen määrä.. Ennen näytteen suodattamista näyte sekoitettiin huolellisesti. Suodatuksen jälkeen käytetty suodatuspaperi laitettiin takaisin upokkaaseen. Tämän jälkeen upokkaat vietiin lämpökaappiin 95 asteeseen vähintään 20 tunniksi. Lopuksi kuivuneet upokkaat jäähdytettiin eksikaattorissa ja punnittiin uudelleen mikrolevien kuivapainon laskua varten. Lasku suoritettiin kaavalla 3.

(3)

$$\text{Kuivapaino } \left(\frac{g}{l}\right) = \left(\frac{\text{paino 2 (g)} - \text{paino 1 (g)}}{\text{tilavuus (ml)}} * 1000\right)$$

paino 2 = Upokas + suodatuspaperi + näytteen painot

paino 1 = Upokas + suodatuspaperi painot

tilavuus = Näytteen pipetoitu määrä

Taulukko 5. Kuiva-ainemäärityksen pipetoitavan näytteen määrä.

Kasvatus päivä	Pipetoitava määrä (ml)
0 PÄIVÄ	20–25
3 PÄIVÄ	10
4 PÄIVÄ	10
5 PÄIVÄ	10
6 PÄIVÄ	5

## 7 Tulokset ja tulosten tarkastelu

Tulosten arvioinnissa suoritettiin kalaprosessiveden ravintoainepitoisuuden analysointi, mukaan lukien kokonaisfosforin, liukoisen fosforin, fosfaatin, pH:n, COD:n, kokonaistypen ja ammoniumtypen määritykset. Kalaprosessiveden ravintoainemääritysten jälkeen suoritettiin neljän eri mikrolevälajin kasvatuksen tulosten arviointi kuiva-ainemäärityksellä.

### 7.1 Kalaprosessiveden ravintoainemääritykset

Jotta mikrolevät voivat kasvaa kalaprosessivedessä, on sen oltava ravintorikasta. Tällöin se voi toimia mikrolevälle oivallisena kasvupohjana. Mikrolevät tarvitsevat kasvaakseen esimerkiksi fosforia (P), fosfaattia ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) ja typpeä (N). Eri mikrolevälajit vaativat kasvaakseen eri määrän ravinteita tai erilaiset kasvatusolosuhteet. Esimerkiksi *S. maxima* vaatii kasvaakseen korkeamman pH arvon kuin muut tässä opinnäytetyössä tutkitut mikrolevät. COD eli kemiallinen hapen kulutus kertoo veden orgaanisen aineen määrästä. Korkea COD-tulos voi olla haitallinen mikrolevän kasvulle. Kalaprosessiveden ravintoainemäärityksessä tutkittiin miten jatkokäsittelyt vaikuttavat fosforin, fosfaatin, pH:n, COD:n, ammonium- ja kokonaistypen määrään.

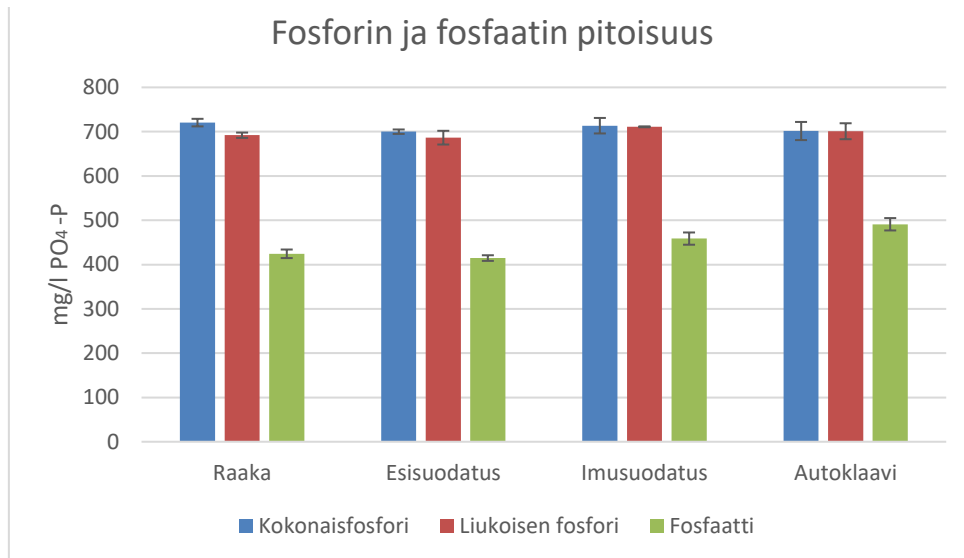
#### 7.1.1 Kokonaisfosforin, liukoisen fosforin sekä fosfaatin määrittäminen

Kokonais- ja liukoisen fosforin määrä vaikuttaa pysyvän melko samana jatkokäsittelystä huolimatta. Raakaan kalaprosessiveteen verrattuna autoklaavatun näytteen kokonaisfosforipitoisuus laski. Roopnarain & ym. tutkimuksessa mikrolevien täydellinen fosforin määrä kasvatuksessa olisi 0,001–0,179 g/l välillä. Opinnäytetyön mikrolevien kasvatukseen käytetty kalaprosessiveden kokonaisfosforin määrä oli 701,5 mg/l eli 0,7015 g/l. Kalaprosessiveden fosforin ihanteellinen määrä siis ylittyy. Mikrolevät tarvitsevat fosforia kasvaakseen ja lisääntyäkseen. Liiallinen fosforin määrä voi häiritä mikrolevän kasvua ja yleistä terveyttä. (Roopnarain ym., 2013)

Mikrolevät tarvitsevat myös fosfaattia kasvaakseen ja lisääntyäkseen (Yaakob ym., 2021). Kalaprosessiveden ravintoainemäärityksessä huomattiin, että fosfaatin määrä on suhteellisesti noussut jatkokäsittelyn yhteydessä. Fosfaatin nousu voi johtua

biomolekyyleistä. Monissa biologisissa aineissa on fosfaattiryhmiä osana rakennetta esimerkiksi nukleiinihappoissa. Kalaprosessiveden sisältämä nukleiinihappo voivat hajotessaan vapauttaa fosfaattia jatkokäsittelyn yhteydessä, jolloin fosfaattia vapautuu kalaprosessiveteen. Kuva 6 yhdistettiin kalaprosessiveden kokonais- ja liukoisen fosforin sekä fosfaatin tulokset näytteittäin, jotta niiden eroja voidaan verrata.

Kuva 6. Kokonaisfosforin, liukoisen fosforin ja fosfaatin pitoisuus kalaprosessivedessä.



### 7.1.2 pH:n määrittäminen

Kalaprosessiveden pH:n määrittäminen tuloksista voidaan huomata, etteivät erilaiset käsittelyt vaikuttaneet tuloksiin, sillä pH pysyi melko samana jokaisen näytteen kohdalla. Tällöin voidaan todeta, ettei korkea fosforipitoisuus vaikuttanut kalaprosessiveden pH-lukemiin. Kaikki kalaprosessiveden pH:n määrittäminen tulokset näkyvät taulukossa 6.

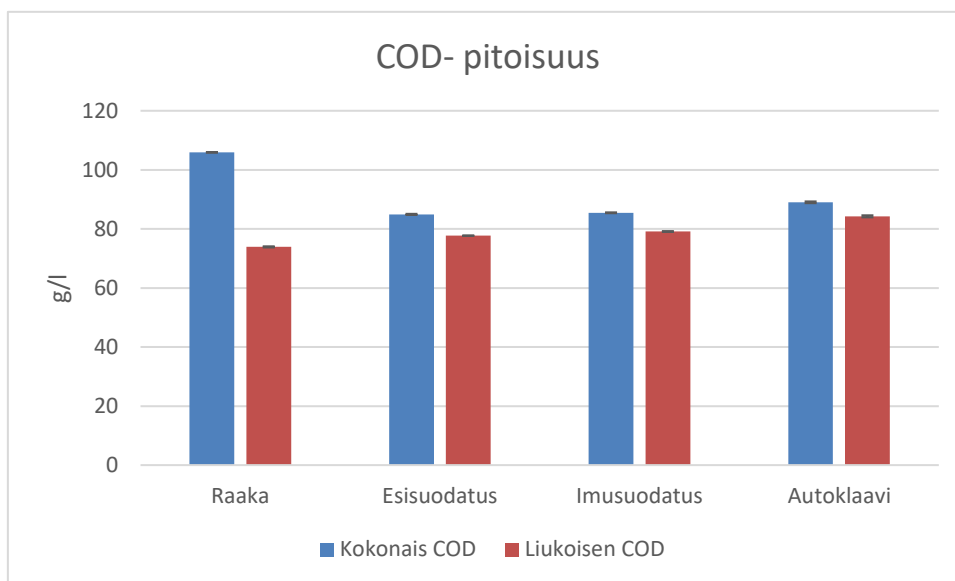
Taulukko 6. pH:n määrittäminen tulokset.

Näytteet	pH
Raaka	6,309
Esisuodatettu	6,299
Esisuodatettu +imusuodatettu	6,307
Esisuodatettu +imusuodatettu ja autoklavoitu	6,317

### 7.1.3 COD:n määrittäminen

COD-määrittämisessä huomataan, että kokonais- COD-pitoisuus laskee esisuodatuksen ja imusuodatuksen aikana. Autoklaavauksen jälkeen COD-pitoisuus taas nousee hiukan. Liukoisen COD:n pitoisuus puolestaan nousi jokaisen jatkokäsittelyn yhteydessä. Kokonais- COD:n lasku esi- ja imusuodatuksen jälkeen voi johtua siitä että, sentrifugauksen, esisuodatuksen ja imusuodatuksen aikana kiintoainetta poistui, jolloin COD-pitoisuus laskee. Korkea COD-pitoisuus voi johtaa muiden bakteereiden kasvuun, jolloin mikrolevät joutuvat kilpailemaan vapaana olevasta ravinnosta. Kalaprosessiveden kokonais- ja liukoisen COD:n määrien eroavaisuudet on esitetty kuvassa 7.

Kuva 7. Kalaprosessiveden kokonais- ja liukoisen COD:n pitoisuudet.



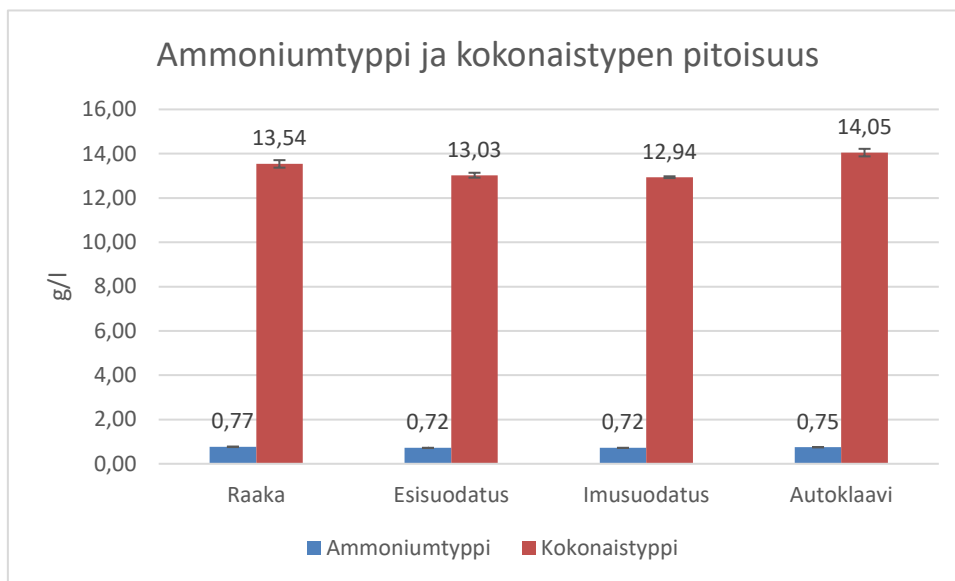
### 7.1.4 Kokonaistypen ja ammoniumtypen määrittäminen

Mikrolevä tarvitsee typpiä kasvaakseen ja säätääkseen niiden aineenvaihduntaa. Kalaprosessiveden ravintoaineen määrittämisessä ammonium- ja kokonaistyyppi oli pysynyt hyvin samana, jolloin jatkokäsittely ei paljonkaan vaikuttanut tyyppien määrään. Kuitenkin kokonaistyyppi oli noussut, raakanäytteessä typpiä oli 13,54 mgN/g ja autoklaavatussa 14,05

mgN/g. Tämä nousu on voinut johtua rasvan ja proteiinin hajoamisesta tai autoklaavauksen korkeasta lämpötilasta.

Ammoniumtyypen sekä kokonaistypen pitoisuudet kalaprosessivedessä asetettiin kuvaan 8, jotta niiden eroavaisuuksia voidaan verrata. Ammoniumtyypen määrä laskettiin Kjelttech 8400 -koneen tulosten avulla laskettiin ammonium tyyppien pitoisuus laskukaavan 1 avulla. avulla

Kuva 8. Kalaprosessiveden ammoniumtyypen ja kokonaistypen pitoisuudet.



## 7.2 Kasvatus 1, *E. gracilis*

Ensimmäisen kasvatuksen suurimmat massasaannot kuivapainojen perusteella saatiin kaikista näytteistä kuudentena kasvatuspäivänä. Näytteen, jonka kalaprosessivesipitoisuus oli 100 %, tulokseksi saatiin 9,44 g/l ja 75 % näytteen tulos oli 4,6 g/l. 50 % näytteen tulokseksi saatiin 2,94 g/l, 25 % näytteen tulos oli 1,78 g/l ja 0 %-pitoisuuden näytteen tulokseksi saatiin 0,847 g/l. Kuivapaino laskettiin laskukaavan (3) mukaan.

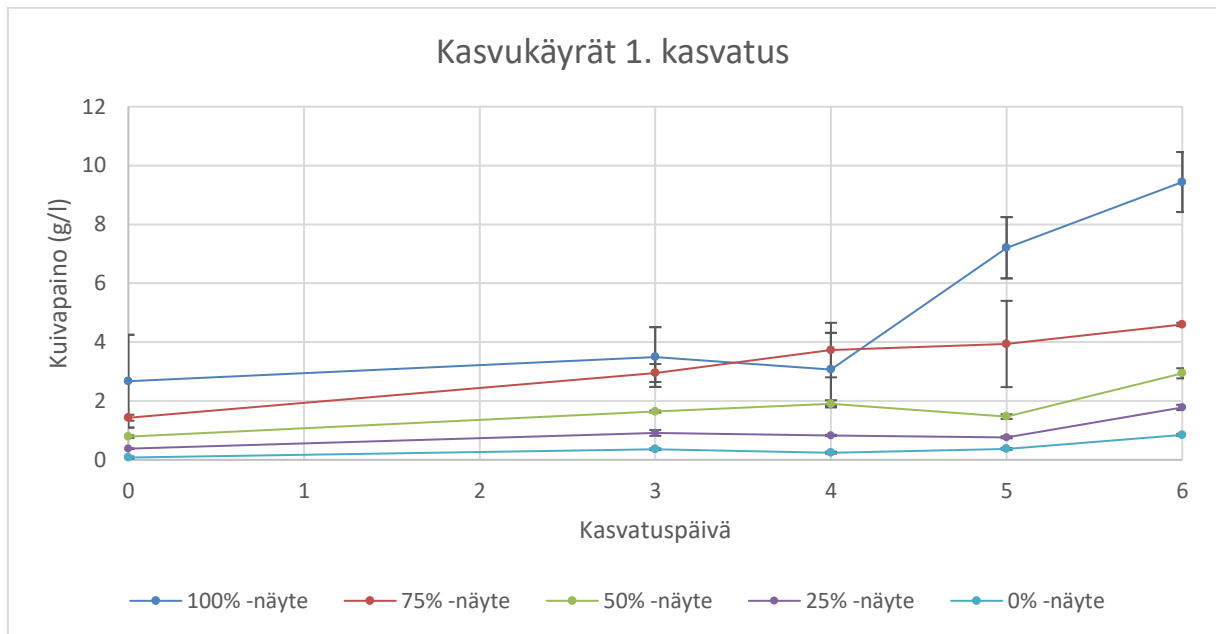
Kuvassa 9 on ensimmäisen kasvatuksen kaikki kasvatuskäyrät kerättynä yhteen.

Kasvatuskäyrät muodostettiin jokaisen näytteen eri kasvatuspäivien kuivapainojen mukaan.

Kuvaajassa on myös näytteiden keskihajonnat merkittynä, jotka kertovat, kuinka kaukana

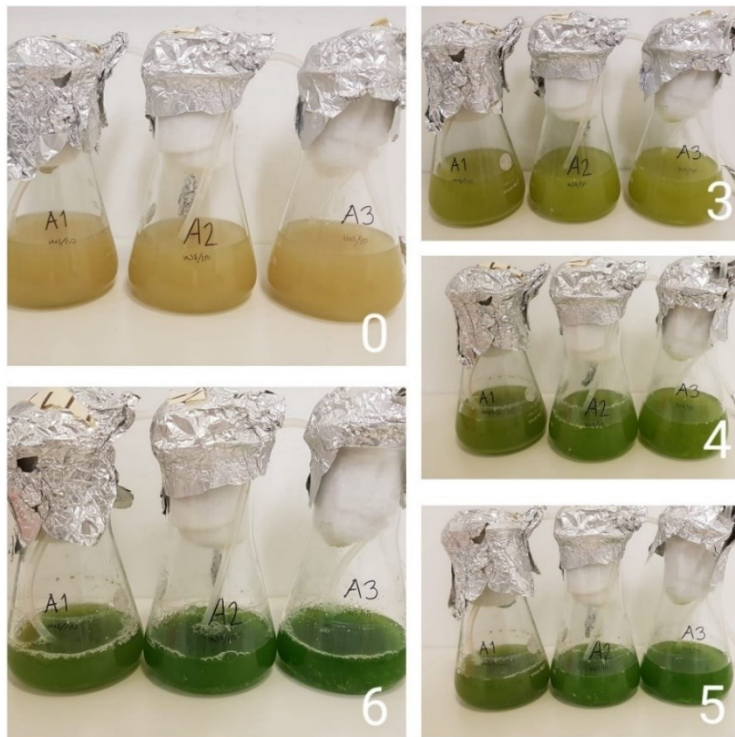
havainnot ovat keskiarvosta. Pienemmän prosessivesipitoisuuden näytteillä keskihajonta oli pieni, jonka vuoksi sitä on vaikea huomata kuvaajasta.

Kuva 9. Kasvatus 1. kasvukäyrät perustuen *E. gracilis* -levän kuivapainoon (g/l). Näytteiden pitoisuus kertoo, kuinka paljon kalaprosessivettä oli näytteissä.

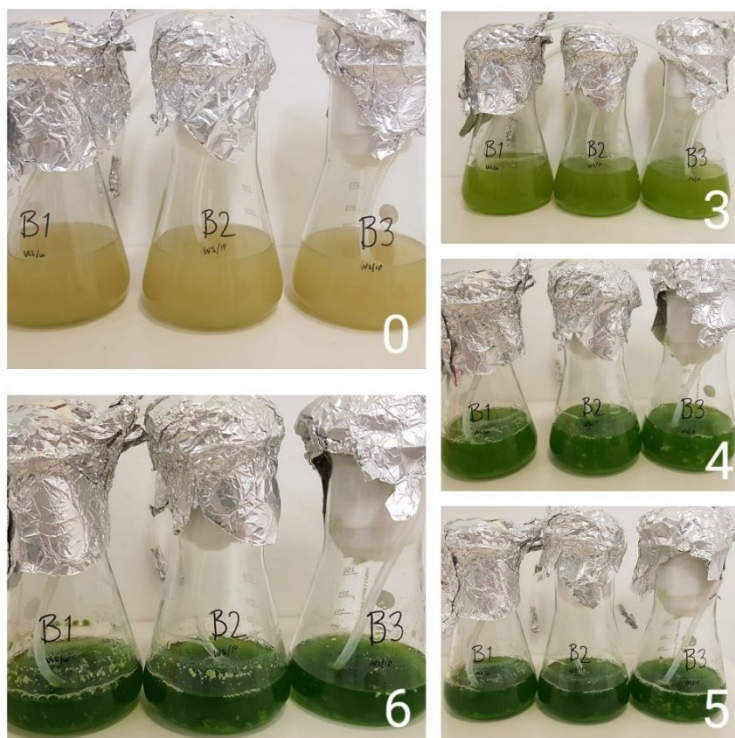


Kuvissa 10-14 nähdään, että kasvatuksen aikana eri näytesarjojen värit ovat muuttuneet todella vihreiksi. Värit ovat muuttuneet selkeästi 0. ja 3. kasvatuspäivän välisenä aikana kaikissa näytteissä. Kuvassa Kuva 15. 1.kasvatus, kontrollinäytteet, päivät 0, 3–6. on nähtävillä ensimmäisen kasvatuksen kontrollinäytteiden muutokset, joita ei kasvatuksen edetessä tapahtunut lainkaan. Muutamia näytteitä myös mikroskoipoitiin, jotta nähtiin millaiselta *E. gracilis* näyttää kasvatuksissa. Näytteet olivat olleet pakkasessa, joten elävistä mikrolevistä ei saatu kuvia. Kuvassa Kuva 16. *E. gracilis* mikroskooppikuva, kasvatuspäivä 5, näytteen prosessivesipitoisuus 50 %. näkyvillä *E. gracilis* -levää 50 % näytteessä viidentenä kasvatuspäivänä. Kuvassa Kuva 17. *E. gracilis* mikroskooppikuva, päivä 6, näytteen prosessivesipitoisuus 100 %. nähdään 100 %-näytteen sisältöä kuudentena kasvatuspäivänä. Kuvassa Kuva 18. *E. gracilis* -levän kasvatuksessa muodostunutta ei toivottua kasvustoa 100 % kalavettä sisältäneessä näytteessä kuudentena kasvatuspäivänä. voidaan nähdä 100 % kalaprosessivettä sisältäneen näytteen kasvustoa, jota näytteessä ei pitäisi olla.

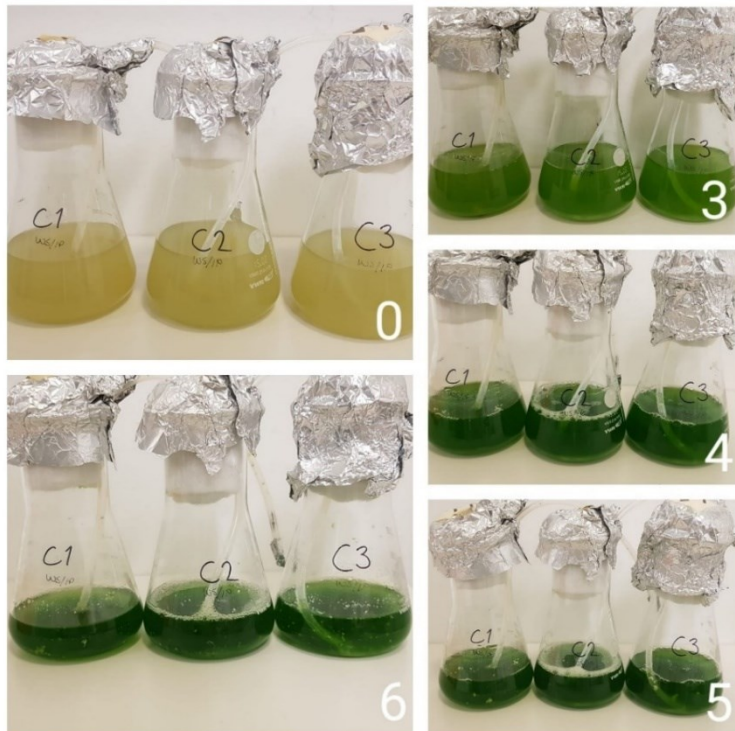
Kuva 10. 1.kasvatus, *E. gracilis*, näytteiden prosessivesipitoisuus 100 %, päivät 0, 3–6.



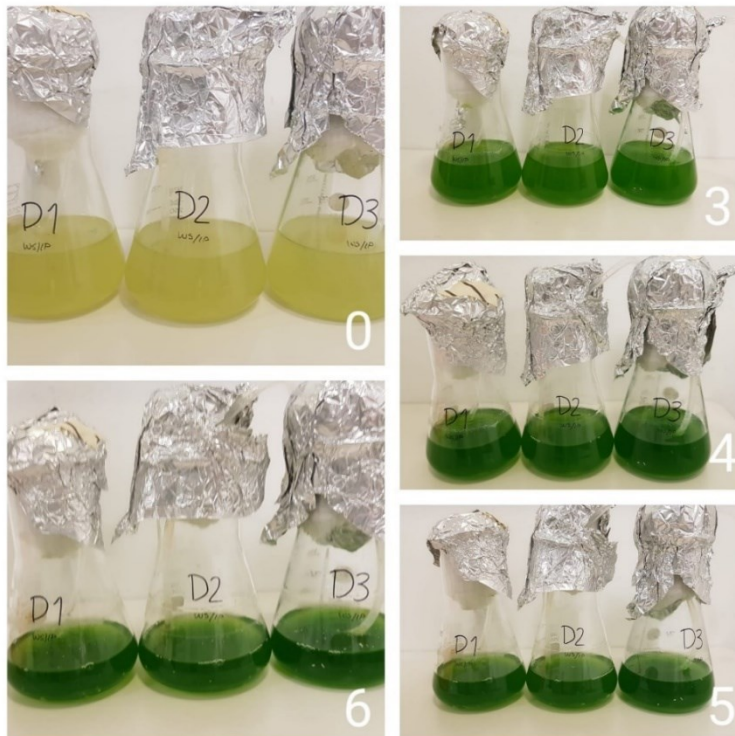
Kuva 11. 1.kasvatus, *E. gracilis*, näytteiden prosessivesipitoisuus 75 %, päivät 0, 3–6.



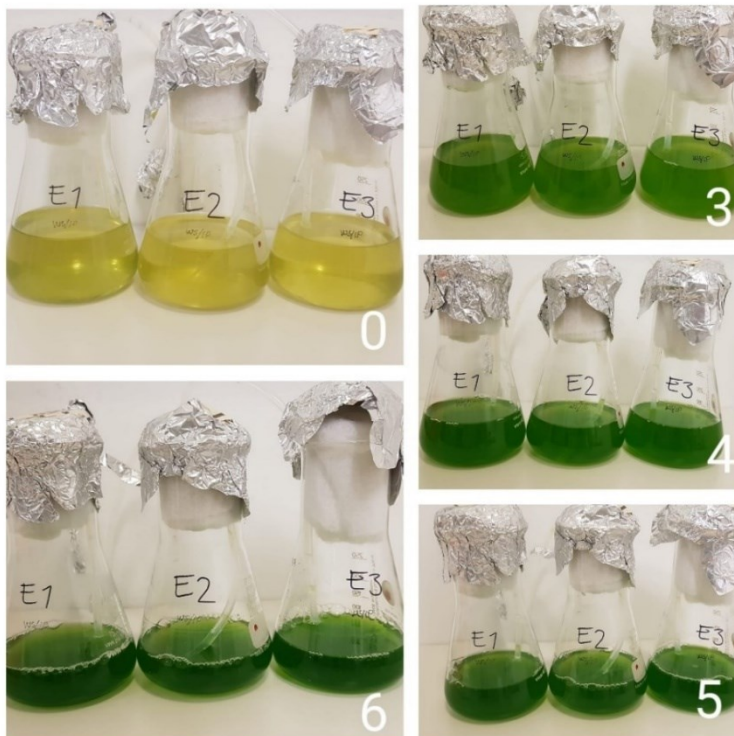
Kuva 12. 1.kasvatus, *E. gracilis*, näytteiden prosessivesipitoisuus 50 %, päivät 0, 3–6.



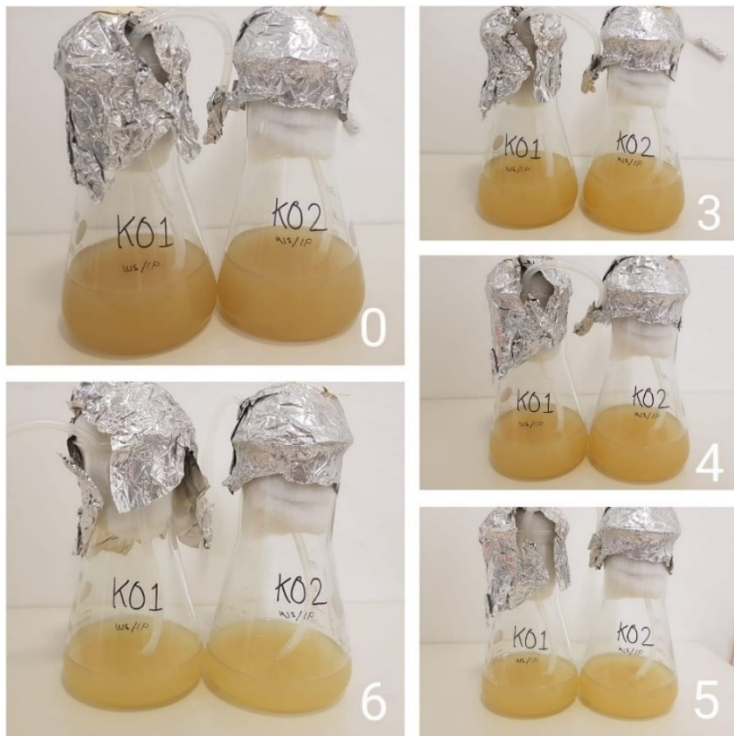
Kuva 13. 1.kasvatus, *E. gracilis*, Näytteiden prosessivesipitoisuus 25 %, päivät 0, 3–6.



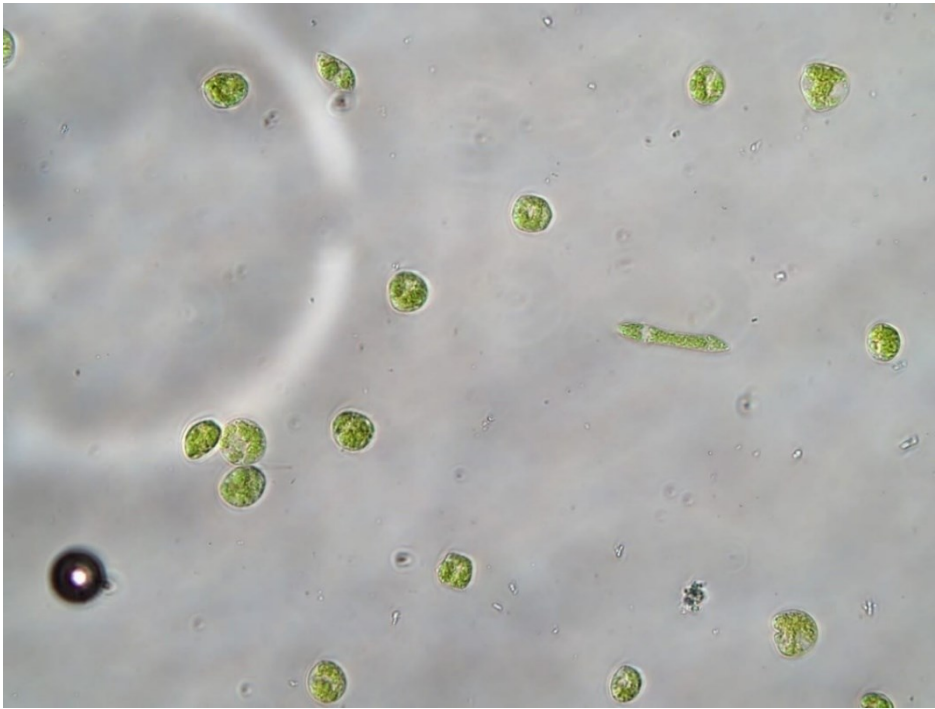
Kuva 14. 1.kasvatus, *E. gracilis*, näytteiden prosessivesipitoisuus 0 %, päivät 0, 3–6.



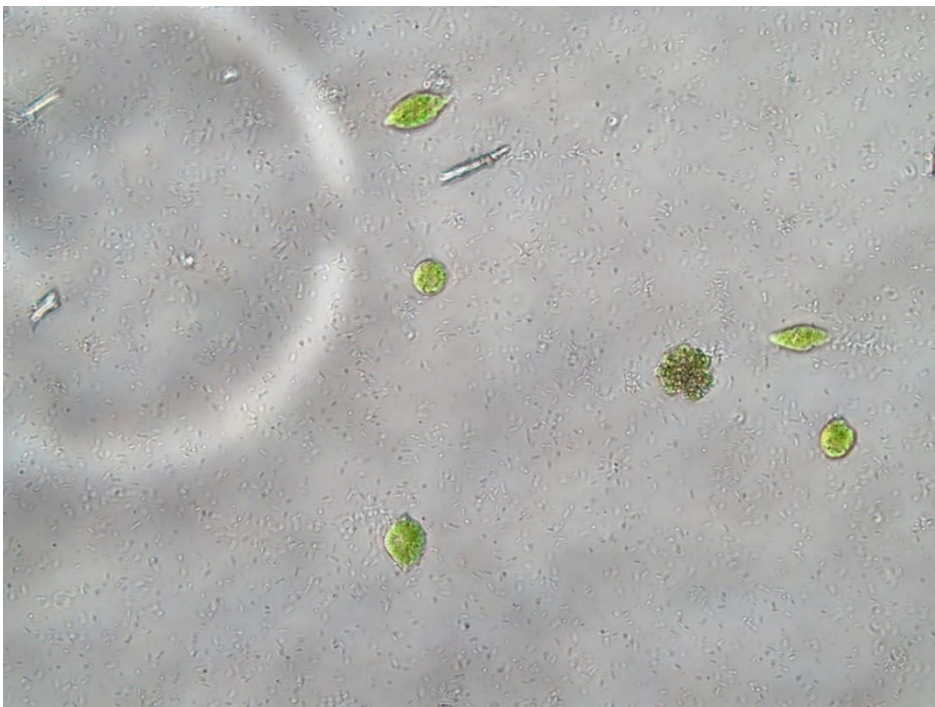
Kuva 15. 1.kasvatus, kontrollinäytteet, päivät 0, 3–6.



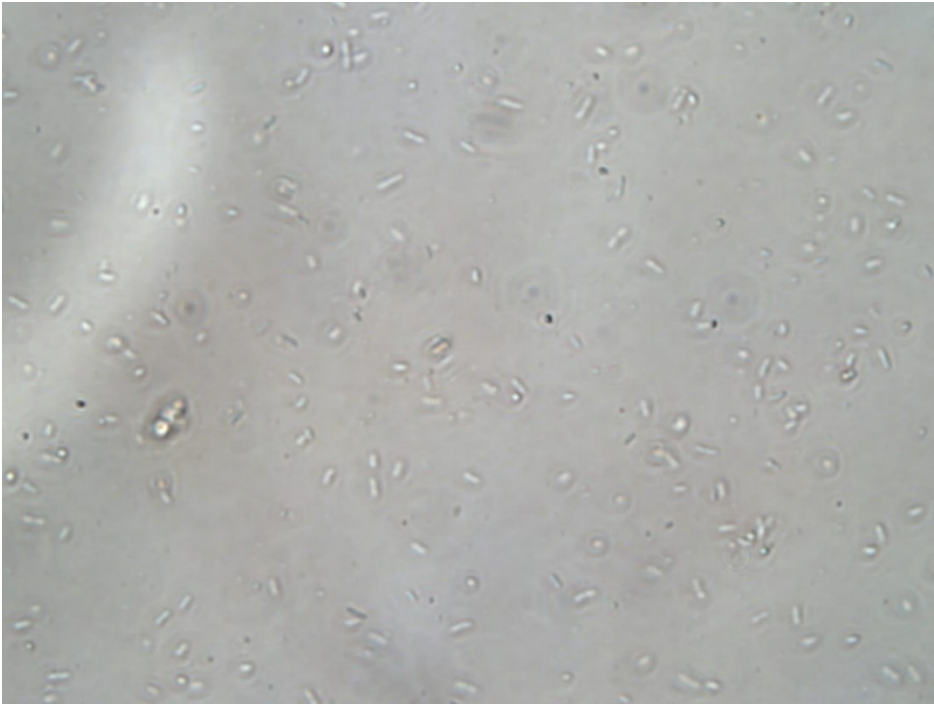
Kuva 16. *E. gracilis* mikroskooppikuva, kasvatuspäivä 5, näytteen prosessivesipitoisuus 50 %.



Kuva 17. *E. gracilis* mikroskooppikuva, päivä 6, näytteen prosessivesipitoisuus 100 %.



Kuva 18. *E. gracilis* -levän kasvatuksessa muodostunutta ei-toivottua kasvustoa 100 % kalavettä sisältäneessä näytteessä kuudentena kasvatuspäivänä.

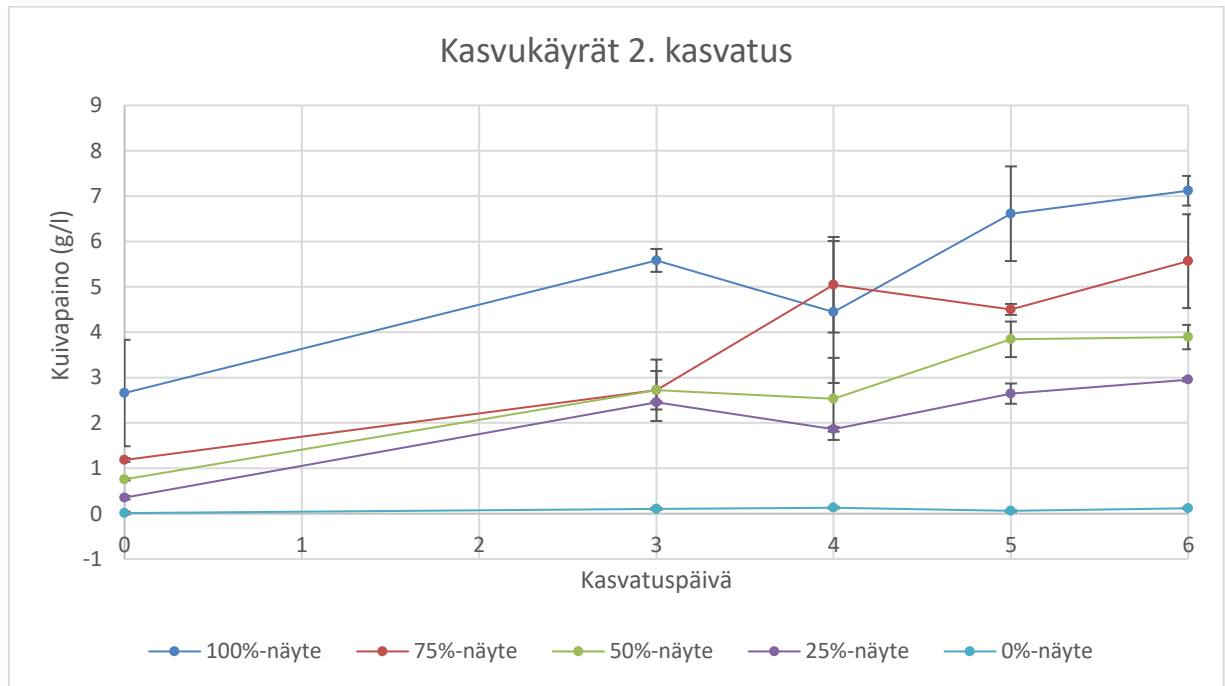


### 7.3 Kasvatus 2, *S. Obliquus*

Toisen kasvatuksen suurimmat massasaannot kuivapainoon perustuen saatiin kuudentena kasvatuspäivänä 0 % kalaprosessivettä sisältänyttä näytettä lukuun ottamatta. 100 % kalaprosessivettä sisältäneen näytteen kuivapaino 7,12 g/l oli tämän kasvatuksen korkein. 75 % näytteen kuivapainoksi saatiin 5,567 g/l, 50 % näytteen kuivapainoksi saatiin 3,893 g/l ja 25 % näytteen kuivapaino oli 2,953 g/l. 0 % kalaprosessivettä sisältäneen näytteen korkein kuivapaino 0,13 g/l saavutettiin neljäntenä kasvatuspäivänä. Kuivapainojen laskussa käytettiin laskukaavaa (3).

Kuvaan 19 kerättiin kaikki toisen kasvatuksen kasvatuskäyrät yhteen. Jokaisen näytteen eri kasvatuspäivistä muodostettiin kasvukäyrä kuivapainojen mukaan. Jokaisesta näytteistä laskettiin keskihajonta, joka löytyy alla olevasta kuvaajasta. 0 % kalaprosessivettä sisältäneen näytteen keskihajonta on hyvin pieni, jonka takia se voi olla vaikea huomata kuvaajasta.

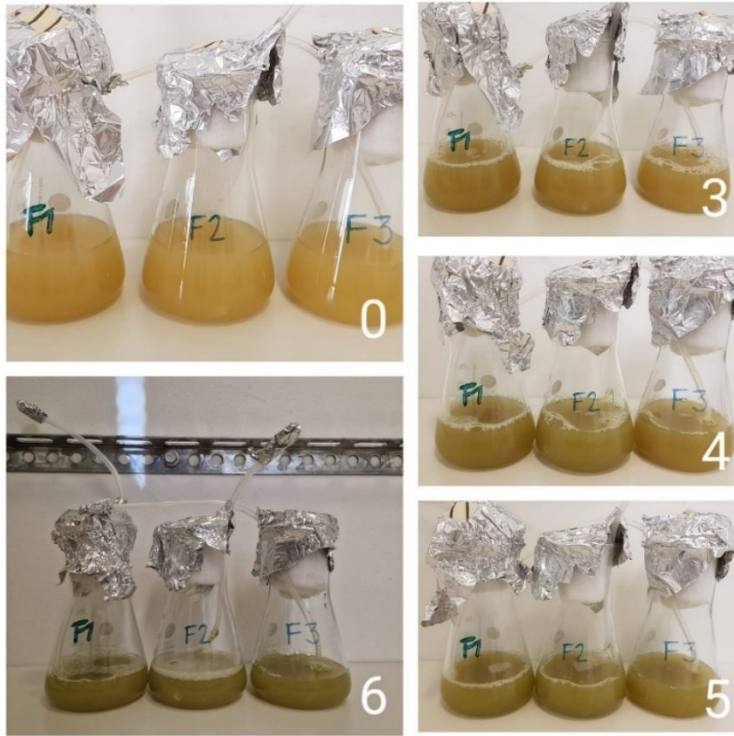
Kuva 19. Kasvatuksen 2. kasvukäyrät perustuen *S.obliquus* kuivapainoon (g/l). Näytteiden pitoisuus kertoo, kuinka paljon kalaprosessivettä oli näytteissä.



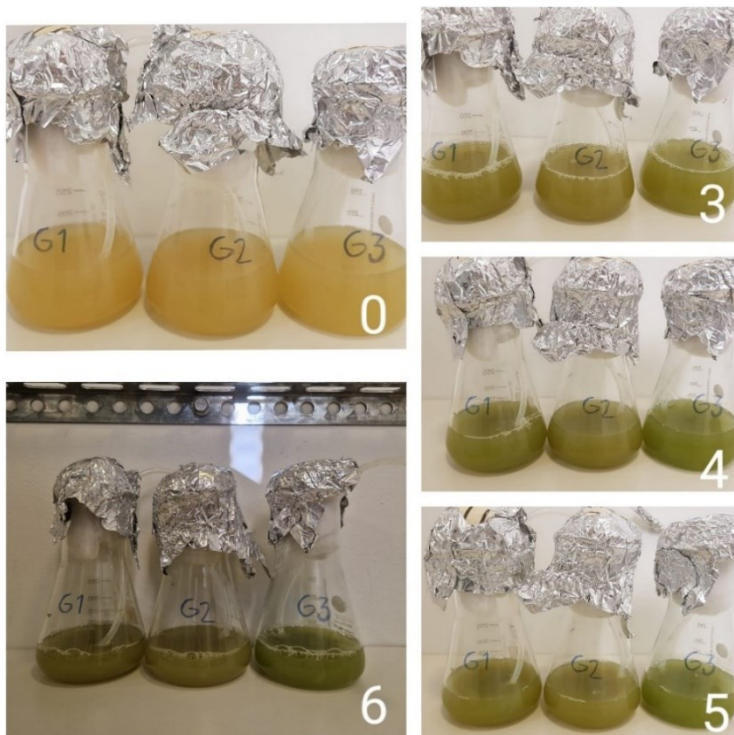
Kuvissa 20-24 on näkyvillä toisen kasvatuksen aikaiset eri näytesarjojen värien muutokset. Jokainen näyte vihertyi huomattavasti kasvatuksen aikana. Kuvista voidaan huomata, että kuudentena kasvatuspäivänä näytesarjat olivat jo tumman vihreitä, kuten oli toivottukin. Kuvassa Kuva 25. 2.kasvatus, kontrollinäytteet, päivät 0, 3–6. näkyy kontrollinäytteiden muutokset kasvatuksen aikana. Kontrollinäytteissä ei tapahtunut kasvatuksen aikana muutosta. Kasvatuksen lopuksi mikroskoipoitiin muutamia näytteitä, jotta nähtiin millaiselta *S.obliquus* näyttää kasvatuksien eri vaiheissa. Näytteet olivat olleet pakkasessa, joten elävistä mikrolevistä ei saatu kuvia. Kuvassa Kuva 26. *S.obliquus* mikroskooppikuvassa, näytteen prosessivesipitoisuus 0 %, päivä 4. *S.obliquus* 0 % -näytteessä neljäntenä kasvatuspäivänä. Kuvassa Kuva 27. *S.obliquus* kuvattuna mikroskoopilla, näytteen

prosessivesipitoisuus 100 %, päivä 6. nähdään 100 % näytteen sisältöä kuudentena kasvatuspäivänä.

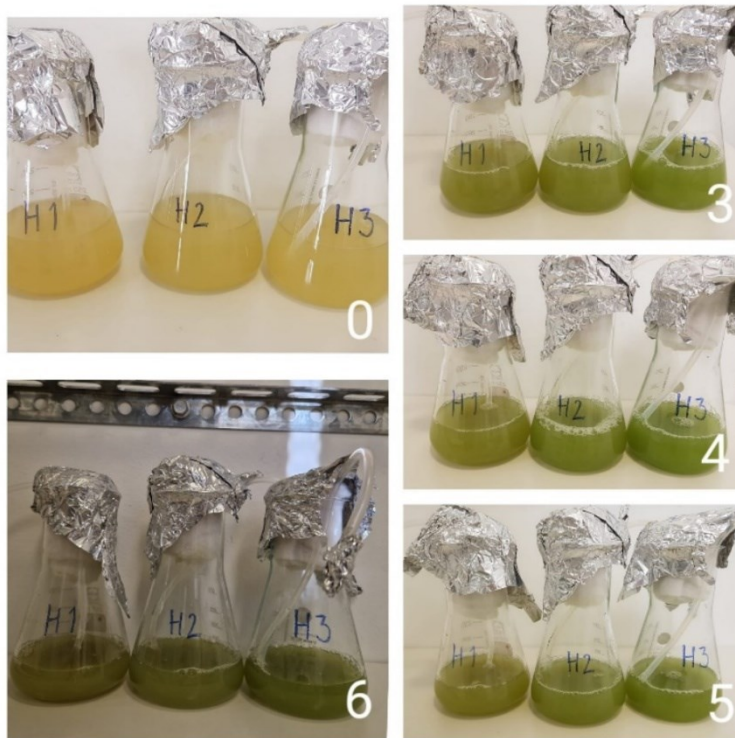
Kuva 20. 2.kasvatus, *S.obliquus*, päivät 0, 3–6. Näytteen prosessivesipitoisuus 100 %.



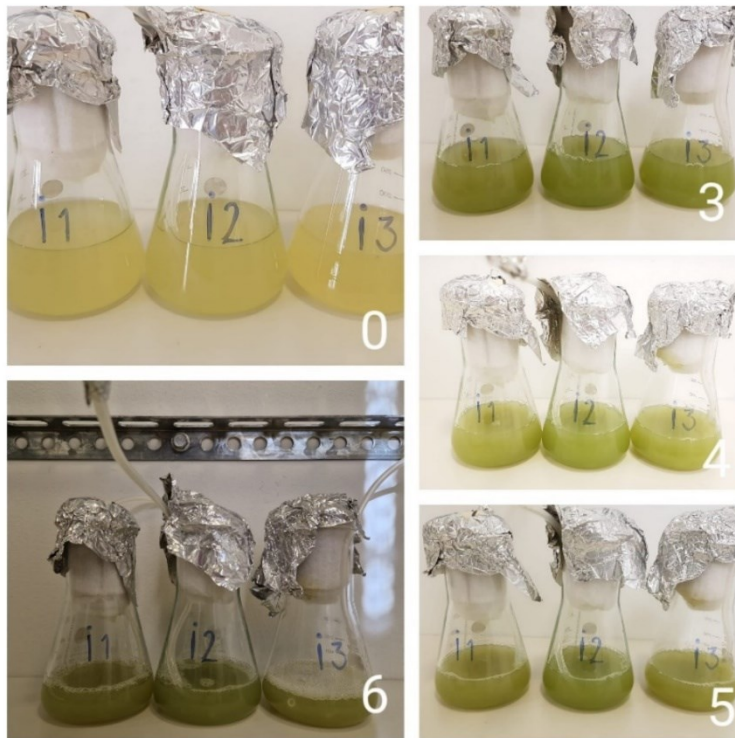
Kuva 21. 2.kasvatus, *S.obliquus*, päivät 0, 3–6. Näytteen prosessivesipitoisuus 75 %.



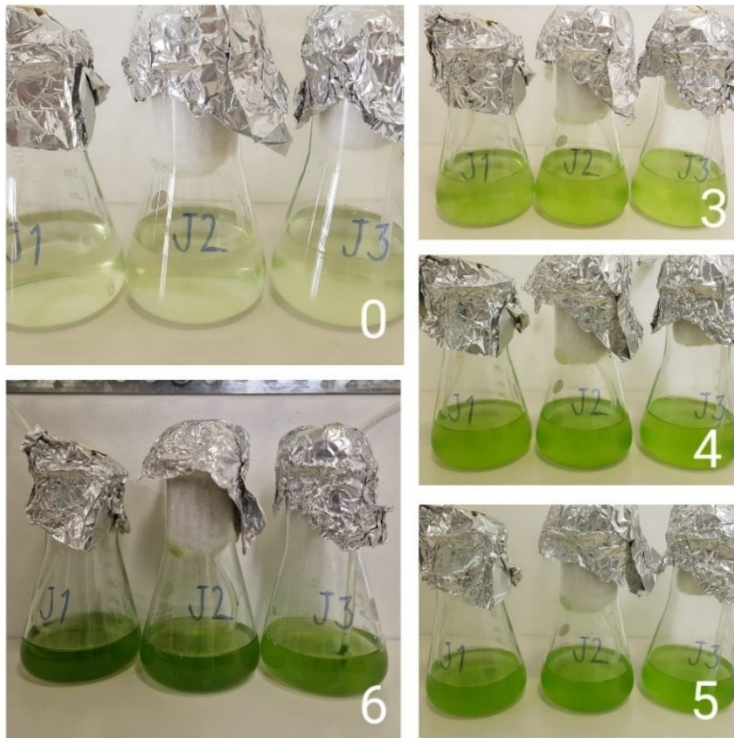
Kuva 22. 2.kasvatus, *S.obliquus*, päivät 0, 3–6. Näytteen prosessivesipitoisuus 50 %.



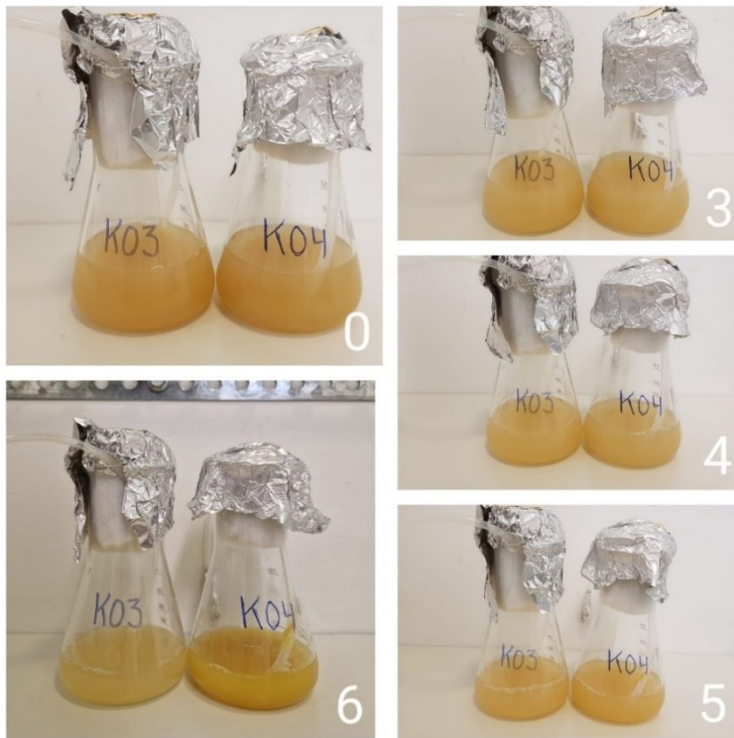
Kuva 23. 2.kasvatus, *S.obliquus*, päivät 0, 3–6. Näytteen prosessivesipitoisuus 25 %.



Kuva 24. 2.kasvatus, *S.obliquus*, päivät 0, 3–6. Näytteen prosessivesipitoisuus 0 %.



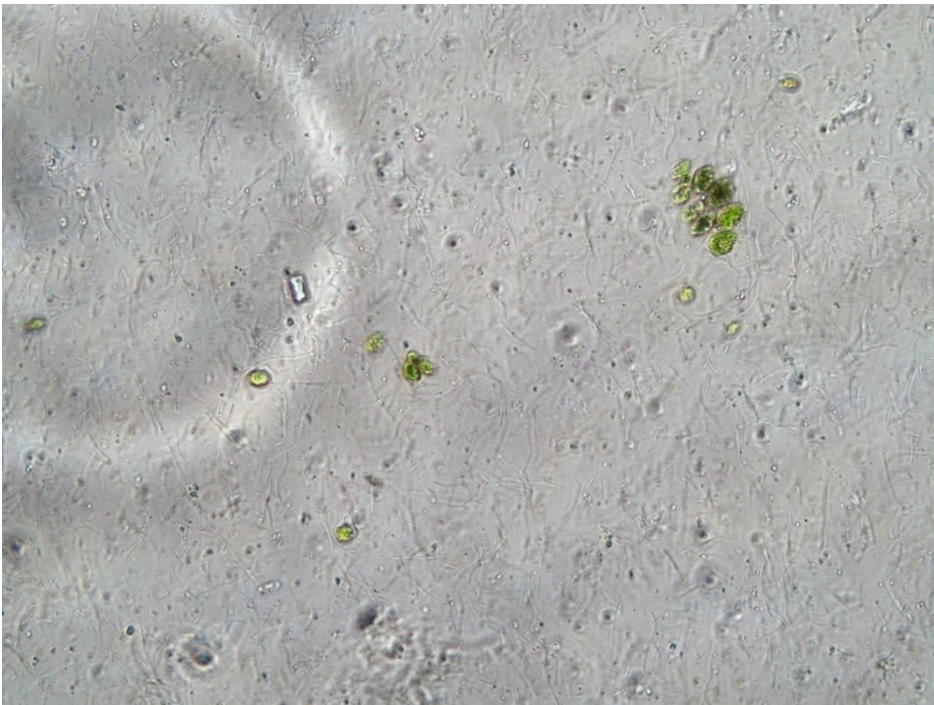
Kuva 25. 2.kasvatus, kontrollinäytteet, päivät 0, 3–6.



Kuva 26. *S.obliquus* mikroskooppikuvassa, näytteen prosessivesipitoisuus 0 %, päivä 4.



Kuva 27. *S.obliquus* kuvattuna mikroskoopilla, näytteen prosessivesipitoisuus 100 %, päivä 6.

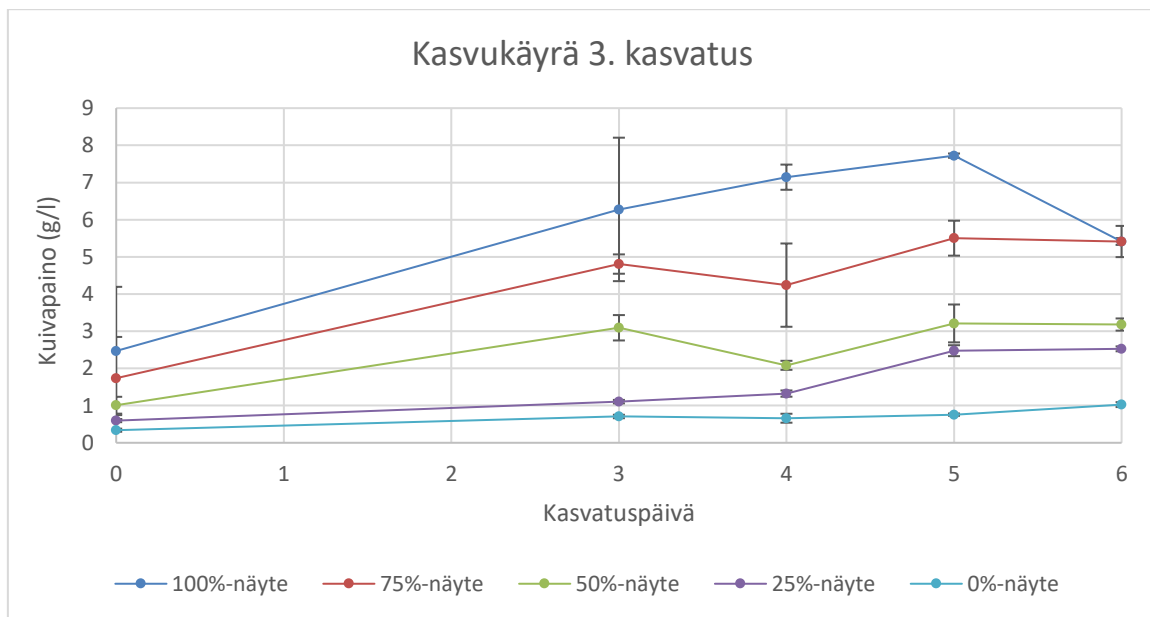


#### 7.4 Kasvatus 3, *S. Maxima*

Kolmannessa kasvatuksessa korkeimmat massasaannot kuivapainoon perustuen saatiin 100 %, 75 % ja 50 % kalaprosessivettä sisältäneillä näytteillä viidentenä kasvatuspäivänä.

Tuloksiksi saatiin 100 % näytteestä 7,723 g/l, 75 % näytteestä 5,503 g/l ja 50 % näytteestä 3,21 g/l. Muista poiketen 25 % ja 0 % näytteiden korkeimmat kuivapainot saavutettiin kuudentena kasvatuspäivänä. 25 % näytteen kuivapaino oli tuolloin 2,527 g/l ja 0 % näytteen kuivapaino oli 1,027 g/l. Näytteiden kuivapainot laskettiin (3) avulla. Kuvaan 28 lisättiin jokaisen kolmannen kasvatuksen näytteiden kasvukäyrät, jotka perustuvat kunkin kasvatuspäivän kuivapainoon.

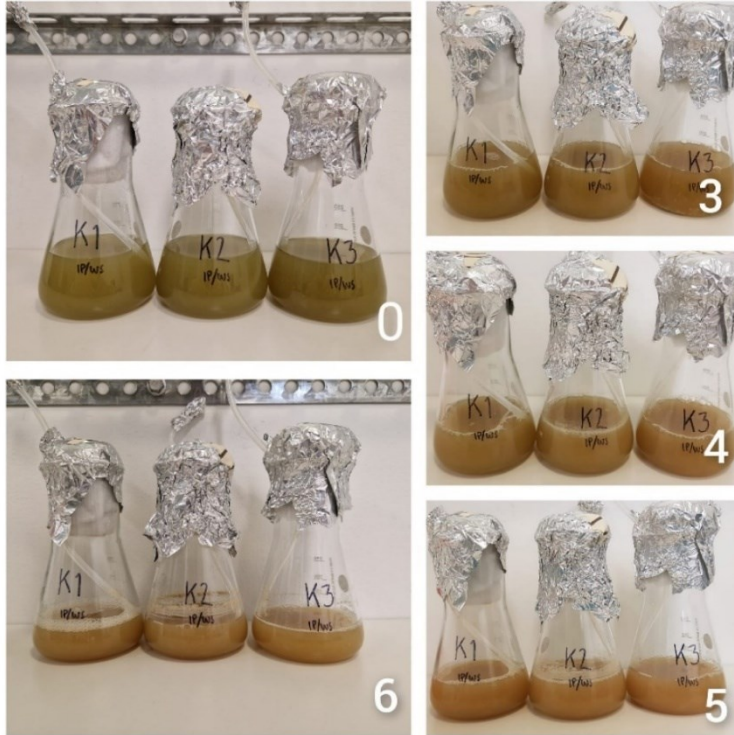
Kuva 28. Kasvatuksen 3. kasvukäyrät perustuen *S. maxima* -levän kuivapainoon (g/l). Näytteet nimetty kalaprosessivesipitoisuuksien mukaan.



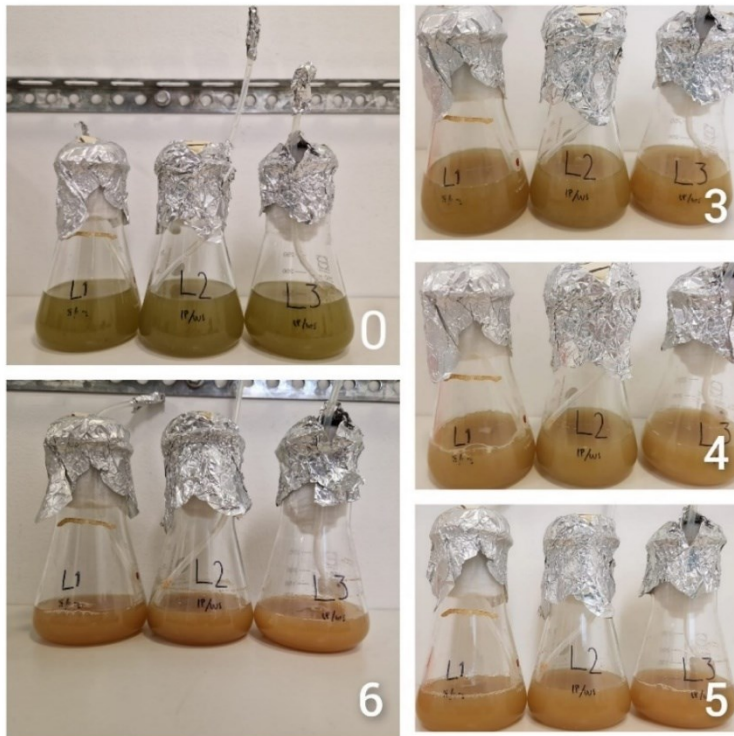
Kuvissa 29-33 nähdään kolmannen kasvatuksen aikaiset värimuutokset näytesarjoissa päiväkohtaisesti. Näytteet olivat viljelypäivinä hennon vihreitä ja kasvatuksen edetessä näytteet punertuivat. Poikkeuksena tähän näyte, joka ei sisältänyt lainkaan kalaprosessivettä. Kuvassa Kuva 33. 3.kasvatus, *S. maxima*, päivät 0, 3–6. Näytteen prosessivesipitoisuus 0 %. nähdäänkin, kuinka näyte vihertyy toivotulla tavalla kuudenteen kasvatuspäivään mennessä. Kontrollinäytteiden vastaavat muutokset näkyvät kuvassa Kuva 34. 3.kasvatus, kontrollinäytteet, päivät 0, 3–6.. Kontrollinäytteissä ei ole havaittavissa ei toivottua muutosta. Kasvatuksen loputtua tutkittiin mikroskoopin avulla, mitä näytteet sisältävät. Mikroskopoidut näytteet olivat pakastettuja, jonka vuoksi eläviä mikroleväsoluja ei saatu kuviin. Kuvassa Kuva 35. *S. maxima* kuvattuna mikroskoopilla, näytteen prosessivesipitoisuus 0 %, päivä 6. näkyvillä muutamia *S. maxima* -mikroleviä 0 % näytteessä

kuudentena kasvatuspäivänä. 100 % näytteen kuudennen kasvatuspäivän ei toivottua sisältöä nähdään puolestaan kuvassa Kuva 36. *S. maxima* kuvattuna mikroskoopilla, näytteen prosessivesipitoisuus 100 %, päivä 6..

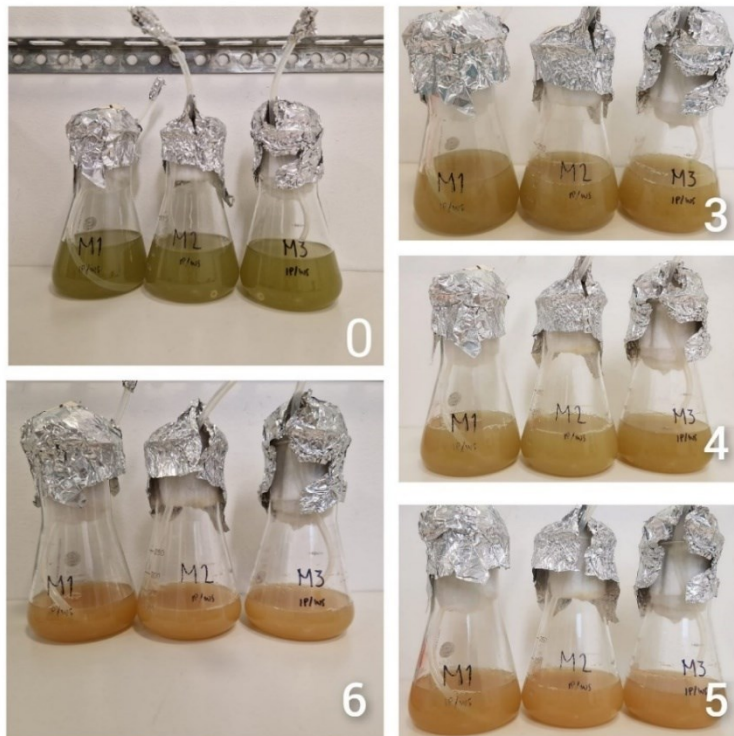
Kuva 29. 3.kasvatus, *S. maxima*, päivät 0, 3–6. Näytteen prosessivesipitoisuus 100 %.



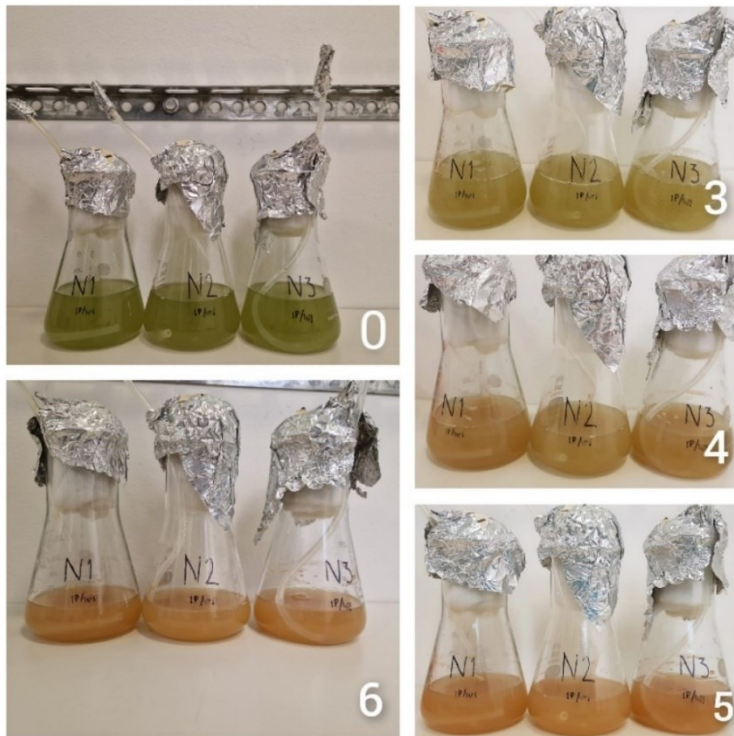
Kuva 30. 3.kasvatus, *S. maxima*, päivät 0, 3–6. Näytteen prosessivesipitoisuus 75 %.



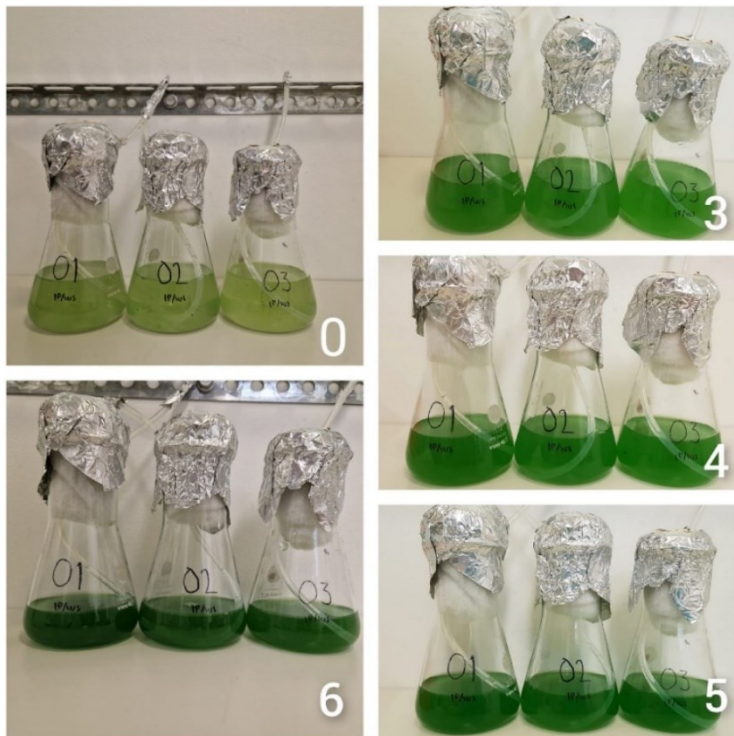
Kuva 31. 3.kasvatus, *S. maxima*, päivät 0, 3–6. Näytteen prosessivesipitoisuus 50 %.



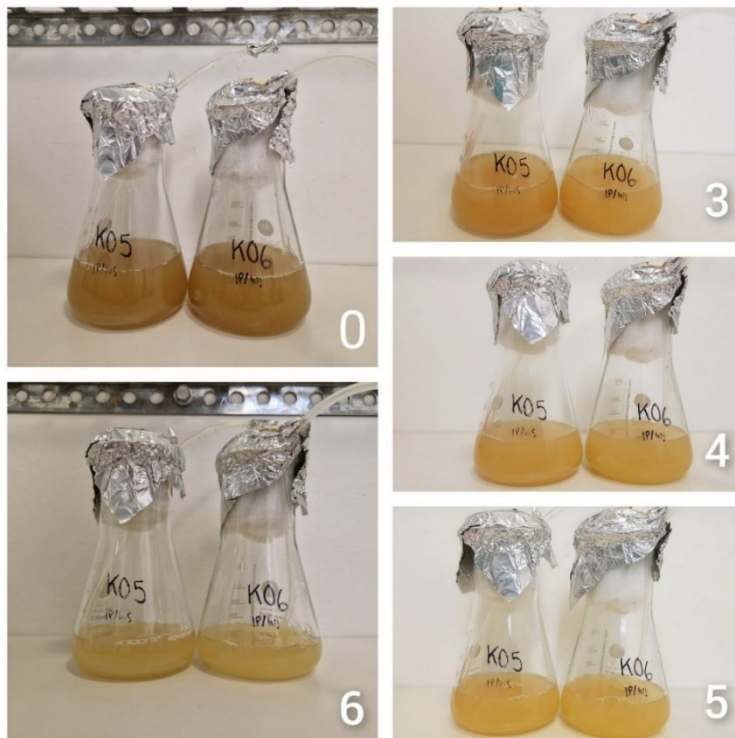
Kuva 32. 3.kasvatus, *S. maxima*, päivät 0, 3–6. Näytteen prosessivesipitoisuus 25 %.



Kuva 33. 3.kasvatus, *S. maxima*, päivät 0, 3–6. Näytteen prosessivesipitoisuus 0 %.



Kuva 34. 3.kasvatus, kontrollinäytteet, päivät 0, 3–6.



Kuva 35. *S. maxima* kuvattuna mikroskoopilla, näytteen prosessivesipitoisuus 0 %, päivä 6.



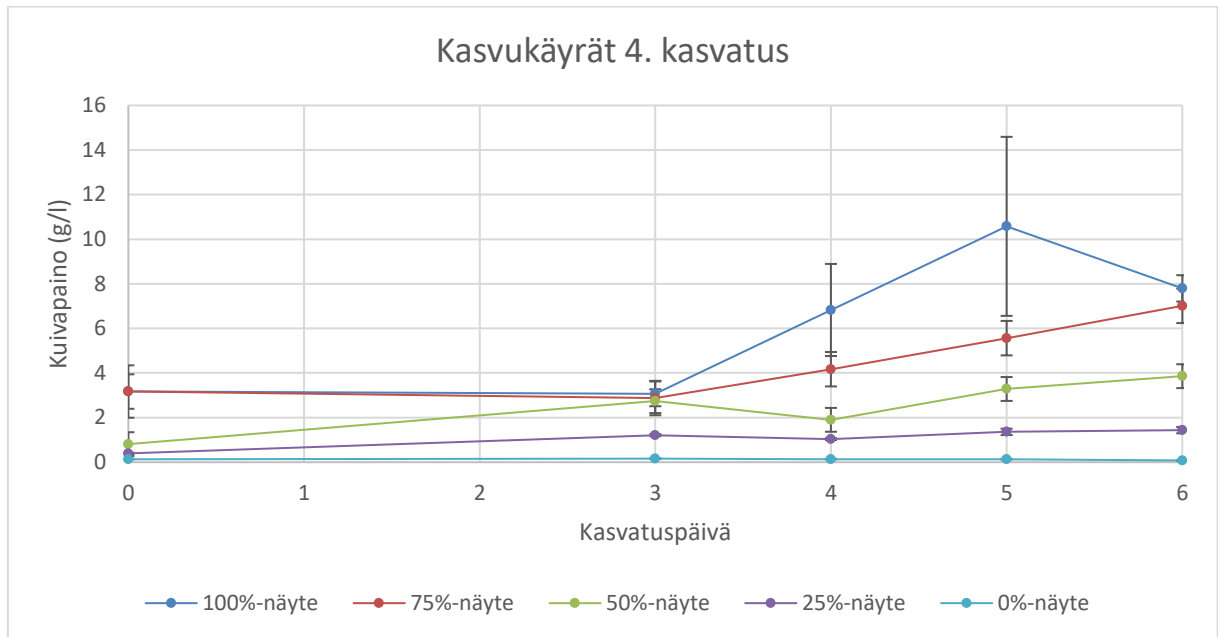
Kuva 36. *S. maxima* kuvattuna mikroskoopilla, näytteen prosessivesipitoisuus 100 %, päivä 6.



#### 7.5 Kasvatus 4, *Selenastrum* sp.

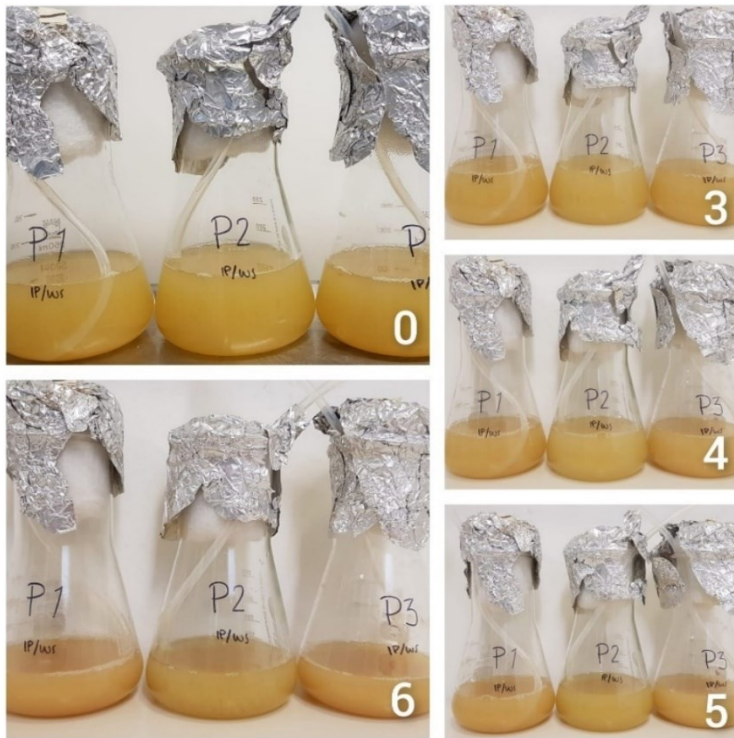
*Selenastrum* sp. -kannan kasvatuksessa korkeimman kuivapainon saavutti viidentenä kasvatuspäivänä näyte, jonka kalaprosessivesipitoisuus oli 100 %. Kuivapaino oli tuolloin 10,577 g/l. 75 % kalaprosessiveden sisältäneen näytteen korkein kuivapainotulos oli 7,013 g/l, joka saatiin kuudentena kasvatuspäivänä. Näyte, jonka kalaprosessivesipitoisuus oli 50 %, korkeimmaksi kuivapainoksi tuli kuudentena kasvatuspäivänä 3,858 g/l. 25 % kalaprosessivettä sisältäneen näytteen korkein kuivapainotulos oli 1,438 g/l. Tämä tulos saavutettiin kuudentena kasvatuspäivänä. Muista poiketen näytteen, jonka kalaprosessivesipitoisuus oli 0 %, sen korkein kuivapainotulos oli 0,137 g/l, joka saavutettiin jo neljäntenä kasvatuspäivänä. Kontrollinäytteen korkein kuivapaino saatiin nollopäivänä, joka oli silloin 3,723 g/l. Kuivapainon laskettiin (3) avulla. Kaikki neljännen kasvatuksen tulokset koottiin kasvatuskäyriksi kuvaan 37, josta jokaisen näytteen kasvua voidaan seurata.

Kuva 37. Kasvatuksen 4. kasvukäyrät perustuen *Selenastrum* sp. -levän kuivapainoon (g/l). Näytteet nimetty kalaprosessivesipitoisuuden mukaan.

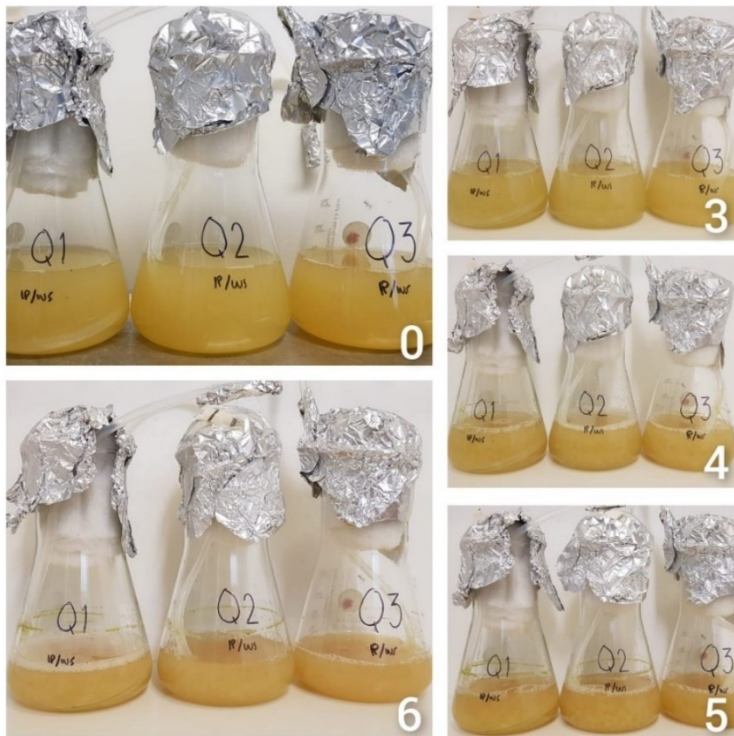


Kuvissa 38-42 on näkyvillä näytteittäin kasvatuspäivinä tapahtuneet värimuutokset. Näytteissä, jotka sisälsivät kalaprosessivettä, ei värimuutoksia tapahtunut lainkaan. Näyte, joka ei sisältänyt kalaprosessivettä, vihertyi hiukan. Kontrollinäytteiden värimuutokset ovat kuvassa Kuva 43. 4.kasvatus, kontrollinäytteet, päivät 0, 3–6. Näytteet sisältävät pelkkää kalaprosessivettä., josta voidaan todeta, ettei muutoksia juurikaan ole nähtävillä. Kun kasvatuksia olivat ohitse, päätettiin vielä tutkia muutamia näytteitä mikroskoopin avulla, jotta nähdään mitä todellisuudessa näytteissä kasvaa. Kasvatusliuokseen viljellyn (0 % kalaprosessivesipitoisuus) näytteen sisältämät *Selenastrum* sp. -mikrolevät nähdään kuvassa Kuva 44. *Selenastrum* sp. kuvattuna mikroskoopilla. Näytteen prosessivesipitoisuus 0 %, kasvatuspäivä 6.. 100 % kalaprosessiveteen viljeltyjen rinnakkaisnäytteiden huomattiin sisältävän niihin kuulumatonta kasvustoa, jota on näkyvillä kuvassa Kuva 45. *Selenastrum* sp. kasvatuksen sisältämää rihmastoja mikroskooppikuvassa. Näytteen prosessivesipitoisuus 100 %, kasvatuspäivä 6, rinnakkaisnäyte 1., kuvassa Kuva 46. *Selenastrum* sp. kasvatuksen sisältämää rihmastoja mikroskooppikuvassa. Näytteen prosessivesipitoisuus 100 %, kasvatuspäivä 6, rinnakkaisnäyte 2. ja kuvassa Kuva 47. Kasvatuksen sisältämää rihmastoja mikroskooppikuvassa. Näytteen prosessivesipitoisuus 100 %, kasvatuspäivä 6, rinnakkaisnäyte 3.

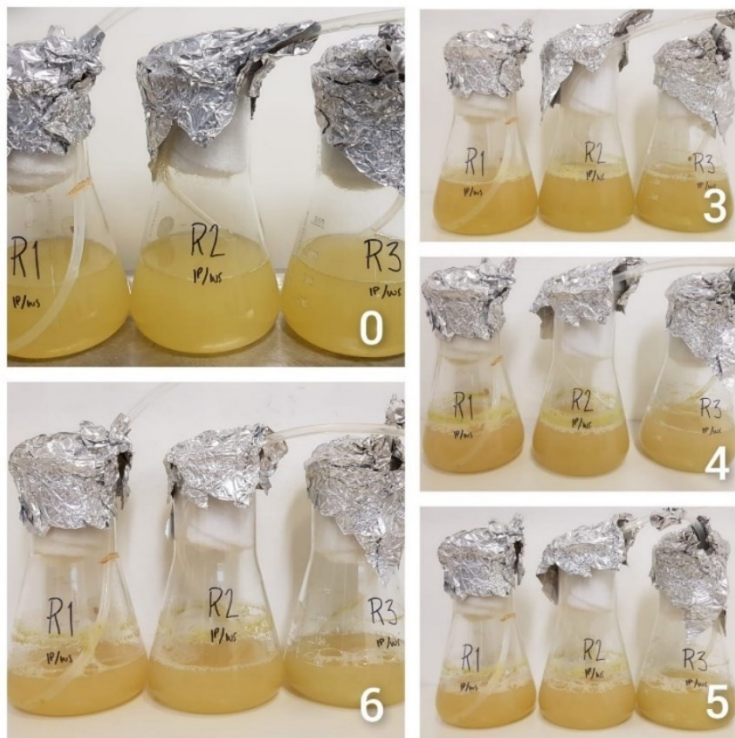
Kuva 38. 4.kasvatus, *Selenastrum* sp., päivät 0, 3–6. Näytteen prosessivesipitoisuus 100 %.



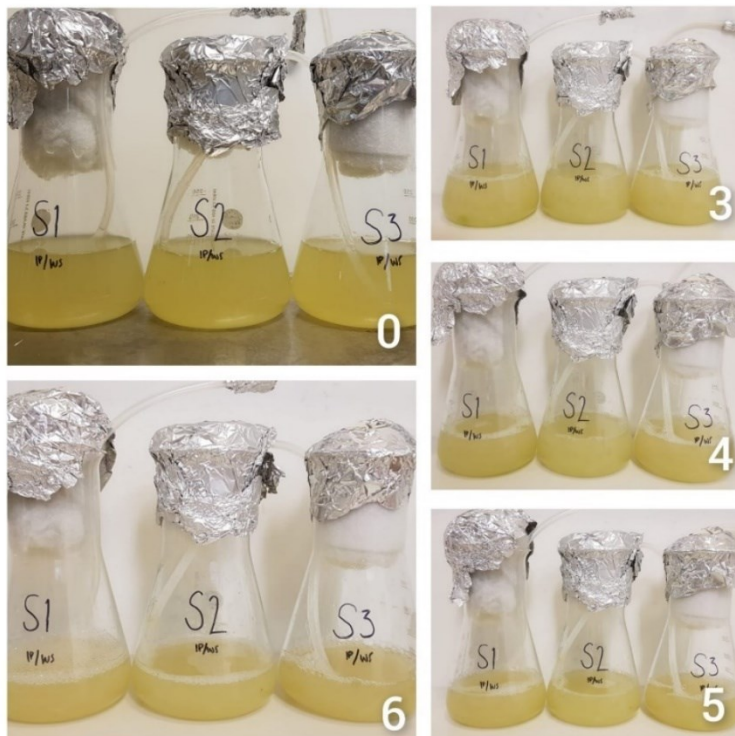
Kuva 39. 4.kasvatus, *Selenastrum* sp., päivät 0, 3–6. Näytteen prosessivesipitoisuus 75 %.



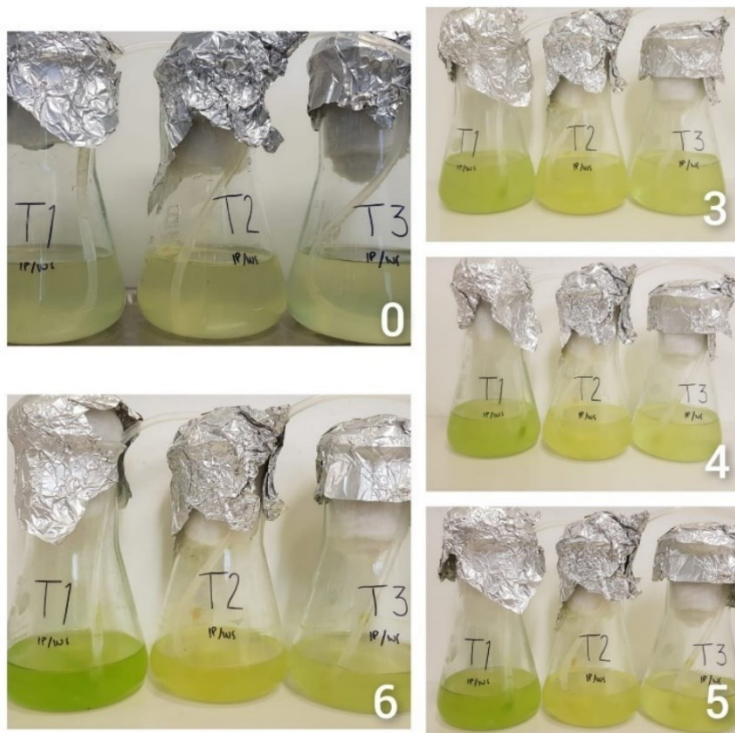
Kuva 40. 4.kasvatus, *Selenastrum* sp., päivät 0, 3–6. Näytteen prosessivesipitoisuus 50 %.



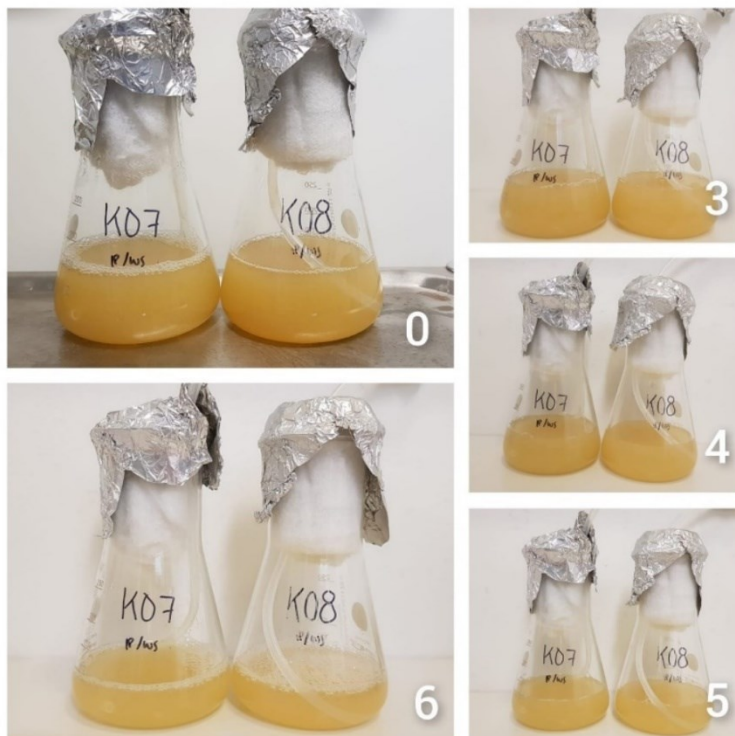
Kuva 41. 4.kasvatus, *Selenastrum* sp., päivät 0, 3–6. Näytteen prosessivesipitoisuus 25 %.



Kuva 42. 4.kasvatus, *Selenastrum* sp., päivät 0, 3–6. Näytteen prosessivesipitoisuus 0 %.



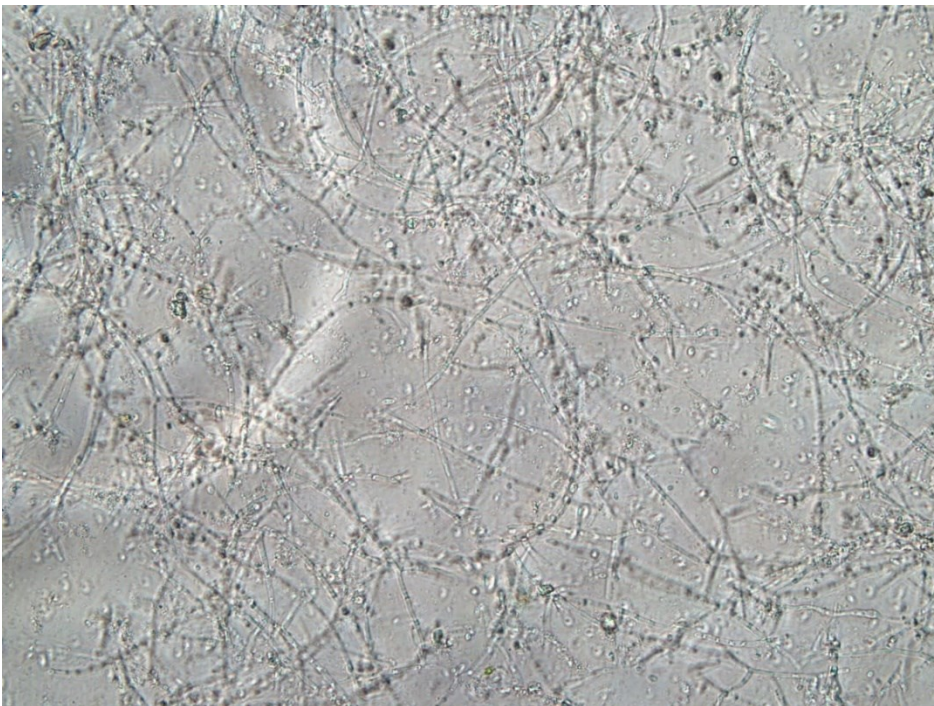
Kuva 43. 4.kasvatus, kontrollinäytteet, päivät 0, 3–6. Näytteet sisältävät pelkkää kalaprosessivettä.



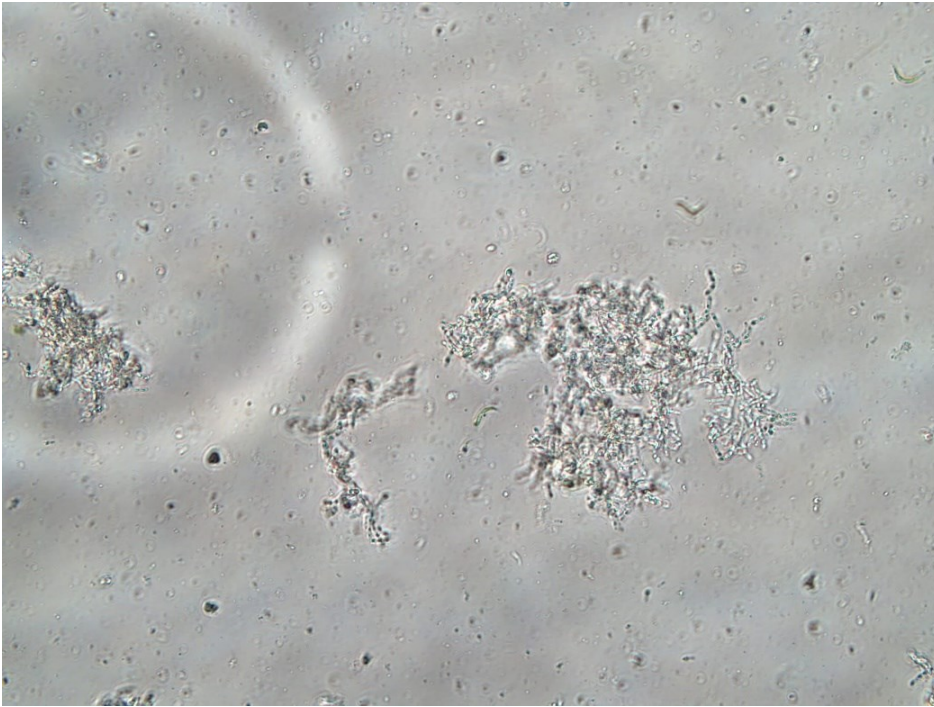
Kuva 44. *Selenastrum* sp. kuvattuna mikroskoopilla. Näytteen prosessivesipitoisuus 0 %, kasvatuspäivä 6.



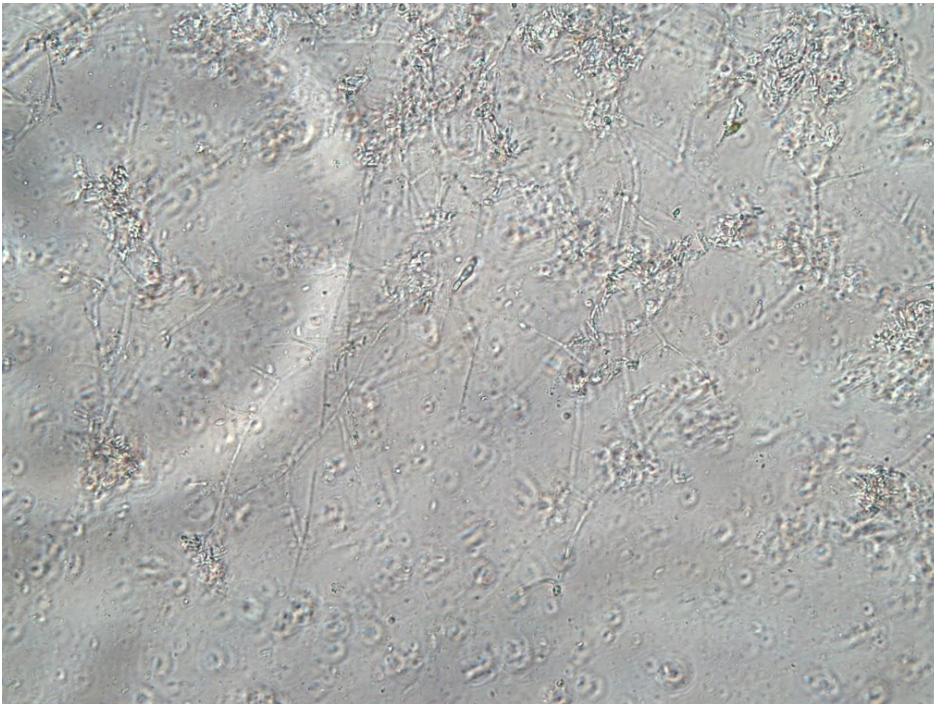
Kuva 45. *Selenastrum* sp. kasvatuksen sisältämää rihmastoja mikroskooppikuvassa. Näytteen prosessivesipitoisuus 100 %, kasvatuspäivä 6, rinnakkaisnäyte 1.



Kuva 46. *Selenastrum* sp. kasvatuksen sisältämää rihmastoa mikroskooppikuvassa. Näytteen prosessivesipitoisuus 100 %, kasvatuspäivä 6, rinnakkaisnäyte 2.



Kuva 47. Kasvatuksen sisältämää rihmastoa mikroskooppikuvassa. Näytteen prosessivesipitoisuus 100 %, kasvatuspäivä 6, rinnakkaisnäyte 3.



## 8 Kasvatusten johtopäätökset

*E. gracilis* kasvoi erittäin hyvin, erityisesti kun kasvualustana oli 100 % kalaprosessivesi.

Kuten kasvatuskuvista kuvassa Kuva 10. 1.kasvatus, *E. gracilis*, näytteiden prosessivesipitoisuus 100 %, päivät 0, 3–6.-Kuva 14 voidaan nähdä, on jokaisessa näytteessä tapahtunut huomattavia muutoksia värin suhteen ensimmäisen ja viimeisen kasvatuspäivän välillä. Huomattavia eroja värimuutoksissa ei ollut eri näytteiden välillä, vaan eri kalaprosessivesipitoisuudesta huolimatta, kaikki vihersivät samalla tavalla. Kuva 9 tarkastellessa kuitenkin huomataan, että kuivapainojen mukaan 100 % kalaprosessivettä sisältäneet näytteet kasvoivat massallisesti huomattavasti paremmin kuin muut. Voidaankin siis todeta tulosten sekä kasvatuskuvien perusteella, että *E. gracilis* -levän kasvatukseen Rasmixin kalaprosessivesi sopii erittäin hyvin. Näihin tuloksiin ei kuitenkaan täysin voida luottaa, sillä kasvatuksen edetessä huomattiin, että näytteissä, joissa oli kalaprosessivettä, kasvoi mikrolevän lisäksi rusehtavaa kuplamaista kasvustoa.

Kasvustoa ei tunnistettu, mutta pohdittiin, olisiko kasvusto voinut olla esimerkiksi hiivaa, joka olisi päätynyt kasvatuspulloihin laminaarikaapin huonosta puhdistuksesta johtuvan kontaminaation kautta. Täysin aukoton tämä selitys ei kuitenkaan ole, sillä kasvatuspulloihin kuulumatonta kasvustoa oli vain kalaprosessivettä sisältäneissä näytteissä ja näytteet, jotka eivät sisältäneet kalaprosessivettä viljeltiin ensimmäisenä.

*S. obliques* -levän kasvu *E. gracilis* -levään verrattuna oli hieman maltillisempaa. Kuten kasvatuksen aikana otetuista kuvistakin voidaan nähdä, on värimuutokset ensimmäisen ja viimeisen päivän välillä huomattavia, mutta kuitenkin heikompia kuin ensimmäisen (*E. gracilis*) kasvatuksen aikana. Kuivapainotulosten perusteella *S.obliques* ei yltänyt vastaavaan massaansa suurimmilla prosessivesipitoisuuksilla, kuin *E. gracilis*. Pienemmillä prosessivesipitoisuuksilla *S. obliques* saavutti korkeamman kuivapainotuloksen, kuin *E. gracilis*.

Huomiota herättävää tässä kasvatuksessa oli se, että suurin osa näytteistä saavutti kolmantena kasvatuspäivänä korkean kuivapainon, joka laski neljänteen päivään mennessä melkoisesti. Kuivapainot kuitenkin nousivat tämän jälkeen. Tämä on merkillistä, sillä mikroskoipoituamme näytettä, jonka kalaprosessivesipitoisuus oli 100 %, kuudentena

kasvatuspäivänä, suurin osa löydettyistä leväsoluista olivat hajoamassa. Näytteessä oli myös erittäin paljon muuta näytteeseen kuulumatonta kasvustoa, joka voisi viitata siihen, että ensimmäisen kasvuhuipun jälkeen tuo kasvusto on ottanut vallan ravinnosta, jonka seurauksena levät ovat alkaneet hajoamaan ja kasvusto alkanut kasvamaan.

Kolmannen kasvatuksen aikana *S. maxima* ei kasvatuspullojen värin perusteella kasvanut ollenkaan. Siinä missä muiden kasvatusten aikana värit edes vihertyivät kuudetta kasvatuspäivää lähestyessä, *S. maxima* -levää sisältäneiden pullojen väri näyttää punertuvan. Kuitenkin kolmannen kasvatuksen kasvukäyriä sekä kuivapainotaulukkoa tarkastellessa huomataan, että näytteessä, joka oli 100 % kalaveteen viljelty, *S. maxima* on saavuttanut edelliseen kahteen kasvatukseen nähden korkeimman kuivapainopitoisuuden viidentenä kasvatuspäivänä. 100 % kalaprosessivettä sisältänyttä näytettä tarkasteltiin kuudennelta kasvatuspäivältä mikroskoopilla ja tämän kasvatuksen kohdalla näytteiden huomattiin sisältävän käytännössä kaikkea muuta, kuin itse *S. maxima* -levää. Tämän takia kontaminaatio vaikuttaa todennäköisimmältä selitykseltä.

*S. maxima* -levän kasvatuksissa kalaprosessiveden pH säädettiin NaOH:n avulla arvoon 8, jonka jälkeen kalaprosessivesi steriloitiin toisen kerran. Tämän seurauksena kalaprosessiveteen muodostui paksu sakkakerros, joka näkyy kuvassa Kuva 48. 3. Kasvatuksessa käytettyä pH säädettyä kalaprosessivettä, jonka pohjalla paljon sakkaa. Kalaprosessivesipullot, joiden pH arvoa ei säädetty, eivät sisältäneet juurikaan sakkaa. Näiden pullojen pohjalle oli painunut todella vähäiset määrät lietettä, joka sekoittui kalaprosessiveteen helposti pienellä sekoituksella.

Kuva 48. 3. kasvatuksessa käytettyä pH säädettyä kalaprosessivettä, jonka pohjalla paljon sakkaa.



Pohdittiin myös, onko pH säätö ollut riittävä, ja olisiko *S. maxima* tarvinnut suurempia säätöjä, esimerkiksi valon, lämpötilan, kosteuden tai ilmaston suhteen. Voi myös olla, että *S. maxima* ei viihdy näin sakeassa tai tummassa kasvatusalustassa, joka on voinut myös vaikuttaa kasvatulokseen.

Jos *Selenastrum* sp. -kannan kasvatusta tarkastellaan pelkkien kuivapainojen perusteella, tuotti 100 % kalaprosessivettä sisältänyt näyte kaikkien kasvatusten suurimman kuivapainon. Kuitenkin kasvatuspäivistä otettuja värimuutoskuvia tarkastellessa huomattiin, ettei väri ole vihertynyt laisinkaan. Pientä muutosta on kuitenkin havaittavissa, sillä sävy punertuu hiukan kasvatuksen loppua kohden. Tästä voidaan kuitenkin päätellä, ettei *Selenastrum* sp. kasvanut lainkaan kasvatusviikon aikana.

*Selenastrum* sp. -levän kuivapainon suuren nousun takia haluttiin tutkia tarkemmin, mitä 100 % kalaprosessivettä sisältänyt näyte sisälsi. Kasvatuksen lopuksi tutkittiin kuudennen

kasvatuspäivän rinnakkaisia näytteitä. Mikroskooppikuvista selvisi, ettei rinnakkaisnäyte 1 sisältänyt enää ollenkaan mikrolevää, vaan näytteessä kasvoi rihmasto, joka ei sinne kuulu. Kuva 45 näkyvillä 100 % kalaprosessivettä sisältäneen rinnakkaisnäytteen 1 sisältämää rihmasto. Tämän löydöksen seurauksena päätettiin tutkia myös rinnakkaisnäytteet 2 ja 3 ja samaa rihmasto löytyi näistäkin. Rinnakkaisnäytteessä 2, kasvustoa oli vähemmän ja näytteestä löytyi muutamia *Selenastrum* sp. -leväsoluja, joita nähdään kuvassa 46. Rinnakkaisnäytettä 3 mikroskopoitaessa tehtiin sama havainto ensimmäisen näytteen kanssa. Rihmasto oli ottanut vallan mikrolevästä täysin, sillä mikroleväsoluja ei ollut nähtävillä näytteessä ollenkaan. Kuvassa Kuva 47. Kasvatuksen sisältämää rihmasto mikroskooppikuvassa. Näytteen prosessivesipitoisuus 100 %, kasvatuspäivä 6, rinnakkaisnäyte 3. näkyvillä rinnakkaisnäytteen 3 rihmasto.

*S. maxima* ja *Selenastrum* sp. -mikrolevien huonoon kasvuun on voinut vaikuttaa näiden mikrolevien huono sopeutumiskyky erilaisiin kasvualustoihin. *S. maxima* -levän tiedetään olevan tarkka erityisesti kasvatusalustan pH arvosta. Voi olla, että kalaprosessiveden korkea fosforipitoisuus on vaikuttanut myös kasvuun negatiivisesti. Fosforipitoisuus ylitti Roopnarain et al. tutkimuksessa määritetyn ihanteellisen fosforipitoisuuden melko reilusti. (Roopnarain A., 2013) *E. gracilis* kasvoi korkeasta fosforipitoisuudesta huolimatta loistavasti, sillä sen tiedetään olevan hyvin erilaisiin kasvuympäristöihin sopeutuva mikrolevä. (Mercier, 2018) Selkeästi myös *S. obliques* sietää korkeaa fosforia, sillä kasvua tapahtui, joskin maltillisemmin, kuin *E. gracilis* -levällä.

Korkea COD-pitoisuus on voinut olla myös osasy syy *Selenastrum* sp. ja *S. maxima* -levän mitättömään kasvuun. Korkea COD-pitoisuus voi vaikuttaa ei toivottujen mikrobien kasvuun, jolloin mikrolevät joutuvat kilpailemaan ravinnon saannista. Jokaisesta mikroskoopilla tarkastetuissa kuvissa löydettiin jotain ei sinne kuuluvaa elämää. Erityisesti elinympäristöstään tarkka *S. maxima* on voinut olla kasvamatta tämän vuoksi.

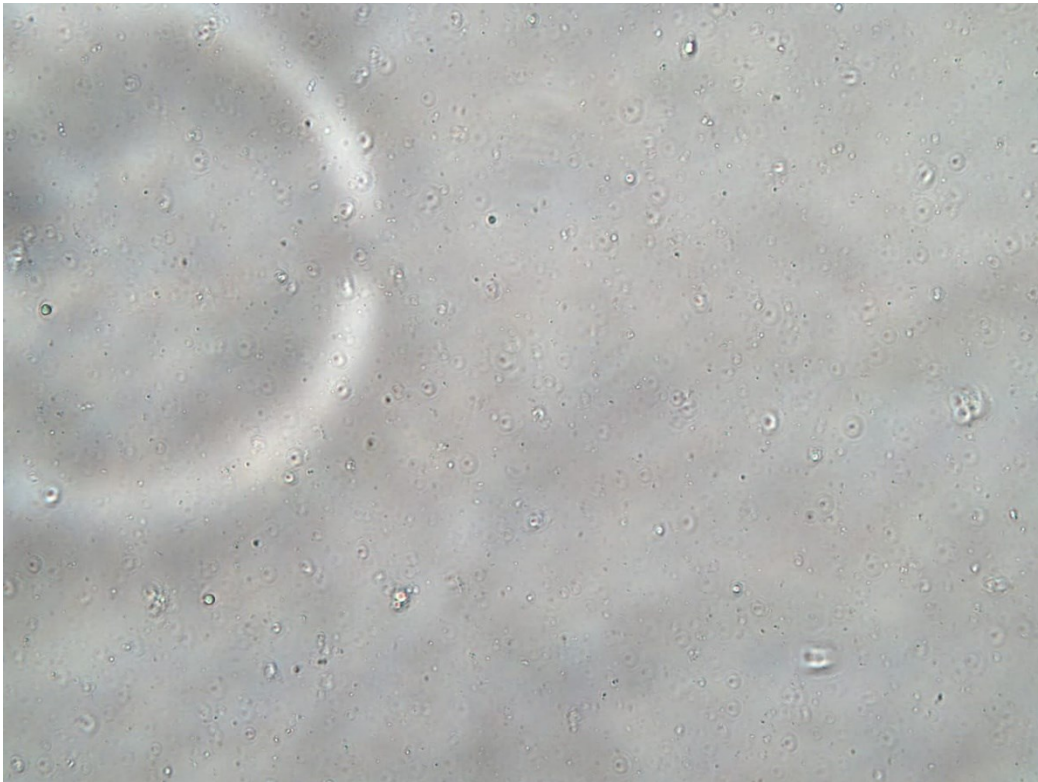
Myös tyypellä ja sillä, missä muodossa se esiintyy kalaprosessivedessä, on mikrolevien kasvulle suuri merkitys. Kaikki käsittelet läpikäyneessä kalaprosessivedessä vain n. 5 % tyypestä oli ammonium-, eli liukoisessa muodossa olevaa tyyppiä. Lin ym., (2019) tutkimuksessa todettiin typpipitoisuuden olevan yksi tärkeimmistä ravintoaineista mikrolevien biomassan tuotannossa. Kuitenkin korkea ammoniumtyppipitoisuus on

mikroleväsoluille myrkyllistä, jonka seurauksena mikroleväkasvu hidastuu tai estyy tai pahimmassa tapauksessa johtaa solukuolemaan. Ammoniumtyyppiä esiintyy kahdessa muodossa  $\text{NH}_4$  tai  $\text{NH}_3$ . Jälkimmäistä pidetään mikroleville myrkyllisempänä, joka vaikuttaa suoraan mikrolevän fotosynteesin suorituskäyttöön. Ammoniumtyypin muotoon vaikuttaa esimerkiksi pH. (Li ym., 2019) Onkin hyvä pohtia, olisiko *S. maxima* -levän kasvatuksissa tehty pH säätö voinut vaikuttaa ammoniumtyypin muotoon. Seuraavissa tutkimuksissa olisi myös hyvä selvittää, missä menee ammoniumtyypin pitoisuuden raja, joka muuttaa sen myrkylliseksi mikroleville. Ammoniumtyypin toksisuus voisi olla yksi osasy *S. maxima* -mikrolevän kasvamattomuudelle kalaprosessivedessä. Tiedossa on myös, että suurin osa mikrolevistä pystyy hyödyntämään vain liukoisessa muodossa olevaa tyyppiä, jonka vähyys on voinut vaikuttaa erityisesti *Selenastrum* sp. -kannan kasvamattomuuteen. Poikkeuksena edelliseen on *E. gracilis*, joka pystyy hyödyntämään kokonaistyyppiä monipuolisesti. Tämä selittäisi, miksi *E. gracilis* kasvoi muita voimakkaammin juuri 100 % kalaprosessivedessä.

Koska jokainen kasvatus sisälsi erilaista, ylimääräistä näytteisiin kuulumatonta kasvustoa on hyvä pohtia, mikä meni pieleen. Jos näytteissä olisikin ollut samaa niihin kuulumatonta kasvustoa, olisi sen alkuperä ollut helppo jäljittää esimerkiksi kalaprosessiveteen. *E. gracilis* -levän kasvatuksessa esiintyneet sauvamaiset mikrobit ovat voineet päätyä kasvatuksiimme laminaarikaapin kautta. Vaikka toiminta kasvatusten aikana oli täysin aseptista, on laminaarikaappi itsessään voinut kontaminoitua ja riittämättömän puhdistuksen seurauksena ensimmäisen kasvatuksen mukana kasvoi Kuva 18 näkyneet mikrobit. Tämän jälkeen laminaarikaappiin asennettiin ultravioletivalo. Uv-valo oli päällä jokaisena aamuna muutaman tunnin ajan, ja sen tarkoituksena oli pienentää kontaminaatoriskiä. Tämä ei kuitenkaan auttanut seuraavien kasvatusten kohdalla.

Kasvatuksissa kontaminoituneita näytteitä olivat vain ne, jotka sisälsivät kalaprosessivettä. Erikoista tässä tilanteessa on se, etteivät eri kasvatusten aikana tehdyt kontrollinäytteet, jotka sisälsivät pelkkää kalaprosessivettä, muuttuneet millään tavalla kasvatusaikana. Ne eivät sisältäneet mitään kasvustoa, kun näytteitä mikroskoipoitiin kuudentena kasvatuspäivänä. Kuva 49 nähtävillä kontrollinäytteen sisältöä. Näyte sisältää partikkeleita, mutta ne ovat kuitenkin todella erilaisia, kuin leväkasvatusten sisältämät mikrobit ja rihmastot. Kalaprosessiveden kontaminoitumista vastaan puhuu myös se, että jokaisessa kasvatuksessa näytteet sisälsivät erilaista, ei-toivottua kasvustoa.

Kuva 49. Kontrollinäyte 7 kuudentena kasvatuspäivänä.



Yksi vaihtoehto näytteissä esiintyville ei toivotuille kasvustoille on se, ettei kasvatuksissa käytettyjen Erlenmeyer pullojen, ja niihin lisättyjen vanutuppojen ja näytteenottoputkien sterilointi ole ollut riittävä tai ne ovat kontaminoituneet steriloinnin jälkeen. Steriloinnit menivät jokaisella kerralla suunnitelmallisesti läpi, eikä autoklaavin kanssa ollut ongelmia. Sterilointien onnistumista mitattiin mustaksi muuttuvalla autoklaaviteipillä, joka indikoi oikean sterilointilämpötilan ja -ajan saavuttamista. Jokaiseen kasvatuksissa käytettyyn Erlenmeyer pulloihin liimattiin tällainen teipinpala, ja jokaisessa tuo teippi oli vaihtanut väriä.

Ennen sterilointia jokaisen Erlenmeyer pullon suulle laitettiin näytteenottoletku ja vanutuppo, jonka jälkeen suuaukko sekä näytteenottoputken pää päällystettiin foliolla niin, että Erlenmeyer pullojen voitiin luottaa pysyvän steriileinä autoklavoinnin jälkeen. On mahdollista, etteivät foliot ole pysyneet kunnolla paikoillaan säilytyksen aikana, jolloin Erlenmeyer pullot ovat päässeet kontaminoitumaan. Tämä ei kuitenkaan selitä, miksi vain kalaprosessivettä sisältäneet näytteet kontaminoituivat. Mahdollista on myös, että kontaminaatio olisi tapahtunut käytettyjen vanutuppojen kautta. Tämä kuitenkin vaatisi sen, että ei-toivotut mikrobit olisivat selvinneet autoklavoinnista.

## 9 Yhteenveto

Aikaisempia sivuvirtakasvatuksia tutkiessa huomattiin, ettei vastaavassa kalaprosessivedessä ole aikaisemmin kasvatettu mikroleviä. Erilaisissa sivuvirroissa oli kuitenkin kasvatettu eniten *C. vulgaris*, *S. maxima* sekä *E. gracilis* -leviä. Näistä suosituin oli ehdottomasti *C. vulgaris*. Aikaisemmat sivuvirtakasvatukset ja niissä käytetyt mikrolevät koottiin taulukkoon, joka on opinnäytetyön liitteenä 1. Tästä syystä olisikin hyvä kokeilla vielä myöhemmin sen kasvatusta Rasmixin kalaprosessivedessä. Kokeellisen osion yllättäjänä toimi *S. obliquus*, jota ei mainittu missään tutkimuksissa, mutta päätyi kuitenkin kasvatukseen. *S. obliquus* kasvoi melko hyvin jopa 100 % kalaprosessivedessä. Sen kasvupotentiaali voisi olla erilaisissa olosuhteissa loistava. Tästä saisikin hyvän jatkotutkimuskohteen.

Parasta mahdollista kasvatusmenetelmää, joka sopisi kaikille mikroleville, ei löytynyt suoraan. Tutkimuksellisessa osuudessa kasvatusmenetelmä oli kaikille kasvatetuille leville sama, poikkeuksena *S. maxima*, jonka kasvatukseen käytetyn kalaprosessiveden pH nostettiin arvoon 8. Muuten jokaisessa kasvatuksessa lämpö, valo: pimeä -aika, valon intensiteetti ja sekoitusparametrit olivat identtiset. Kasvatuslämpötila oli + 25 °C. Valo: pimeä -aika kasvatuksissa oli 12 h/ 12 h ja valon intensiteetti oli 150 µmol. Kasvatusnäytteitä sekoitettiin koko kasvatuksen ajan ravistelijalla 125 rpm. Seuraavissa tutkimuksissa olisikin hyvä lähteä kartoittamaan tarkemmin jokaiselle levälle optimaalisinta kasvatusmenetelmää. Aikaisemmissa kasvatuksissa käytetyt kasvatusmenetelmät kerättiin taulukkoon, joka on liitteenä 1.

Rasmixin kalaprosessivedessä parhaiten kasvoi *E. gracilis*, jonka kuivapainoksi saatiin kuudentena kasvatuspäivänä 9,44 g/l. Lopputuloksessa on huomioitu tutkimuksellisessa osuudessa kasvatettujen mikrolevien kasvatuskuvat ja niiden värimuutokset ja peilattu tätä kuivapainotuloksiin. Tulos ei kuitenkaan ole täysin luotettava, sillä kuten kaikki muutkin kasvatukset, sekin sisälsi näytteeseen kuulumatonta kasvustoa. Tulevissa tutkimuksissa olisi hyvä kiinnittää huomiota erityisesti aseptiseen työskentelyyn, jottei vastaavat kontaminaatiot uusiudu. Helpointa olisikin todeta, etteivät *Selenastrum* sp. ja *S. maxima* soveltuneet kalaprosessivesikasvatukseen ja *E. gracilis* ja *S. obliquus* -levien olevan tutkimuksen potentiaalisimmat mikroleväkannat kalaprosessivesikasvatusten näkökulmasta.

Sitten kun jatkotutkimuksissa onnistutaan kasvattamaan puhdasta mikrolevää, saadaan kalaprosessiveden todellinen potentiaali mikrolevien kasvatusalustana selville. Tämän jälkeen suuremman kokoluokan mikroleväkasvatukset paljastavat, pystytäänkö tässä sivuvirrassa tuottamaan biopolttoaineille raaka-ainetta, eli biomassaa. Jatkotutkimuksissa tulisi myös selvittää mikrolevän käyttöä arvojakeiden, esimerkiksi proteiinien tai väriaineiden lähteenä. Kestävän kehityksen kannalta korkea biomassan tuotto tai mikrolevän käyttö ihmisravintona tai ravintolisänä olisi paras vaihtoehto erityisesti tilanteessa, jossa paras mahdollinen mikrolevämassan tuotto saadaan 100 % kalaprosessivedessä, johon ei tarvitse lisätä mitään. Tällöin kasvatusprosessi on halvempi ja helpompi toteuttaa, joka lisää sivuvirtakasvatuksen potentiaalia tulevaisuuden keinona tuottaa ruokaa tai biomassaa. Tämän tutkimuksen aikana tehdyt kalaprosessivesikäsittelet tulisivat olemaan suuremmissa mittakaavassa melko kalliit ja työläät ja yksi tulevaisuuden tutkimuksista voisikin olla se, että miten esimerkiksi *E. gracilis* kasvaa käsittelemättömässä kalaprosessivedessä.

Tutkimus ei tuottanut odotettuja tuloksia, vaan kasvatuksissa esiintyneiden kasvustojen vuoksi tulokset ovat epäluotettavia, eikä niitä voida käyttää suoraan BioVeRa-hankkeen jatkotutkimuksissa. Onnistuimme kuitenkin kartoittamaan potentiaalisimmat mikrolevävaihtoehdot kalaprosessivesikasvatukseen. Lisäksi tämä opinnäytetyö poiki suuren määrän uusia, aiheeseen liittyviä tutkimuskohteita.

## Lähteet

- Abreu, A. P.;Fernandes, B.;Vicente, A. A.;Teixeira, J.;& Dragone, G. (8 2012). Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. *Bioresource technology*(118), 61-66. doi:[10.1016/j.biortech.2012.05.055](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.055)
- Acebu, P. I.;de Luna, M. D.;Chen, C.-Y.;Abarca, R. R.;Chen, J.-H.;& Chang, J.-S. (5 2022). Bioethanol production from *Chlorella vulgaris* ESP-31 grown in unsterilized swine wastewater. (A. Pandey, Toim.) *Biorecourse Technology*(352).  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127086>
- Aho, J.;& Hilden, T. (2014). *Maidon matkassa*. Opetushallitus.
- Ammattikorkeakoulujen rehtorineuvosto Arene ry. (2020). *Ammattikorkeakoulujen oppinäytetyöiden eettiset suositukset*. <http://www.arene.fi/wp-content/uploads/Raportit/2020/AMMATTIKORKEAKOULUJEN%20PINN%C3%84YTE%20C3%96IDEN%20EETTISET%20SUOSITUKSET%202020.pdf? t=1578480382>
- Amulya, K.;Dahiya, S.;& Mohan, S. V. (2016). *Bioremediation and Bioeconomy*, doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802830-8.00019-8>
- Avagyan, A. B. (27. 8 2008). *Springer*. Haettu 5. 1 2023 osoitteesta A contribution to global sustainable development: inclusion of microalgae and their biomass in production and bio cycles: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10098-008-0180-5>
- Barsanti, L.;& Gualteri, P. (2020). Handbook of algal science, technology and medicine. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818305-2.00004-8>
- Barsanti, L.;& Gualtieri, P. (2014). *Algae : Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. Pisa, Italy: CRC Press. <https://ebookcentral-proquest-com.ezproxy.hamk.fi/lib/hamk-ebooks/reader.action?docID=1407542>
- Briggs, G. M. (2021). Euglena; a unicellular algae. Teoksessa G. M. Briggs, *Inanimate life*. <https://milnepublishing.geneseo.edu/botany/chapter/euglena/>
- Busby, J. (2015). Euglena gracilis. *Smorgasboard of chemical blueprints located in plain bond algae*. Chemistry world. <https://www.chemistryworld.com/news/smorgasbord-of-chemical-blueprints-located-in-plain-pond-algae/8915.article>
- CCALA. (2020). *Scenedesmus obliquus*. Culture Collection of Autotrophic Organisms. <https://ccala.butbn.cas.cz/en/scenedesmus-obliquus-turpin-kuetzing-1>
- Chakravarty, S.;& Mallick, N. (7 2019). Optimization of lipid accumulation in an aboriginal green microalga *Selenastrum* sp. GA66 for biodiesel production. *Biomass and Bioenergy*(126), 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.05.006>

- Choi, H.-J. (2016). *Dairy wastewater treatment using microalgae for potential biodiesel application*. Catholic Kwandong University. Environmental Engineerin Research. <https://doi.org/10.4491/eer.2015.151>
- Coca, M.;Barrocal, V. M.;Lucas, S.;Gonzales-Benito, G.;& Garcia-Cubero, M. T. (4 2015). Protein production in *Spirulina platensis* biomass using beet vinasse-supplemented culture media. *Food and bioproducts processing*(94), 306-312. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2014.03.012>
- Dodds, W. K. (2007). *Freshwater Ecology*. <https://doi.org/10.1016/B978-012219135-0/50017-9>
- E.S. Bejor;C. Mota;N.M Ogarekpe;K.U. Emerson;& J. Ukpata. (2013). *Low-cost harvesting of microalgae*. [https://www.researchgate.net/profile/Ebaye-Bejor/publication/275270352\\_Low-cost\\_harvesting\\_of\\_microalgae\\_biomass\\_from\\_water/links/553637f10cf218056e92ed10/Low-cost-harvesting-of-microalgae-biomass-from-water.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Ebaye-Bejor/publication/275270352_Low-cost_harvesting_of_microalgae_biomass_from_water/links/553637f10cf218056e92ed10/Low-cost-harvesting-of-microalgae-biomass-from-water.pdf)
- El-Kassas, H. Y.;Heneash, A. M.;& Hussein, N. R. (12 2015). Cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* using confectionary wastes for aquaculture feeding. *Journal of genetic engineering and biotechnology*(12), 145-155. doi:[10.1016/j.jgeb.2015.08.003](https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2015.08.003)
- Eskola, R. (2018). *Mikrolevien kasvattaminen kalankasvattamon jätevesissä*. Lahden ammattikorkeakoulu. [https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/145006/Eskola\\_Reetta.pdf?sequence=3](https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/145006/Eskola_Reetta.pdf?sequence=3)
- Gani, P.;Sunar, N. M.;Matias-Peralta, H.;& Latiff, A. A. (2016). *Application of phycoremediation technology in the treatment of food processing wastewater by freshwater microalgae Botryococcus sp.* ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences. [https://www.researchgate.net/profile/Paran-Gani/publication/304015543\\_Application\\_of\\_Phycoremediation\\_Technology\\_in\\_the\\_Treatment\\_of\\_Food\\_Processing\\_Wastewater\\_by\\_Freshwater\\_Microalgae\\_Botryococcus\\_sp/links/5763535e08aeab6e490aa542/Application-of-Phycorem](https://www.researchgate.net/profile/Paran-Gani/publication/304015543_Application_of_Phycoremediation_Technology_in_the_Treatment_of_Food_Processing_Wastewater_by_Freshwater_Microalgae_Botryococcus_sp/links/5763535e08aeab6e490aa542/Application-of-Phycorem)
- Gonçalves, C. F.;Menegol, T.;& Rech, R. (12. 2 2019). Biochemical composition of green microalgae *Pseudoneochloris marina* grown under different temperature and light conditions. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101032>

- Guiry, M.;& Guiry, G. (22. 11 2021). *AlgaeBase*.  
[https://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus\\_id=43450](https://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=43450)
- Hamidian, N.;& Zamani, H. (6 2022). Biomass production and nutritional properties of *Chlorella sorokiniana* grown on dairy wastewater. *Journal of Water Process Engineering*(47). <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.102760>
- Han, P.;& Zhou, W. (03 2021). Recycling nutrients from soy sauce wastewater to culture value-added *Spirulina maxima*. *Algal Research*(53).  
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102157>
- Hämeen Ammattikorkeakoulu. (24. 2 2023). Kjeltec 8400. *Kokonaistypen, proteiinin tai ammoniumtypen määrittäminen*. Hämeenlinna: HAMK.
- Kaustara, E. (2 2020). Lahdessa poimitaan ravinteet sivuvirroista. (E. Kaustara, Toim.) *Kemiamedia*, 48-50.
- Krishnamoorthy, S.;Manickam, P.;& Muthukaruppan, V. (15. 3 2019). Evaluation of distillery wastewater treatability in a customized photobioreactor using blue-green microalgae – Laboratory and outdoor study. *Journal of Environmental Management*(234), 412-423. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.01.014>
- Kroon, E.;& Hessels, L. (2023). *A research of cultivating microalgae using food industry process water*. Häme university of applied sciences, Hogeschool Van Hall Larenstein, University of Applied Sciences, Hämeenlinna.
- Lang, B. F.;Lavrov, D. V.;& Burger, G. (28. 11 2004). Mitochondrial Genome, Evolution. *Encyclopedia of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/B0-12-443710-9/00717-1>
- Li, C.;& Wang, W. (2013). *High efficient treatment of citric acid effluent by Chlorella vulgaris and potential biomass utilization*. Bioresource Technology.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.074>
- Li, X.;Li, W.;Zhang, J.;Wei, H.;& Wang, Q. (2019). *Effect of ammonium nitrogen on microalgal growth, biochemical composition and photosynthetic performance in mixotrophic cultivation*. Chongqing University, Key Laboratory of the Three Gorges Reservoir Region's Eco-Environment. Chongqing: Bioresource Technology.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.042>
- Lin, K.-C.;& Yang, Z. (1991). *Technical review on the UASB process*. Routledge.  
 doi:[10.1080/00207239108710695](https://doi.org/10.1080/00207239108710695)

- Liu, S.;Cao, L.;Xu, F.;Yang, L.;Li, Y.;& Inalegwu, O. S. (2021). Integration of algae cultivation to anaerobic digestion for biofuel and bioenergy production. *Advances in Bioenergy*(6).  
<https://doi.org/10.1016/bs.aibe.2021.06.002>
- Lu, Q.;Zhou, W.;Min, M.;Ma, X.;Chandra, C.;Doan, Y. T.;. . . Ruan, R. (12 2015). Growing *Chlorella* sp. on meat processing wastewater for nutrient removal and biomass production. *Bioresource Technology*(198), 189-197.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.133>
- Luoma-aho, K. (2018). *Kiertotalous käytännössä – sivuvirroista kannattavaa liiketoimintaa*.  
<https://afry.com/fi-fi/artikkeli/kiertotalous-kaytannossa-sivuvirroista-kannattavaa-liiketoimintaa>
- Maltsev, Y.;Maltseva, K.;Kulikovskiy, M.;& Maltseva, S. (2021). *Influence of Light Conditions on Microalgae Growth and Content of Lipids, Carotenoids, and Fatty Acid Composition*. doi:[10.3390/biology10101060](https://doi.org/10.3390/biology10101060)
- Masojidek, J.;& Torzillo, G. (2014). Mass cultivation of freshwater microalgae. Teoksessa *Earth systems and environmental sciences* (ss. 2226-2235).  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.09373-8>
- Mathieu-Rivet, E.;Mati-Baouche, N.;Walet-Balieu, M.-L.;Lerouge, P.;& Bardor, M. (17. 12 2020). N- and O-Glycosylation Pathways in the Microalgae Polyphyletic Group. *Plant Glycobiology*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.609993>
- Mercier, L. (2018). *Nutrient uptake, growth, protein production and cobalamin accumulation of Euglena gracilis in baker's yeast production wastewater*. Helsingin yliopisto.  
<http://hdl.handle.net/10138/299026>
- Merlo, S.;Durany, X. G.;Tonon, A. P.;& Rossi, S. (14. 5 2021). Marine Microalgae Contribution to Sustainable Development. 1-6,11-15. doi:<https://doi.org/10.3390/w13101373>
- Micropia, A. (2015). *Chlorella vulgaris. Chlorella vulgaris, common cell with great potential*.  
<https://www.micropia.nl/en/discover/microbiology/chlorella-vulgaris/>
- Morais, M. G.;Prates, D. d.;Moreira, J. B.;Duarte, J. H.;& Costa, J. A. (1. 2 2018). Phycocyanin from Microalgae: Properties, Extraction and Purification, with Some Recent Applications. *Industrial Biotechnology*. <https://doi.org/10.1089/ind.2017.0009>
- Mullai, P.;Vishali, S.;Yogeswari, M.;Lopez, M. E.;& Rene, E. R. (2020). *Resource Recovery from Wastes (Osat/vuosik. 2-Methane production and recovery from wastewater)*. ScienceDirect. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64321-6.00002-1>

- Mureed, K.;Kanwal, S.;Hussain, A.;Noureen, S.;Hussain, S.;Ahmad, S. A.;& Waqas, R. (2018). *Biodiesel production from algae grown on food industry wastewater*. Environmental monitoring and assessment. <https://doi.org/10.1007/s10661-018-6641-3>
- Nokkonen, S. (2017). *Tulevaisuuden valkuaisinnovaatiot*. Mikrolevät: [https://www.hamk.fi/wp-content/uploads/2018/08/Tietokortit\\_Mikrolev%C3%A4t.pdf](https://www.hamk.fi/wp-content/uploads/2018/08/Tietokortit_Mikrolev%C3%A4t.pdf)
- Olabi, A.;Shehata, N.;Sayed, E. T.;Rodriguez, C.;Anyanwu, R. C.;Russell, C.;& Abdelkareem, M. A. (2022). Role of microalgae in achieving sustainable development goals and circular economy. *Science of The Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158689>
- Panahi, Y.;Darvishi, B.;Jowzi, N.;Beiraghdar, F.;& Sahebkar, A. (2016). *Chlorella vulgaris; A Multifunctional dietary supplement with diverse medicinal properties*. National library of medicine. doi:[10.2174/1381612822666151112145226](https://doi.org/10.2174/1381612822666151112145226)
- Panahi, Y.;Khosroushahi, A. Y.;Sahebkar, A.;& Heidari, H. R. (2019). *Impact of cultivation condition and media content on Chlorella vulgaris composition*. Advanced pharmaceutical bulletin. doi:[10.15171/apb.2019.022](https://doi.org/10.15171/apb.2019.022)
- Patel, A. K.;Albarico, F.;Perumal, P. K.;Vadrade, A. P.;Nian, C.;Chau, H.;. . . Singhanian, R. R. (2022). *Valuable pigments from microalgae: phycobiliproteins, primary carotenoids, and fucoxanthin*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126910>
- Rebeca Gonçalves, d. M.;Alexsandra Frazão, d. A.;Raquel Pedrosa, B.;Dominick Spindola, C.;Vanessa Cristina de, S.;Ana Christina, B.-V.;. . . Ana Lúcia Figueiredo, P. (8 2018). *Chlorella vulgaris mixotrophic growth enhanced biomass productivity and reduced toxicity from agro-industrial by-products*. *Chemosphere*(204), 344-350. doi:[10.1016/j.chemosphere.2018.04.039](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.039)
- Rikkinen, J. (1999). *Leviä, sienii ja leväsieniä*. Helsingin Yliopistopaino.
- Roopnarain A., G. V. (2013). *Phosphorus limitation and starvation effects on cell growth and lipid accumulation in Isochrysis galbana U4 for biodiesel production*. Wits: Bioresour. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.092>
- Salbitani, G.;& Carfagna, S. (2021). *Ammonium Utilization in Microalgae: A Sustainable Method*. <https://doi.org/10.3390/su13020956>
- Server, P. i. (2015). *Selenastrum sp. Chlorophyceae: Chlorococcales: Oocystaceae, Selenastrum sp.* Protist information server. [http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/Chlorophyta/Selenastrum/sp\\_6b.html](http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/Chlorophyta/Selenastrum/sp_6b.html)

- Severo, I. A.;Deprá, M. C.;Zepka, L. Q.;& Jacob-Lopes, E. (2019). *Bioenergy with Carbon Capture and Storage*.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128162293000089>
- Sieracki, M. E. (13. 3 2019). Aquatic Flow Cytometry. *Encyclopedia of Ocean Sciences*.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.11058-9>
- Sitra. (12. 3 2019). *Tietoalusta tehostaa jätteiden ja sivuvirtojen käyttöä*.  
<https://www.sitra.fi/caset/tietoalusta-tehostaa-jatteiden-ja-sivuvirtojen-kayttoa/>
- Soccol, C. R.;Pandey, A.;& Larroche, C. (2013). *Fermentation processes engineering in the food industry* (1 p.)USA: Taylor & Francis Group.
- Stord Works. (2022). *Stordworkshop*. Noudettu osoitteesta Rendering Machine.  
<https://www.stordworkshop.com/complete-process/rendering-machine.html>
- Sudhanthiran, M. C.;& Perumalsamy, M. (2022). *Bioremediation of dairy industry wastewater and assessment of nutrient removal potential of Chlorella vulgaris*. Department of Chemical Engineering, National Institute of Technology.  
<https://doi.org/10.1007/s13399-022-03068-x>
- Supply, A. r. (2018). Spirulina. *Spirulina*. Algae research and supply.  
<https://algaeresearchsupply.com/products/spirulina-culture-arthrospira-platensis>
- Tikkanen, T. (1986). *Kasviplanktonopas* (1 p.). Suomen luonnonsuojelun tuki Oy.
- Tossavainen, M. (2018). *Microalgae - Platform for conversion of waste to high value products*. University of Helsinki.  
<https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/243959/Microalg.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Tutkimuseettinen neuvottelukunta. (2012). *Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen Suomessa*. <https://tenk.fi/fi/ohjeet-ja-aineistot/HTK-ohje-2012>
- Tutkimuseettinen neuvottelukunta. (2019). *Ihmiseen kohdistuvan tutkimuksen eettiset periaatteet ja ihmistieteiden eettinen ennakoarviointi Suomessa*.  
[https://tenk.fi/sites/tenk.fi/files/Ihmistieteiden\\_eettisen\\_ennakoarvioinnin\\_ohje\\_2019.pdf](https://tenk.fi/sites/tenk.fi/files/Ihmistieteiden_eettisen_ennakoarvioinnin_ohje_2019.pdf)
- Ummalyma, S. B.;& Singh, A. (2022). *Biomass production and phycoremediation of microalgae cultivated in polluted river water*. Institute of Bioresources and Sustainable Development (IBSD). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126948>

University of Helsinki. (2023). *Food materials science*.

<https://www.helsinki.fi/en/researchgroups/food-materials-science/research/side-streams-characterization>

USDA. (ei pvm). *Animal and Plant health Inspection Service*. Carcass Management Course Rendering Module:

[https://www.aphis.usda.gov/animal\\_health/carcass/docs/training/7-rendering.pdf](https://www.aphis.usda.gov/animal_health/carcass/docs/training/7-rendering.pdf)

Vainikainen, A. (18. 1 2017). *Elintarviketeollisuus hyödyntää sivuvirtansa tehokkaasti*.

<https://www.biotalous.fi/elintarviketeollisuus-hyodyntaa-sivuvirtansa-tehokkaasti/>

Vale, M. A.;Ferreira, A.;Pirnes, J. C.;& Gonçalves, A. L. (2020). CO2 capture using microalgae. *Advances in Carbon Capture*. University of Porto. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819657-1.00017-7>

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819657-1.00017-7>

Varshney, P.;Mikulic, P.;Vonshak, A.;Beardall, J.;& Wangikar, P. P. (15. 11 2014).

Extremophilic micro-algae and their potential contribution. *Bioresource Technology*,

36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.040>

W.Sanders, R. (23. 5 2022). Protists: Flagellates and Amoebae. *Encyclopedia of Inland*

*Waters*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819166-8.00079-7>

Wang, R.;Xue, S.;Zhang, D.;Zhang, Q.;Wen, S.;Kong, D.;. . . Gong, W. (11 2015). Construction and characteristics of artificial consortia of *Scenedesmus obliquus*-bacteria for *S. obliquus* growth and lipid production. *Algal Research*(12), 436-445.

<https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.10.002>

Wang, S.-K.;& Tian, Y.-T. (2018). Tofu whey wastewater is a promising basal medium for microalgae culture. *Teoksessa Bioresource Technology* (ss. 79-84).

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.012>

Wang, Y.;Guo, W.;Yen, H.-W.;Ho, S.-H.;Lo, Y.-C.;Cheng, C.-L.;. . . Chang, J.-S. (12 2015).

Cultivation of *Chlorella vulgaris* JSC-6 with swine wastewater for simultaneous nutrient/COD removal and carbohydrate production. *Bioresource Technology*(198),

619-625. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.067>

Wells, M. L.;Potin, P.;Craigie, J. S.;Raven, J. A.;Merchant, S. S.;Helliwell, K. E.;. . . Brawley, S. H. (2016). *Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our*

*understanding*. doi:[10.1007/s10811-016-0974-5](https://doi.org/10.1007/s10811-016-0974-5)

Wollmann, F.;Dietze, S.;Ackermann, J.-U.;Bley, T.;Walther, T.;Steingroewer, J.;& Krujatz, F.

(2019). *Microalgae wastewater treatment: Biological and technological approaches*.

Engineerin in life scienses. <https://doi.org/10.1002/elsc.201900071>

Xin, L.;Hong-ying, H.;& Yu-ping, Z. (2 2011). Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. *Bioresource Technology*(102), 3098-3102.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.055>

Yaakob, M.A.; Mohamed, R.M.; Al-Gheethi, A.; Gokare, R.A.;& Ambati, R.R. (2021) Influence of Nitrogen and Phosphorus on Microalgal Growth, Biomass, Lipid, and Fatty Aci Production: An Overview. doi:[10.3390/cells10020393](https://doi.org/10.3390/cells10020393)

Zahmatkesh Sasan, S. S. (2022). *RSM-D\_ optimal modeling approach for COD removal from low strength wastewater by microalgae, sludge, and activated carbon- case study Mashhad*. ScienceDirect. <https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2022.100110>

## Liite 1: Mikrolevien eri teollisuusalojen sivuvirtakasvatukset

Teollisuuden ala/Käytetty sivuvirta	Kasvatettu levä	Sivuvirran käsitteilyt ennen leväkasvatusta	Sivuvirran pitoisuus kasvatuksessa	Muuta huomioitavaa	Lämpötila °C	Valon voimakkuus	Valon määrä	alku pH	Kasvatusaika	Biomassan enimmäispitoisuus (g L <sup>-1</sup> ) /kasvupäivä	Spesifinen kasvunopeus eksponentiaalisen kasvuvaiheen aikana (d <sup>-1</sup> )	Biomassan tuottavuus (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Lähde
Juustonvalmistus, juustohera	<i>Chlorella vulgaris</i>	Juustohera steriloidiin 121°C/20min, samalla proteiinit denaturoituivat.	10g L <sup>-1</sup>	Mikstrofi	27	72 µmol/m <sup>2</sup> s	Jatkuva	6,8	14 pv	1,60 g L <sup>-1</sup> /12.pv	0,29 d <sup>-1</sup>	0,12 g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	(Gonçalves;Menegol;& Rech, 2019)
Maissin märkäjauhat, maissiviina (corn steep liquor)	<i>Chlorella vulgaris</i>	Maissiviinan pH säädettiin 8,0 KOH:lla, jonka jälkeen steriloidiin 121°C/20min	1 %	Mikstrofi	27	72 µmol/m <sup>2</sup> s	Jatkuva	6,8	14 pv	2,10 g L <sup>-1</sup> /10.pv	0,39 d <sup>-1</sup>	0,20 g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	(Gonçalves;Menegol;& Rech, 2019)
Sokeriruokoalkoholin valmistus, sokeriruokovinassi	<i>Chlorella vulgaris</i>	Ei mainintaa	2 %	Mikstrofi	27	72 µmol/m <sup>2</sup> s	Jatkuva	6,8	14 pv	0,77 g L <sup>-1</sup> /8.pv	0,34 d <sup>-1</sup>	0,09 g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	(Gonçalves;Menegol;& Rech, 2019)
Juustonvalmistus, juustohera	<i>Chlorella vulgaris</i>	Juustohera hydrolysoitiin ennen käyttöä	Ei mainintaa	Mikstrofi	30	70 µmol/m <sup>2</sup> s	Jatkuva	ei mainintaa	ei mainintaa	ei mainintaa	0,47 d <sup>-1</sup>	ei mainintaa	(Abreu;Fernandes;Vicente;Teixeira;& Dragone, 2012)
Makeisteollisuus, makeisvalmistuksen jätevesi	<i>Arthrospira (spirulina) platensis</i>	Natriumkarnaanaattia lisätty 13,5 g L <sup>-1</sup>	8,50 %	Ei mainintaa	25	Ei mainintaa	Jatkuva	ei mainintaa	15 pv	ei mainintaa	ei mainintaa	ei mainintaa	(El-Kassas;Heneash;& Hussein, 2015)
Meijeriteollisuus, meijerituotannon jätevesi	<i>Chlorella sorokiniana</i>	Ei mainintaa	100% (laimentamaton)	Mikstrofi	ei mainintaa	Ei mainintaa	ei mainintaa	ei mainintaa	ei mainintaa	2,00 g L <sup>-1</sup>	0,122 d <sup>-1</sup>	68,116 mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	(Hamidian & Zamani, 2022)
Meijeriteollisuus, meijerituotannon jätevesi	<i>Chlorella vulgaris</i>	Ei mainintaa	100% (laimentamaton)	Ei mainintaa	ei mainintaa	Ei mainintaa	Jatkuva	ei mainintaa	ei mainintaa	2,43 g/l	ei mainintaa	225g/l/d	(Sudhanthiran & Perumalsamy, 2022)
Melassin tuotanto, punajuurivinassi	<i>Spirulina platensis</i>	Ei mainintaa	Laimennettu, ei mainintaa pitoisuudesta	Ei mainintaa	ei mainintaa	Ei mainintaa	ei mainintaa	ei mainintaa	ei mainintaa	6,5 g L <sup>-1</sup>	ei mainintaa	ei mainintaa	(Coca;Barrocal;Lucas;Gonzales-Benito;& Garcia-Cubero, 2015)

Teollisuuden ala/Käytetty sivuvirta	Kasvatettu levä	Sivuvirran käsitteytynyt ennen leväkasvatusta	Sivuvirran pitoisuus kasvatuksessa	Muuta huomioitavaa	Lämpötila °C	Valon voimakkuus	Valon määrä	alku pH	Kasvatusaika	Biomassan enimmäispitoisuus (g L <sup>-1</sup> ) /kasvupäivä	Spesifinen kasvunopeus eksponentiaalisen kasvuvaiheen aikana (d <sup>-1</sup> )	Biomassan tuottavuus (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Lähde
Meijeriteollisuus, meijerituotannon jätevesi	<i>Chlorella vulgaris</i>	Ei mainintaa	100% (laimentamaton)	Mikrotrofi	28-32	200-220 µmol/ m <sup>2</sup> s	8h pimeää 16 valoa	7,4	10 pv	1,23 g/L /7.pv	ei mainintaa	ei mainintaa	(Choi, 2016)
Soijakastike tuotanto, soijakastikejäte	<i>Spirulina maxima</i>	soijakastikejätteen pH:ta säädetty	100% (laimentamaton)	Mikrotrofi	28	50 µmol/ m <sup>2</sup> s	Jatkuva	8	väh. 13 pv, ei suoraa mainintaa	1,984 g/l /13.pv	ei mainintaa	ei mainintaa	(Han & Zhou, 2021)
Lihanjalostus, lihanjalostuksen erivaiheiden jätevedet	<i>Chlorella sp.</i>	Kasvualustana käytettiin viiden eri lihankäsittelyvaiheen jätevesien sekoitusta. Jätevesi sentrifugoitiin ja siitä poistettiin kiinteät hiukkaset. Tämän lisäksi jätevesi steriloidtiin 121°C/30min	Ei mainintaa	Ei mainintaa	ei mainintaa	Ei mainintaa	ei mainintaa	ei mainintaa	ei mainintaa	0,657-1,538g/l	ei mainintaa	ei mainintaa	(Lu, ym., 2015)
Tislausprosessi, tislaamon jätevesi	<i>Spirulina sp.</i>	Ei mainintaa	100% (laimentamaton)	Ei mainintaa	ei mainintaa	ksenonvalo/auringonvalo	Jatkuva	ei mainintaa	ei mainintaa	ei mainintaa	0,42 d <sup>-1</sup>	ei mainintaa	(Krishnamoorthy;Manickam; & Muthukuruppan, 2019)
Tofun tuotanto, tofuhajätevesi	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	ei käsittelyä	60 %	Mikrotrofi	25	35µmol/ m <sup>2</sup> s	16h valoa 8h pimeää	ei mainintaa	14 pv	ei mainintaa	0,76 d <sup>-1</sup>	1,06 g/L/d	(Wang & Tian, 2018)
Elintarviketeollisuus, elintarviketeollisuuden jätevesi	<i>Cladophora sp. Ja Spyrogyra sp.</i>	Ei mainintaa	100% (laimentamaton)	Ei mainintaa	30	Ei mainintaa	Jatkuva	8	7 pv	ei mainintaa	ei mainintaa	ei mainintaa	(Mureed, ym., 2018)

Teollisuuden ala/Käytetty sivuvirta	Kasvatettu levä	Sivuvirran käsittelety ennen leväkasvatusta	Sivuvirran pitoisuus kasvatuksessa	Muuta huomioitavaa	Lämpötila °C	Valon voimakkuus	Valon määrä	alku pH	Kasvatusaika	Biomassan enimmäispitoisuus (g L <sup>-1</sup> ) /kasvupäivä	Spesifinen kasvunopeus eksponentiaalisen kasvuvaiheen aikana (d <sup>-1</sup> )	Biomassan tuottavuus (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Lähde
Elintarviketeollisuus, ruokatehtaan jätevesi	<i>Botryococcus sp.</i>	Ei mainintaa	100% (laimentamaton) ja 50%	Ei mainintaa	huone- lämpö	Auringon- valo	Luonnol- linen auringon- valon ja pimeyden vaihtelu	ei mainin- taa	15 pv	3,72*10 <sup>6</sup> solua/ml /12.pv (100%) 9,7*10 <sup>5</sup> solua/ml /13.pv (50%)	ei mainintaa	ei mainintaa	(Gani;Sunar;Matias-Peralta;& Latiff, 2016)
Kalankasvatuslaitos, kalankasvatusaltaan kiertovesi	<i>Selensastrum sp. ja euglena gracilis mix</i>	Kuhankasvatusaltaan kiertoveteen lisätty kuhankasvatusaltaiden lietettä	100% (laimentamaton)	Mikstrofi	20	250µmol/ m <sup>2</sup> s	16h valoa 8h pimeää	ei mainintaa	15 pv	1,29mg/ml	ei mainintaa	ei mainintaa	(Eskola, 2018)
Kalankasvatuslaitos, kalankasvatusaltaan kiertovesi	<i>Selensastrum sp. ja euglena gracilis</i>	ei käsitteletyä	100% (laimentamaton)	Mikstrofi	20	250µmol/ m <sup>2</sup> s	16h valoa 8h pimeää	Ei säädetty	20 pv	0,47 g L <sup>-1</sup>	ei mainintaa	ei mainintaa	(Tossavainen, 2018)
Hiivantuotanto, emävesi	<i>Euglena gracilis</i>	Emävesi suodatettu	10 %	Mikstrofi	25	200µmol/ m <sup>2</sup> s	16h valoa 8h pimeää	6	9 pv	800 solua/µ L <sup>-1</sup>	ei mainintaa	ei mainintaa	(Mercier, 2018)
Sitruunahappotuotanto, sitruunahappojätevesi	<i>Chlorella vulgaris</i>	Ei mainintaa	Laimennettu, ei mainintaa pitoisuudesta	auto- /heterotrofinen	ei mainintaa	Ei mainintaa	ei mainintaa	ei mainintaa	ei mainintaa	1,04 g L <sup>-1</sup>	ei mainintaa	ei mainintaa	(Li & Wang, 2013)

**Liite 2: Kuiva-ainemäärityksen tulokset**

Mikrolevien kuivapaino myös laskettiin vähentämällä mikrolevien kuivapaino kalaprosessiveden kuivapainosta. Alla olevan kaavan avulla.

$$\text{Kuivapaino ilman kalaprosessivettä} \left( \frac{g}{l} \right) = \left( \frac{\text{paino 2 (g)} - \text{paino 1 (g)}}{\text{tilavuus (ml)}} * 1000 \right) - \left( \left( \frac{\text{paino PW (g)} - \text{paino 3 (g)}}{\text{tilavuus (ml)}} * 1000 \right) * \text{Näytteen PW pitoisuus} \right)$$

paino 2 = Upokas + suodatuspaperi + näytteen paino

paino 1 = Upokas + suodatuspaperi paino

paino 3 = Upokas + suodatuspaperi paino (kontrollinäytteen upokkaan paino)

paino PW = Upokas + suodatuspaperi (kontrollinäytteen paino)

tilavuus = Näytteen pipetoitu määrä

PW= Kalaprosessivesi

Mikrolevien nolla päivät olivat tämän laskukaavan mukaan miinuksen puolella, koska kalaprosessiveden kuivapaino oli suurempi kuin mikrolevän kuivapaino.

*Euglena gracilis:*

0. PÄIVÄ								
Näyte	Pipetoitava määrä (ml)	Upokas + suodatin paino taarauksen jälkeen (g)	Upokas + suodatin+ näyte paino uunin jälkeen (g)	Kuiva-ainepitoisuus (g)	Keskiarvo (g)	Keskihajonta (%)	Kuivapaino ilman kalaprosessivettä (g/l)	kuivapaino (g/l)
A1-100%	25	54,6934	54,7799	0,0865	0,067	1,577	0,097	2,672
A2-100%	25	57,3484	57,3963	0,0479				
A3-100%	25	51,5826	51,6486	0,066				
B1-75%	20	29,5667	29,5963	0,0296	0,029	0,102	-0,501	1,43
B2-75%	20	27,3707	27,3979	0,0272				
B3-75%	20	29,223	29,252	0,029				
C1-50%	20	30,5842	30,5996	0,0154	0,016	0,045	-0,499	0,788
C2- 50%	20	29,7861	29,8016	0,0155				
C3-50%	20	28,5021	28,5185	0,0164				
D1-25%	10	28,9969	29,0045	0,0076	0,008	0,008	0,116	0,76
D2-25%	10	27,7709	27,7784	0,0075				
D3-25%	10	29,7676	29,7753	0,0077				
E1-0%	10	27,2393	27,2409	0,0016	0,002	0,037	0,157	0,157
E2-0%	10	29,9777	29,9797	0,002				
E3-0%	10	30,0121	30,0132	0,0011				
KO1-kontrolli	10	66,7259	66,75	0,0241	0,026	0,165		2,575
KO2- kontrolli	10	59,1392	59,1666	0,0274				

3. PÄIVÄ								
Näyte	Pipetoitava määrä (ml)	Upokas + suodatin paino taarauksen jälkeen (g)	Upokas + suodatin+ näyte paino uunin jälkeen (g)	Kuiva-ainepitoisuus (g)	Keskiarvo (g)	Keskihajonta (%)	Kuivapaino ilman kalaprosessivettä (g/l)	Kuivapaino (g/l)
A1-100%	10	29,0102	29,0379	0,0277	0,035	1,016	0,978	3,493
A2-100%	10	29,8326	29,8819	0,0493				
A3-100%	10	30,0532	30,0810	0,0278				
B1-75%	10	27,2734	27,3005	0,0271	0,03	0,305	1,019	2,95
B2-75%	10	32,8635	32,8911	0,0276				
B3-75%	10	31,8464	31,8802	0,0338				
C1-50%	10	29,0766	29,0934	0,0168	0,016	0,033	0,383	1,64
C2- 50%	10	37,1285	37,1445	0,016				
C3-50%	10	31,0468	31,0632	0,0164				
D1-25%	10	31,8494	31,8580	0,0086	0,009	0,097	0,285	0,913
D2-25%	10	32,5901	32,6006	0,0105				
D3-25%	10	30,2952	30,3035	0,0083				
E1-0%	10	30,6662	30,6702	0,004	0,004	0,029	0,36	0,36
E2-0%	10	31,2233	31,2266	0,0033				
E3-0%	10	35,1891	35,1926	0,0035				
KO1-kontrolli	10	32,5437	32,5692	0,0255	0,025	0,035		2,515
KO2- kontrolli	10	30,4399	30,4647	0,0248				

4. PÄIVÄ								
Näyte	Pipetoita va määrä (ml)	Upokas + suodatin paino taarauksen jälkeen (g)	Upokas + suodatin+ näyte paino uunin jälkeen (g)	Kuiva- ainepitoisuus (g)	Keskiarvo (g)	Keskihajonta (%)	Kuivapaino ilman kalaprosessi- vettä (g/l)	kuivapaino (g/l)
A1-100%	10	31,8002	31,8479	0,0477	0,031	1,242	0,888	3,073
A2-100%	10	29,9607	29,979	0,0183				
A3-100%	10	27,3722	27,3984	0,0262				
B1-75%	10	28,9974	29,0283	0,0309	0,037	0,926	2,091	3,73
B2-75%	10	28,5789	28,6293	0,0504				
B3-75%	10	29,787	29,8176	0,0306				
C1-50%	10	28,5002	28,5202	0,02	0,019	0,123	0,811	1,903
C2- 50%	10	29,7695	29,7893	0,0198				
C3-50%	10	27,5783	27,5956	0,0173				
D1-25%	10	29,5672	29,5758	0,0086	0,008	0,022	0,284	0,83
D2-25%	10	29,1564	29,1646	0,0082				
D3-25%	10	34,494	34,5021	0,0081				
E1-0%	10	30,737	30,7399	0,0029	0,002	0,033	0,243	0,243
E2-0%	10	27,7737	27,7759	0,0022				
E3-0%	10	30,0112	30,0134	0,0022				
KO1-kontrolli	10	28,5353	28,558	0,0227	0,022	0,085		2,185
KO2- kontrolli	10	30,584	30,605	0,021				

5.PÄIVÄ								
Näyte	Pipetoitava määrä (ml)	Upokas + suodatin paino taarauksen jälkeen (g)	Upokas + suodatin+ näyte paino uunin jälkeen (g)	Kuiva-ainepitoisuus (g)	Keskiarvo (g)	Keskihajonta (%)	Kuivapaino ilman kalaprosessivettä (g/l)	Kuivapaino (g/l)
A1-100%	10	29,0137	29,1003	0,0866	0,072	1,041	4,857	7,207
A2-100%	10	29,8384	29,9052	0,0668				
A3-100%	10	30,0561	30,1189	0,0628				
B1-75%	10	27,275	27,333	0,058	0,039	1,465	2,174	3,937
B2-75%	10	32,8683	32,8905	0,0222				
B3-75%	10	31,8489	31,8868	0,0379				
C1-50%	10	29,0797	29,0949	0,0152	0,015	0,078	0,295	1,47
C2- 50%	10	37,1295	37,1448	0,0153				
C3-50%	10	31,0482	31,0618	0,0136				
D1-25%	10	31,8523	31,8601	0,0078	0,008	0,034	0,179	0,767
D2-25%	10	32,5929	32,6009	0,008				
D3-25%	10	30,2978	30,305	0,0072				
E1-0%	10	30,6691	30,6728	0,0037	0,004	0,029	0,373	0,373
E2-0%	10	31,2266	31,23	0,0034				
E3-0%	10	35,1921	35,1962	0,0041				
KO1-kontrolli	10	32,5469	32,5711	0,0242	0,0235	0,0007		2,35
KO2- kontrolli	10	30,4418	30,4646	0,0228				

6. PÄIVÄ								
Näyte	Pipetoitava määrä (ml)	Upokas + suodatin paino taarauksen jälkeen (g)	Upokas + suodatin+ näyte paino uunin jälkeen (g)	Kuiva-ainepitoisuus (g)	Keskiarvo (g)	Keskihajonta (%)	Kuivapaino ilman kalaprosessivettä (g/l)	Kuivapaino (g/l)
A1-100%	5	54,6958	54,7535	0,0577	0,047	1,019	5,02	9,44
A2-100%	5	57,348	57,3985	0,0505				
A3-100%	5	51,5845	51,6179	0,0334				
B1-75%	5	29,4614	29,4839	0,0225	0,023	0,057	1,285	4,6
B2-75%	5	27,7905	27,8143	0,0238				
B3-75%	5	58,4424	58,4651	0,0227				
C1-50%	5	27,9399	27,9526	0,0127	0,015	0,172	0,73	2,94
C2- 50%	5	27,9341	27,951	0,0169				
C3-50%	5	34,0774	34,0919	0,0145				
D1-25%	5	36,3902	36,3989	0,0087	0,009	0,091	0,675	1,78
D2-25%	5	20,0909	20,0988	0,0079				
D3-25%	5	36,437	36,4471	0,0101				
E1-0%	5	26,0315	26,0359	0,0044	0,004	0,012	0,847	0,847
E2-0%	5	36,1177	36,1219	0,0042				
E3-0%	5	66,622	66,6261	0,0041				
KO1-kontrolli	5	66,7239	66,7472	0,0233	0,022	0,001		4,42
KO2- kontrolli	5	59,1238	59,1447	0,0209				

*S. obliquus:*

0. PÄIVÄ								
Näyte	Pipetoitava määrä (ml)	Upokas + suodatin paino taarauksen jälkeen (g)	Upokas + suodatin+ näyte paino uunin jälkeen (g)	Kuiva-ainepitoisuus (g)	Keskiarvo (g)	Keskihajonta (%)	Kuivapaino ilman kalaprosessivettä (g/l)	Kuivapaino (g/l)
F1-100%	20	29,7735	29,8217	0,0482	0,053	1,173	0,863	2,66
F2-100%	20	28,5819	28,6513	0,0694				
F3-100%	20	29,79	29,832	0,042				
G1-75%	20	28,5018	28,526	0,0242	0,024	0,041	-0,165	1,183
G2-75%	20	27,7778	27,8014	0,0236				
G3-75%	20	29,5692	29,5924	0,0232				
H1-50%	20	30,6196	30,635	0,0154	0,015	0,025	-0,142	0,757
H2-50%	20	28,5371	28,5519	0,0148				
H3-50%	20	34,6075	34,6227	0,0152				
i1-25%	20	27,3726	27,3802	0,0076	0,007	0,041	-0,096	0,353
i2-25%	20	30,5855	30,5921	0,0066				
i3-25%	20	58,4435	58,4505	0,007				
J1-0%	20	29,1779	29,1785	0,0006	0,0003	0,029	0,013	0,013
J2-0%	20	30,4417	30,4416	-1E-04				
J3-0%	20	33,4933	33,4936	0,0003				
KO3-kontrolli	20	30,131	30,1733	0,0423	0,036	0,635		1,798
KO4-kontrolli	20	30,0939	30,1235	0,0296				

3. PÄIVÄ								
Näyte	Pipetoita va määrä (ml)	Upokas + suodatin paino taarauksen jälkeen (g)	Upokas + suodatin+ näyte paino uunin jälkeen (g)	Kuiva- ainepitoisuus (g)	Keskiarvo (g)	Keskihajonta (%)	Kuivapaino ilman kalaprosessi- vettä (g/l)	Kuivapaino (g/l)
F1-100%	10	34,9556	35,0123	0,0567	0,056	0,252	3,218	5,583
F2-100%	10	33,5221	33,5745	0,0524				
F3-100%	10	31,8964	31,9548	0,0584				
G1-75%	10	33,5804	33,6134	0,033	0,027	0,424	0,946	2,72
G2-75%	10	20,0897	20,1153	0,0256				
G3-75%	10	30,5538	30,5768	0,023				
H1-50%	10	27,9397	27,976	0,0363	0,03	0,677	1,831	3,013
H2-50%	10	34,0763	34,097	0,0207				
H3-50%	10	51,5823	51,6157	0,0334				
i1-25%	10	57,3487	57,373	0,0243	0,025	0,021	1,862	2,453
i2-25%	10	27,2414	27,2662	0,0248				
i3-25%	10	26,0285	26,053	0,0245				
J1-0%	10	29,0117	29,0128	0,0011	0,001	0,021	0,107	0,107
J2-0%	10	34,077	34,0783	0,0013				
J3-0%	10	33,4968	33,4976	0,0008				
KO3-kontrolli	10	30,0131	30,0384	0,0253	0,024	0,165		2,365
KO4-kontrolli	10	29,0125	29,0345	0,022				

4. PÄIVÄ								
Näyte	Pipetoitava määrä (ml)	Upokas + suodatin paino taarauksen jälkeen (g)	Upokas + suodatin+ näyte paino uunin jälkeen (g)	Kuiva-ainepitoisuus (g)	Keskiarvo (g)	Keskihajonta (%)	Kuivapaino ilman kalaprosessivettä (g/l)	Kuivapaino (g/l)
F1-100%	10	27,5786	27,6147	0,0361	0,044	1,565	1,972	4,447
F2-100%	10	30,7398	30,8062	0,0664				
F3-100%	10	31,4586	31,4895	0,0309				
G1-75%	10	34,4966	34,5468	0,0502	0,05	1,053	3,19	5,047
G2-75%	10	32,4448	32,5083	0,0635				
G3-75%	10	28,9978	29,0355	0,0377				
H1-50%	10	29,9628	29,985	0,0222	0,025	0,905	1,293	2,53
H2-50%	10	29,4618	29,4994	0,0376				
H3-50%	10	29,3748	29,3909	0,0161				
i1-25%	10	30,0266	30,045	0,0184	0,019	0,051	1,241	1,86
i2-25%	10	31,7981	31,8174	0,0193				
i3-25%	10	27,7904	27,8085	0,0181				
J1-0%	10	31,5784	31,5795	0,0011	0,001	0,016	0,13	0,13
J2-0%	10	27,5819	27,5832	0,0013				
J3-0%	10	27,7881	27,7896	0,0015				
KO3-kontrolli	10	36,104	36,1258	0,0218	0,025	0,295		2,475
KO4-kontrolli	10	36,3797	36,4074	0,0277				

5. PÄIVÄ								
Näyte	Pipetoitava määrä (ml)	Upokas + suodatin paino taarauksen jälkeen (g)	Upokas + suodatin+ näyte paino uunin jälkeen (g)	Kuiva-ainepitoisuus (g)	Keskiarvo (g)	Keskihajonta (%)	Kuivapaino ilman kalaprosessivettä (g/l)	Kuivapaino (g/l)
F1-100%	10	54,6942	54,7551	0,0609	0,066	1,044	2,768	6,613
F2-100%	10	29,8333	29,914	0,0807				
F3-100%	10	30,0522	30,109	0,0568				
G1-75%	10	27,271	27,3183	0,0473	0,045	0,12	1,62	4,503
G2-75%	10	32,8602	32,9051	0,0449				
G3-75%	10	31,845	31,8879	0,0429				
H1-50%	10	29,077	29,1143	0,0373	0,038	0,392	1,921	3,843
H2-50%	10	37,1284	37,1721	0,0437				
H3-50%	10	31,0437	31,078	0,0343				
i1-25%	10	31,8497	31,8739	0,0242	0,026	0,223	1,685	2,647
i2-25%	10	32,5899	32,6156	0,0257				
i3-25%	10	30,2948	30,3243	0,0295				
J1-0%	10	30,6675	30,6679	0,0004	0,0006	0,016	0,06	0,06
J2-0%	10	31,2227	31,2235	0,0008				
J3-0%	10	35,1907	35,1913	0,0006				
KO3-kontrolli	10	32,5431	32,5681	0,025	0,0385	1,345		3,845
KO4-kontrolli	10	30,4387	30,4906	0,0519				

6. PÄIVÄ								
Näyte	Pipetoitava määrä (ml)	Upokas + suodatin paino taarauksen jälkeen (g)	Upokas + suodatin+ näyte paino uunin jälkeen (g)	Kuiva-ainepitoisuus (g)	Keskiarvo (g)	Keskihajonta (%)	Kuivapaino ilman kalaprosessivettä (g/l)	Kuivapaino (g/l)
F1-100%	4,35	20,0887	20,1518	0,0631	0,063	0,327	4,063	11,813
F2-100%	6	32,4462	32,513	0,0668				
F3-100%	6	29,4597	29,5185	0,0588				
G1-75%	6	31,4575	31,4908	0,0333	0,036	1,034	0,188	6
G2-75%	6	34,6072	34,657	0,0498				
G3-75%	6	32,5789	32,6038	0,0249				
H1-50%	5	29,0761	29,0943	0,0182	0,019	0,268	0,018	3,893
H2-50%	5	37,127	37,1502	0,0232				
H3-50%	5	31,0449	31,0619	0,017				
i1-25%	5	31,8485	31,8631	0,0146	0,015	0,039	1,016	2,953
i2-25%	5	32,5893	32,6037	0,0144				
i3-25%	5	30,2931	30,3084	0,0153				
J1-0%	5	30,6668	30,6672	0,0004	0,0006	0,016	0,12	0,12
J2-0%	5	31,2227	31,2233	0,0006				
J3-0%	5	35,1904	35,1912	0,0008				
KO3-kontrolli	5	32,5423	32,5643	0,022	0,039	1,675		7,75
KO4-kontrolli	5	30,4401	30,4956	0,0555				

*Spirulina maxima:*

0. PÄIVÄ								
Näyte	Pipetoitava määrä (ml)	Upokas + suodatin paino taarauksen jälkeen (g)	Upokas + suodatin+ näyte paino uunin jälkeen (g)	Kuiva-ainepitoisuus (g)	Keskiarvo (g)	Keskihajonta (%)	Kuivapaino ilman kalaprosessivettä (g/l)	Kuivapaino (g/l)
K1-100%	20	33,5797	33,6444	0,0647	0,043	1,726	0,594	2,469
K2-100%	10,5	33,5775	33,6001	0,0226				
K3-100%	20	33,5213	33,5617	0,0404				
L1-75%	20	30,0134	30,06	0,0466	0,035	1,11	0,33	1,737
L2-75%	20	31,5916	31,616	0,0244				
L3-75%	20	31,8042	31,8374	0,0332				
M1-50%	20	34,0776	34,096	0,0184	0,02	0,227	0,073	1,01
M2-50%	20	30,5544	30,5778	0,0234				
M3-50%	20	27,9343	27,9531	0,0188				
N1-25%	20	29,9619	29,9742	0,0123	0,011	0,105	0,127	0,596
N2-25%	11	28,5799	28,5872	0,0073				
N3-25%	20	27,7917	27,8019	0,0102				
O1-0%	20	30,0286	30,0355	0,0069	0,007	0,042	0,338	0,338
O2-0%	20	29,9784	29,9856	0,0072				
O3-0%	20	29,4597	29,4659	0,0062				
KO5-kontrolli	20	36,3858	36,4219	0,0361	0,038	0,14		1,875
KO6-kontrolli	20	36,105	36,1439	0,0389				

3. PÄIVÄ								
Näyte	Pipetoitava määrä (ml)	Upokas + suodatin paino taarauksen jälkeen (g)	Upokas + suodatin+ näyte paino uunin jälkeen (g)	Kuiva-ainepitoisuus (g)	Keskiarvo (g)	Keskihajonta (%)	Kuivapaino ilman kalaprosessivettä (g/l)	Kuivapaino (g/l)
K1-100%	10	20,0919	20,1326	0,0407	0,063	1,929	3,527	6,277
K2-100%	10	27,9397	27,9996	0,0599				
K3-100%	10	29,0126	29,1003	0,0877				
L1-75%	10	29,1546	29,1996	0,045	0,048	0,26	2,744	4,807
L2-75%	10	30,7408	30,791	0,0502				
L3-75%	10	34,4951	34,5441	0,049				
M1-50%	10	32,8662	32,8987	0,0325	0,031	0,341	1,718	3,093
M2-50%	10	28,9589	28,993	0,0341				
M3-50%	10	32,6765	32,7027	0,0262				
N1-25%	10	29,3717	29,3825	0,0108	0,011	0,076	0,419	1,107
N2-25%	10	31,4067	31,4188	0,0121				
N3-25%	10	32,4484	32,4587	0,0103				
O1-0%	10	31,4592	31,4669	0,0077	0,007	0,046	0,707	0,707
O2-0%	10	34,0021	34,009	0,0069				
O3-0%	10	30,7498	30,7564	0,0066				
KO5-kontrolli	10	36,4244	36,4519	0,0275	0,028	1,776 <sup>^</sup> -13		2,75
KO6-kontrolli	10	26,0289	26,0564	0,0275				

4. PÄIVÄ								
Näyte	Pipetoitava määrä (ml)	Upokas + suodatin paino taarauksen jälkeen (g)	Upokas + suodatin+ näyte paino uunin jälkeen (g)	Kuiva-ainepitoisuus (g)	Keskiarvo (g)	Keskihajonta (%)	Kuivapaino ilman kalaprosessivettä (g/l)	Kuivapaino (g/l)
K1-100%	10	20,0907	20,1584	0,0677	0,071	0,339	4,788	7,143
K2-100%	10	27,9418	28,0125	0,0707				
K3-100%	10	28,4305	28,5064	0,0759				
L1-75%	10	29,1628	29,1911	0,0283	0,042	1,12	2,474	4,24
L2-75%	10	30,7423	30,793	0,0507				
L3-75%	10	34,4995	34,5477	0,0482				
M1-50%	10	32,8655	32,8876	0,0221	0,021	0,121	0,906	2,083
M2-50%	10	28,9607	28,9819	0,0212				
M3-50%	10	32,6793	32,6985	0,0192				
N1-25%	10	29,3738	29,3873	0,0135	0,013	0,084	0,735	1,323
N2-25%	10	31,4116	31,4237	0,0121				
N3-25%	10	32,4488	32,4629	0,0141				
O1-0%	10	31,4594	31,4668	0,0074	0,007	0,12	0,66	0,66
O2-0%	10	27,774	27,7789	0,0049				
O3-0%	10	30,7508	30,7583	0,0075				
KO5-kontrolli	10	36,427	36,4489	0,0219	0,024	0,165		2,355
KO6-kontrolli	10	26,0306	26,0558	0,0252				

5. PÄIVÄ								
Näyte	Pipetoitava määrä (ml)	Upokas + suodatin paino taarauksen jälkeen (g)	Upokas + suodatin + näyte paino uunin jälkeen (g)	Kuiva-ainepitoisuus (g)	Keskiarvo (g)	Keskihajonta (%)	Kuivapaino ilman kalaprosessivettä (g/l)	Kuivapaino (g/l)
K1-100%	10	29,001	29,0783	0,0773	0,077	0,057	5,233	7,723
K2-100%	10	29,2227	29,3006	0,0779				
K3-100%	10	27,2418	27,3183	0,0765				
L1-75%	10	27,5799	27,6295	0,0496	0,055	0,47	3,636	5,503
L2-75%	10	32,5781	32,6371	0,059				
L3-75%	10	28,5063	28,5628	0,0565				
M1-50%	10	29,5705	29,5988	0,0283	0,032	0,509	1,965	3,21
M2-50%	10	27,3744	27,4031	0,0287				
M3-50%	10	27,7775	27,8168	0,0393				
N1-25%	10	30,5873	30,61	0,0227	0,025	0,147	1,854	2,477
N2-25%	10	30,6204	30,6464	0,026				
N3-25%	10	28,583	28,6086	0,0256				
O1-0%	10	29,7894	29,7974	0,008	0,008	0,031	0,757	0,757
O2-0%	10	32,5942	32,6015	0,0073				
O3-0%	10	29,7731	29,7805	0,0074				
KO5-kontrolli	10	27,7735	27,7994	0,0259	0,025	0,1		2,49
KO6-kontrolli	10	29,7423	29,7662	0,0239				

6. PÄIVÄ								
Näyte	Pipetoit ava määrä (ml)	Upokas + suodatin paino taarauksen jälkeen (g)	Upokas + suodatin+ näyte paino uunin jälkeen (g)	Kuiva- ainepitoisuus (g)	Keskiarvo (g)	Keskihajonta (%)	Kuivapaino ilman kalaprosessi- vettä (g/l)	Kuivapaino (g/l)
K1-100%	5	29,3397	29,3676	0,0279	0,027	0,091	1,853	5,413
K2-100%	5	32,8895	32,917	0,0275				
K3-100%	5	32,1325	32,1583	0,0258				
L1-75%	5	29,7854	29,807	0,0216	0,028	0,42	2,99	5,66
L2-75%	5	29,3721	29,4021	0,03				
L3-75%	5	29,9629	29,9962	0,0333				
M1-50%	5	30,7492	30,7628	0,0136	0,016	0,164	1,4	3,18
M2-50%	5	30,0262	30,0435	0,0173				
M3-50%	5	31,4063	31,4231	0,0168				
N1-25%	5	30,739	30,7538	0,0148	0,013	0,168	1,637	2,527
N2-25%	5	27,9303	27,9427	0,0124				
N3-25%	5	34,9533	34,964	0,0107				
O1-0%	5	31,8923	31,8979	0,0056	0,005	0,066	1,027	1,027
O2-0%	5	28,9593	28,9649	0,0056				
O3-0%	5	31,8005	31,8047	0,0042				
KO5-kontrolli	5	33,5198	33,5393	0,0195	0,018	0,17		3,56
KO6-kontrolli	5	30,553	30,5691	0,0161				

## Selenastrum:

0. PÄIVÄ								
Näyte	Pipetoit ava määrä (ml)	Upokas + suodatin paino taarauksen jälkeen (g)	Upokas + suodatin+ näyte paino uunin jälkeen (g)	Kuiva- ainepitoisuus (g)	Keskiarvo (g)	Keskihajonta (%)	Kuivapaino ilman kalaprosessi- vettä (g/l)	Kuivapaino (g/l)
P1-100%	20	34,002	34,0533	0,0513	0,063	1,175	-0,554	3,168
P2 -100%	20	27,5765	27,636	0,0595				
P3 -100%	20	29,4572	29,5365	0,0793				
Q1 -75%	20	31,5753	31,619	0,0437	0,038	0,025	-0,902	1,89
Q2 -75%	20	31,4543	31,4985	0,0442				
Q3 -75%	20	32,4439	32,4694	0,0255				
R1 -50%	20	29,7389	29,755	0,0161	0,016	0,022	-1,051	0,81
R2 -50%	20	34,6055	34,6215	0,016				
R3 -50%	20	27,9362	27,9527	0,0165				
S1 -25%	20	33,4952	33,5036	0,0084	0,008	0,036	-0,536	0,395
S2 -25%	20	27,7741	27,7818	0,0077				
S3 -25%	20	29,337	29,3446	0,0076				
T1 -0%	20	30,0244	30,027	0,0026	0,003	0,012	0,137	0,137
T2-0%	20	32,8869	32,8898	0,0029				
T3 -0%	20	28,502	28,5047	0,0027				
KO7-kontrolli	20	28,4279	28,505	0,0771	0,074	0,265		3,723
KO8-kontrolli	20	32,5749	32,6467	0,0718				

3. PÄIVÄ								
Näyte	Pipetoitava määrä (ml)	Upokas + suodatin paino taarauksen jälkeen (g)	Upokas + suodatin+ näyte paino uunin jälkeen (g)	Kuiva-ainepitoisuus (g)	Keskiarvo (g)	Keskihajonta (%)	Kuivapaino ilman kalaprosessivettä (g/l)	Kuivapaino (g/l)
P1-100%	10	29,9636	29,9897	0,0261	0,031	0,556	0,487	3,067
P2 -100%	10	27,9343	27,9728	0,0385				
P3 -100%	10	27,2427	27,2701	0,0274				
Q1 -75%	10	30,7484	30,7738	0,0254	0,029	0,635	0,942	2,877
Q2 -75%	10	33,5219	33,56	0,0381				
Q3 -75%	10	30,5538	30,5766	0,0228				
R1 -50%	10	29,2269	29,2543	0,0274	0,027	0,005	1,447	2,737
R2 -50%	10	29,3726	29,4	0,0274				
R3 -50%	10	31,8506	31,8779	0,0273				
S1 -25%	10	32,1325	32,1448	0,0123	0,012	0,046	0,568	1,213
S2 -25%	10	29,7857	29,7983	0,0126				
S3 -25%	10	34,9574	34,9689	0,0115				
T1 -0%	10	32,6782	32,6789	0,0007	0,002	0,064	0,16	0,16
T2-0%	10	29,9791	29,9811	0,002				
T3 -0%	10	30,0138	30,0159	0,0021				
KO7-kontrolli	10	31,8021	31,8261	0,024	0,026	0,18		2,58
KO8-kontrolli	10	27,7887	27,8163	0,0276				

4. PÄIVÄ								
Näyte	Pipetoitava määrä (ml)	Upokas + suodatin paino taarauksen jälkeen (g)	Upokas + suodatin+ näyte paino uunin jälkeen (g)	Kuiva-ainepitoisuus (g)	Keskiarvo (g)	Keskihajonta (%)	Kuivapaino ilman kalaprosessivettä (g/l)	Kuivapaino (g/l)
P1-100%	10	27,7724	27,8115	0,0391	0,068	2,065	4,147	6,827
P2 -100%	10	29,0082	29,0922	0,084				
P3 -100%	10	28,5818	28,6635	0,0817				
Q1 -75%	10	28,9624	29,0038	0,0414	0,042	0,275	2,16	4,17
Q2 -75%	10	31,8964	31,9433	0,0469				
Q3 -75%	10	31,4104	31,4472	0,0368				
R1 -50%	10	29,5684	29,5886	0,0202	0,019	0,085	0,56	1,9
R2 -50%	10	29,7739	29,7924	0,0185				
R3 -50%	10	20,0908	20,1091	0,0183				
S1 -25%	10	33,5794	33,5902	0,0108	0,01	0,042	0,367	1,037
S2 -25%	10	34,4966	34,5064	0,0098				
S3 -25%	10	29,7898	29,8003	0,0105				
T1 -0%	10	30,743	30,7444	0,0014	0,001	0,012	0,137	0,137
T2-0%	10	34,078	34,0792	0,0012				
T3 -0%	10	27,3803	27,3818	0,0015				
KO7-kontrolli	10	29,001	29,0274	0,0264	0,027	0,04		2,68
KO8-kontrolli	10	30,5859	30,6131	0,0272				

5. PÄIVÄ								
Näyte	Pipetoitava määrä (ml)	Upokas + suodatin paino taarauksen jälkeen (g)	Upokas + suodatin+ näyte paino uunin jälkeen (g)	Kuiva-ainepitoisuus (g)	Keskiarvo (g)	Keskihajonta (%)	Kuivapaino ilman kalaprosessivettä (g/l)	Kuivapaino (g/l)
P1-100%	10	27,7739	27,8757	0,1018	0,106	4,015	8,477	10,577
P2 -100%	10	29,0137	29,0724	0,0587				
P3 -100%	10	28,5816	28,7384	0,1568				
Q1 -75%	10	28,961	29,011	0,05	0,056	1,405	3,988	5,563
Q2 -75%	10	31,8959	31,974	0,0781				
Q3 -75%	10	31,4109	31,4497	0,0388				
R1 -50%	10	29,5704	29,5993	0,0289	0,033	0,599	2,233	3,283
R2 -50%	10	29,7711	29,7994	0,0283				
R3 -50%	10	20,0897	20,131	0,0413				
S1 -25%	10	33,5813	33,595	0,0137	0,014	0,143	0,835	1,36
S2 -25%	10	34,496	34,5113	0,0153				
S3 -25%	10	29,7899	29,8017	0,0118				
T1 -0%	10	30,7418	30,7434	0,0016	0,001	0,038	0,133	0,133
T2-0%	10	34,0774	34,0782	0,0008				
T3 -0%	10	27,3747	27,3763	0,0016				
KO7-kontrolli	10	29,004	29,0246	0,0206	0,021	0,04		2,1
KO8-kontrolli	10	30,5864	30,6078	0,0214				

6. PÄIVÄ								
Näyte	Pipetoitava määrä (ml)	Upokas + suodatin paino taarauksen jälkeen (g)	Upokas + suodatin+ näyte paino uunin jälkeen (g)	Kuiva-ainepitoisuus (g)	Keskiarvo (g)	Keskihajonta (%)	Kuivapaino ilman kalaprosessivettä (g/l)	Kuivapaino (g/l)
P1-100%	8	27,7725	27,838	0,0655	0,062	0,59	5,115	7,796
P2 -100%	8	29,015	29,0691	0,0541				
P3 -100%	8	28,5913	28,6588	0,0675				
Q1 -75%	8	28,9606	29,022	0,0614	0,056	0,46	5,002	7,013
Q2 -75%	8	31,8976	31,9498	0,0522				
Q3 -75%	8	31,411	31,4657	0,0547				
R1 -50%	8	29,5697	29,6028	0,0331	0,03	0,419	2,518	3,858
R2 -50%	8	29,7718	29,8063	0,0345				
R3 -50%	8	20,0906	20,1156	0,025				
S1 -25%	8	33,5804	33,5927	0,0123	0,012	0,142	0,767	1,438
S2 -25%	8	34,498	34,5075	0,0095				
S3 -25%	8	29,7889	29,8016	0,0127				
T1 -0%	8	30,7404	30,7412	0,0008	0,0006	0,039	0,079	0,079
T2-0%	8	34,0767	34,0768	1E-04				
T3 -0%	8	27,3733	27,3743	0,001				
KO7-kontrolli	8	29,0022	29,0226	0,0204	0,021	0,105		2,681
KO8-kontrolli	8	30,5843	30,6068	0,0225				

### Liite 3: NaOH valmistusohje

1 M NaOH liuksen valmistusohje:

1. Punnittiin 40 g natriumhydroksidia.
2. 100 ml mittapulloon laitettiin puoleenväliin RO-vettä, johon lisättiin natriumhydroksidia. Liuos sekoitettiin magneettisekoittimella.
3. Kun natriumhydroksidi oli liennut, lisättiin loput RO-vesi pullon merkkiviivaan asti.
4. Lopuksi vielä kertaalleen sekoitettiin NaOH liuos, jonka jälkeen liuos oli valmis käytettäväksi.

**Liite 4: Combo medium valmistusohje**

## COMBO medium valmistusohje

1. Lisättiin mittapulloon n. 900 ml RO-vettä. Mittapullon sisältöä sekoitettiin jatkuvasti eri komponenttien lisäämisen ajan.
2. Lisättiin mittapulloon komponentit 1–9 alla olevan taulukon mukaisessa järjestyksessä.

#	Component	Amount	Stock Solution Concentration	Final Concentration
1	NaNO <sub>3</sub> (Fisher BP360-500)	10 mL/L	85.01 g/L	10 mM
2	CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O (Sigma C-3881)	10 mL/L	36.76 g/L	2.5 mM
3	MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O (Sigma 230391)	10 mL/L	36.97 g/L	1.5 mM
4	NaHCO <sub>3</sub> (Fisher S 233)	10 mL/L	12.6 g/L	1.5 mM
5	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> •9H <sub>2</sub> O (Sigma 307815)	10 mL/L	28.42 g/L	1 mM
6	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Sigma P 3786)	1 mL/L	8.71 g/L	0.5 mM
7	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (Baker 0084)	10 mL/L	24 g/L	3.9 mM
8	KCl (Fisher P 217)	10 mL/L	7.45 g/L	1 mM
9	Algal Trace Elements Solution	10 mL/L		
10	Vitamin B12	1 mL/L		
11	Biotin Vitamin Solution	1 mL/L		
12	Thiamine Vitamin Solution	1 mL/L		
13	CR1 Soil	1 cc		

3. Kasvatusliuoksen pH säädettiin arvoon 7,8.
4. Mittapulloon lisättiin RO-vettä, kunnes tilavuus oli 1000 ml.

5. Kasvatusliuos kaadettiin säilöpulloon, jonka jälkeen se steriloidtiin autoklaavissa.
6. Steriloinnin jälkeen mittapulloon lisättiin vitamiiniseos, joka sisälsi yllä olevan taulukon komponentit 10–13. Vitamiinit lisättiin aseptisesti steriilien ruiskujen ja ruiskusuodattimien avulla kasvatusliuokseen.
7. Kasvatusliuos sekoitettiin ja varastoitettiin.