

NORSK INSTITUTT FOR VANNFORSKNING

Blindern

FREMDRIFTSRAPPORT

for delprosjekt under O-40/71-H

VEKSTHASTIGHET FOR ALGER -

EN PARAMETER TIL BEDØMMELSE AV RENSET AVLØPSVANN

Saksbehandler: Siv.ing. Heidi Steensland

Rapporten avsluttet 29. desember 1972

INNHOLDSFORTEGNELSE:

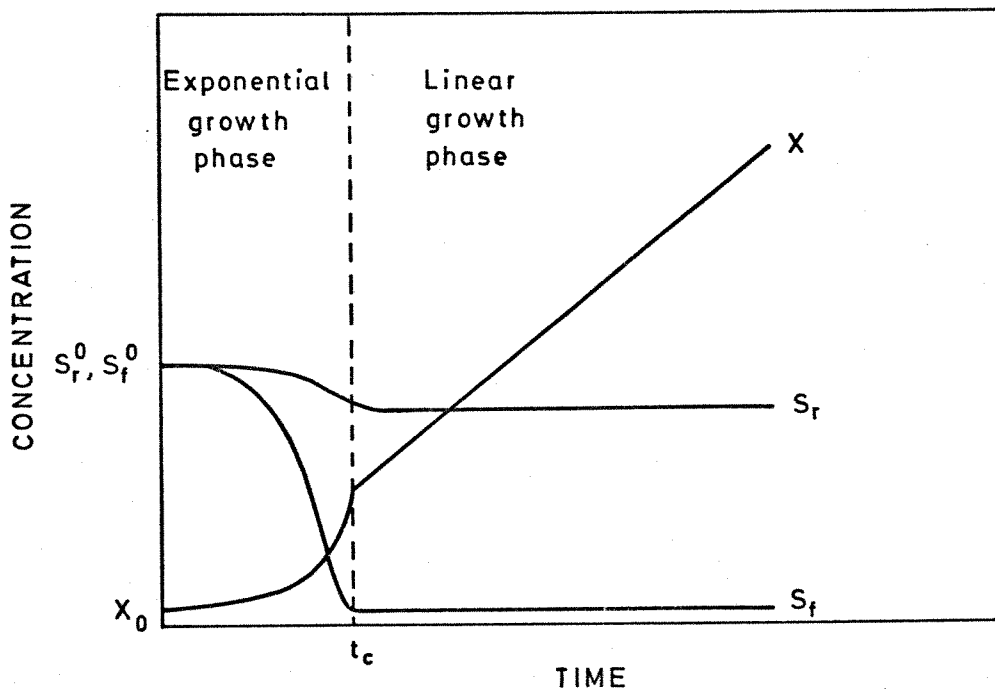
	Side:
1. SAMMENDRAG	3
2. KORTFATTET TEORETISK BAKGRUNN	4
3. INNLEDNING	6
4. METODIKK	7
4.1 Testalger	7
4.2 Lagring og oppdyrking av inokulum	8
4.3 Apparatur	9
4.4 Medium	12
4.5 Gjennomføring av et eksperiment	14
4.6 Rengjøring og skifting av slanger	16
5. RESULTATER	16
6. DISKUSJON	16
7. LITTERATUR	25
8. BILAG	
Bilag 1: Veksthastighet for alger - en parameter til bedømmelse av kvalitet av rensset avløpsvann	26
Bilag 2: Forskrift til fremstilling av næringsløsning Z_8	31
Bilag 3: Detaljerte måletall fra innledende forsøk	35
FORSØK 1	35
FORSØK 2	38
FORSØK 4	41

1. SAMMENDRAG

Rapporten omfatter teoretisk og praktisk bakgrunn for bruk av dialysekulturteknikk til testing av eventuell veksthemmende effekt på alger i rensset avløpsvann. Hovedvekten er lagt på beskrivelse av de forsøksbetingelser en er kommet frem til etter velvillige råd fra dr. Arne Jensen ved Institutt for marin biokjemi ved Norges tekniske høgskole (NTH). Preliminære resultater er gjengitt for å forklare bakgrunnen for de forsøksbetingelsene en er kommet frem til. Rapporten er med hensikt skrevet meget detaljert fordi prosjektet fra 1. januar 1973 overtas av en nyansatt forsker, siv.ing. Morten Laake, etter at undertegnede har sluttet ved Norsk institutt for vannforskning (NIVA).

2. KORTFATTET TEORETISK BAKGRUNN

Bruk av kunstige membraner for dyrking av mikroorganismer er en gammel teknikk. Alt i 1896 brukte Metchnikoff kolloidum-sekker inokulert med kolera-vibrioner som han plasserte i buken hos dyr for å vise at det eksisterte et diffunderbart koleratoxin. Teknikken har siden vært anvendt for forskjellige formål for dyrking av alger, bakterier, sopp, protozoer og vevs-celler (1). I de siste årene har dialysekulturteknikk vært anvendt av en forskergruppe ledet av dr. Arne Jensen ved Institutt for marin biokjemi ved NTH i Trondheim (2,3). I deres arbeider benyttes gjennomsiktige dialyseslanger av regenerert cellulose som vekstkar. Dette volumet er lite i forhold til reservoaret som dialyseslangene er nedsenket i (figur 2), og hvor en også har gjennomstrømning. Derved kan substratkonsentrasjonen i reservoaret betraktes som konstant. Et slikt system betegnes batch vekstkar, kontinuerlig reservoar. Den matematiske formuleringen av mikrobiell vekst i dette systemet er beskrevet av J.S. Schultz og P. Gerhardt (1) og konfirmert av Jensen og Rystad (3); dette skal gjengis kort nedenfor.



Veksten i dialyseslangen vil kunne ha et forløp som vist på figuren. Den første vekstfasen er den eksponentielle; celledettheten er så lav at konsentrasjonen av den vekstbegrensende næringskomponent er den samme på begge sider av membranen. Dermed vil Monods uttrykk for den spesifikke veksthastigheten være:

$$\frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} = \mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S_r}{K_s + S_r} \quad (\text{Se tegnforklaring nedenfor})$$

Etter hvert som celledettheten øker, vil den vekstbegrensende næringskomponenten ikke kunne diffundere raskt nok gjennom membranen. Konsentrasjonen i dialyseslangen vil avta, og kulturen vil gå over i en lineær vekstfase. Veksthastigheten vil da være gitt ved uttrykket:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{Y_X \cdot P_m \cdot A_m \cdot (S_r - S_f)}{V_f} - Y_E \cdot Y_X \cdot X$$

X = celledetthet

S_r = konsentrasjon av vekstbegrensende næringskomponent i reservoaret

S_f = konsentrasjon av vekstbegrensende næringskomponent i vekstkaret (dialyseslangen)

K_s = metningskonstant

Y_X = utbyttefaktor (mengde celler produsert/mengde substrat omsatt)

P_m = permeabilitetskonstant

A_m = arealet av membranen

V_f = volumet av vekstkaret (dialyseslangen)

Y_E = vedlikeholdskonstant (den del av det omsatte substrat som pr. tidsenhet går med til vedlikehold av cellene)

Om uttrykket $Y_E \cdot Y_X \cdot X$ er neglisjerbart (X er lav), blir uttrykket for veksthastigheten lineært:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{Y_X \cdot P_m \cdot A_m \cdot (S_r - S_f)}{V_f}$$

Om en antar at $S_f \approx 0$, er veksthastigheten direkte proporsjonal med konsentrasjonen av vekstbegrensende næringskomponent i reservoaret. Om denne er kjent, kan en ved å studere den lineære vekstfase finne mål for utbyttefaktoren, Y_X .

Når celletettheten har nådd et visst nivå, vil tilgangen på næring ikke kunne underholde vekst og $\frac{dX}{dt} = 0$. Dermed vil en kunne finne mål for Y_E :

$$Y_E = \frac{P_m \cdot A_m \cdot (S_r - S_f)}{X \cdot V_f}$$

For vårt spesielle formål er vi imidlertid først og fremst interessert i bestemmelse av veksthastighet i den logaritmiske vekstfase.

3. INNLEDNING

Dette delprosjektet kom i stand under planleggingen av programmet for forsøksstasjonen på Kjeller for 1972. Resultater fra renneforsøk sommeren 1971 indikerte at kjemisk rensset avløpsvann (aluminiumsulfat) kanskje kunne virke vekstretarderende på organismelivet i resipienten. For å undersøke dette nærmere ble det bestemt å undersøke veksthastighet hos alger i resipient tilblandet rensset avløpsvann under standardiserte forhold.

Under PRA-prosjektet vil ulike typer fellingsmidler bli testet (Al, Fe, Ca), eventuelt koblet sammen med andre rensemetoder; og det er av fundamental betydning at eventuelle vekstretarderende effekter ved slikt rensset avløpsvann klarlegges på bred basis.

Da man hadde fått kjennskap til at dialysekulturteknikk var tatt i bruk og anvendt i forurensningsproblematikken med stort hell av Arne Jensens gruppe i Trondheim, fant man det formålstjenlig å benytte samme teknikk for å teste eventuelle vekstretarderende effekter på en del fysiologisk forskjellige alger.

Det henvises videre til forskningsprogrammet for delprosjektet (bilag 1), der det også er redegjort for fremdriften av prosjektet.

Fordi metodikken måtte tilpasses en spesiell problemstilling, og fordi en her måtte ta i bruk ulike typer ferskvannsalger som ikke tidligere hadde vært dyrket i dialysekultur, ville innledende eksperimenter måtte bli ganske omfattende og dermed arbeidskrevende. Prosjektet er derfor for 1973 foreslått delvis støttet fra instituttets forskningsbudsjett eller fra MAB.

En anser det som heldig å vinne erfaring med dialysekulturteknikken slik den har tatt form fra forskergruppen i Trondheim. Denne gruppen har hittil anvendt teknikken for sjøvannsalger, mens en ved NIVA altså tar opp ferskvannsalger. Under fremføringen av dette konkrete prosjekt skulle en dermed bli i stand til å vurdere og eventuelt sette i gang en utvidet bruk av teknikken om den viser seg formålstjenlig.

4. METODIKK

4.1 Testalger

Etter innledende forsøk er en blitt stående ved følgende alger:

Selenastrum capricornutum Printz. Isolert fra Gjersjøen, Akershus, februar 1959.

Scenedesmus quadricauda (Turp.) Breo. Isolert fra Årungen, Akershus, juni 1964.

Oscillatoria agardhii var. *isothrix* Skuja. Isolert fra Gjersjøen, Akershus, oktober 1964.

Anabaena variabilis Kütz. NTHC 36. Isolert av dr. Ejdasilva, Bombay. (Isoleringssted foreløpig ukjent, men vil bli oppklart).

Asterionella formosa Hass. L244 fra dr. I.W. Lund, Freshwater Biological Association, Westmoreland, England.

4.2 Lagring og oppdyrking av inokulum

Lagring: Grønnalger og blågrønnalger overføres hver 14. dag og lagres på 100% Z_8 (4). Til Oscillatoriamediet tilsettes dobbelt mengde sporstoff. *Asterionella* overføres hver 14. dag og lagres på 10% Z_8 tilsatt 80 mg kaliumsilikat/l.

Lys: 2000 lux, 12 timer lys / 12 timer mørke.

Temperatur: 15°C.

Oppdyrking av inokulum for dialysekulturen. Ved oppdyrking av inokulum tas hensyn til to faktorer. Algene skal være i fysiologisk god form ved hovedeksperimentets start, dessuten skal den vekstbegrensende næringsfaktoren være brukt opp i mediet. I praksis vil dette si at algene dyrkes opp på moderat konsentrasjon av den aktuelle næringskomponent og høstes kort tid etter at den stasjonære vekstfase er nådd. En kan også lage seg tilnærmet stasjonære kulturer ved å overføre dem daglig før dialysekulturens start med 50% inokulum og 50% næringsmedium. Ved dyrking på fosfatbegrensende medium er 5% Z_8 med 1/4 fosfatmengde (50 µg/l) funnet å gi en passende tykk inokulumskultur.

Ved dyrking av algene i overskudd av næringskomponentene (for beregning av μ_{max}) er det bare tatt hensyn til at algene skal være fysiologisk aktive. Algene er da dyrket på 5% Z_8 og høstet mot slutt av logaritmiske vekstfase.

Forkulturene dyrkes opp i 100 ml stålkolber med 25 ml medium. Kolbene er utstyrt med et siderør for optisk måling av veksten. Kulturene står på rystebord ved 15°C med belysning fra "Osram hvitt lys" lysstoffrør med ca. 10000 lux i 18 t lys / 12 t mørke. Måling av optisk tetthet foregår ved 430 mµ.

4.3 Apparatur

Figurene 1-3 gjengir prinsippsskisser over apparatur og anordninger for opphenging av dialyseslangene.

Kar. Som vist på figur 1 benyttes 3 parallelle plastkar der det totale væskevolum i hvert kar er 35 liter. Overløp sørger for konstant væskevolum.

Medietilførsel. Kullfiltrert vann fra instituttets store kullkolonne i forsøkshallen tempereres til 12°C i et 200 liters plastkar utstyrt med varmeelement (3,3 + 1,7 kW), kontakttermometer og et kraftig røreverk (Parvalux, 184 rpm). Herfra pumpes vannet fra 3 parallelle uttak ved hjelp av 2 multifix slangepumper (MC 1000-M 850/2-M 848/gear 1:36) regulert til å gi 4 l/time (ca. 100 l/døgn). Disse kan reguleres, dels ved hjelp av hastighetsregulator, dels ved å endre lengden på det slangestykket som ligger inni pumpehuset. Silikonslange med 4 mm indre diameter benyttes. Slangestykket som ligger inni slangehuset, målt fra ytterpunktene for festeanordningen, er 19,2 cm. Det passer da med en hastighetsregulering på 82-85. Dette gir ca. 4 l/time, men reguleringen må fininnstilles ved hvert forsøks begynnelse og kontrolleres daglig. Vannhastighetsmåling skjer ved hjelp av skilletraktene (250 ml gradert volum). Konsentrert næringssaltløsning doseres også til skilletraktene og pumpes ved hjelp av en flerkanals Desagapumpe (DBGM, elektronisk modell) med slangetykkelse D og hastighetsinnstilling ca. 67. Hastigheten må også her finjusteres ved igangsetting av hvert forsøk.

Fra skilletraktene føres mediet ned i karet ved hjelp av to glassrør, ca. 1,5 m lange. Utløpet er plassert 5-10 cm over propellen til et røreverk (Heto, type RST4) med hastighet 1150 rpm.

Lys. Lyskilden er Phillips lysrør TL 40/55, 7800 lux, målt inne ved rotorakselen i tomt kar med den vinkelen på lysskiven som gir størst utslag. Lysstyrken er hittil målt med Panlux luxmeter. Lyset er regulert med 18 timer lys (kl. 0600 - 2400) og 6 timer mørke (kl. 2400 - 0600). Lyssrørene er montert som vist på figuren, med 5 stk. lysrør på siden av karet, 2 skrått over karet og 4 lysrør som ligger rett over karet i 55 cm avstand fra vannoverflaten. For å få

Fig.1 Prinsippskisse for dialysekultur-
apparat, NIVA's forsøksall 1972

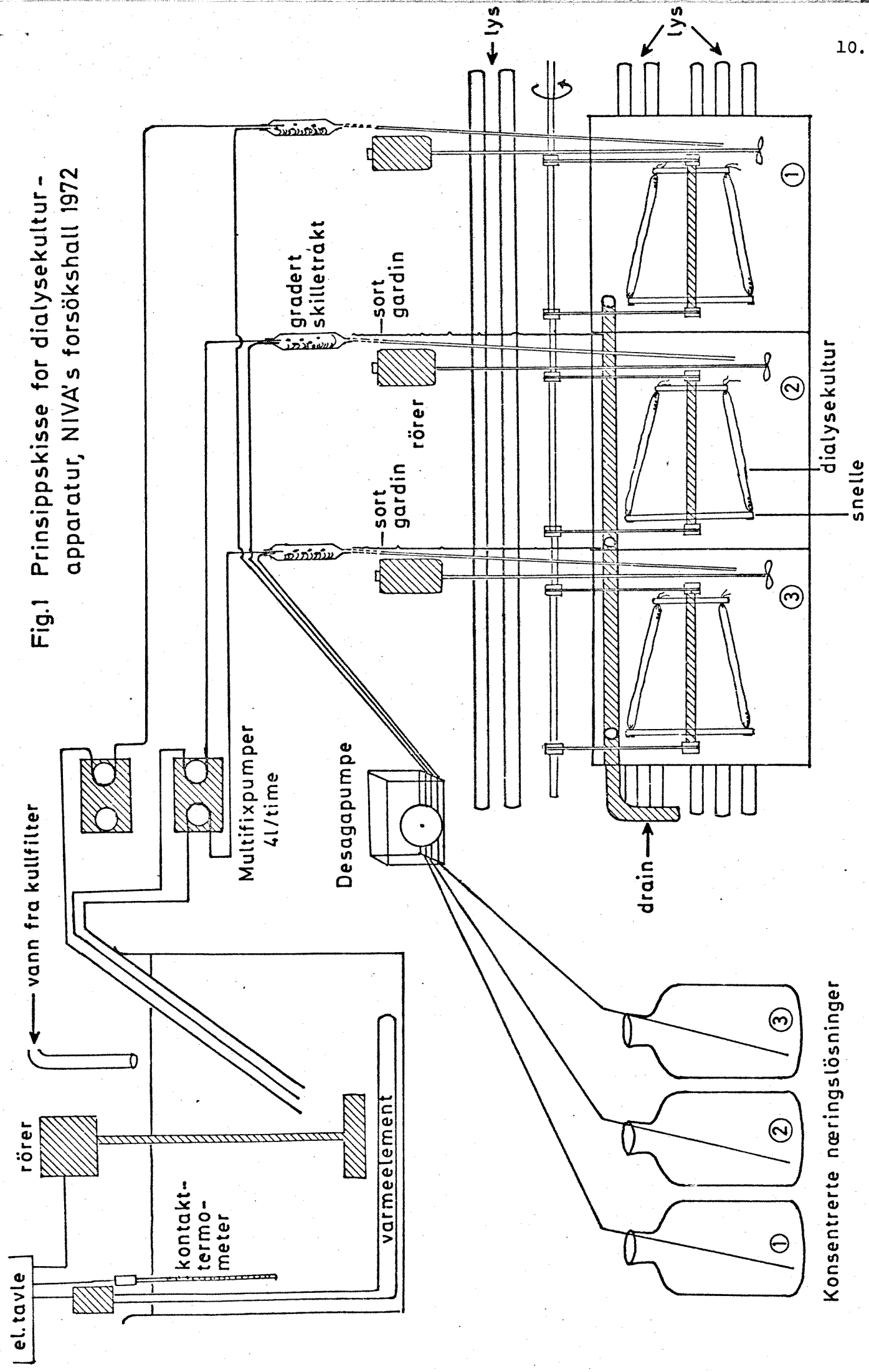


Fig.2 Prinsippskisse for dialysekar med snelle og dialyseslanger

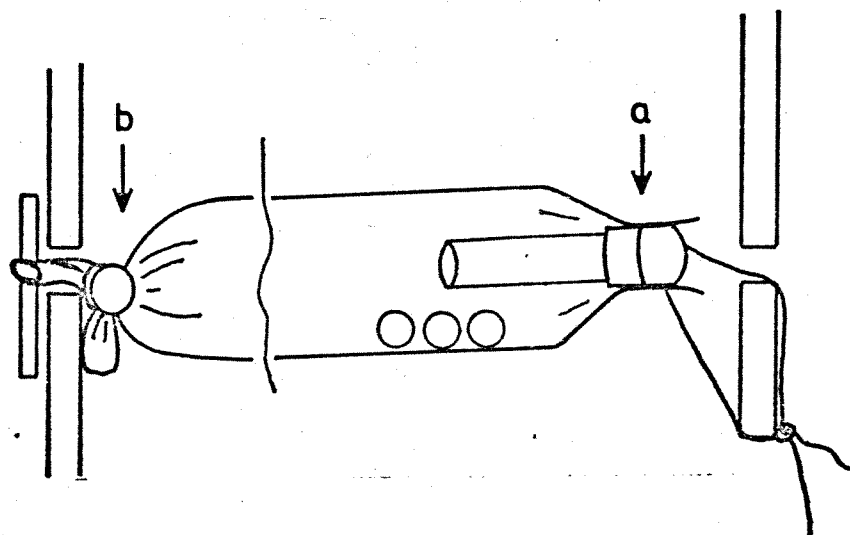
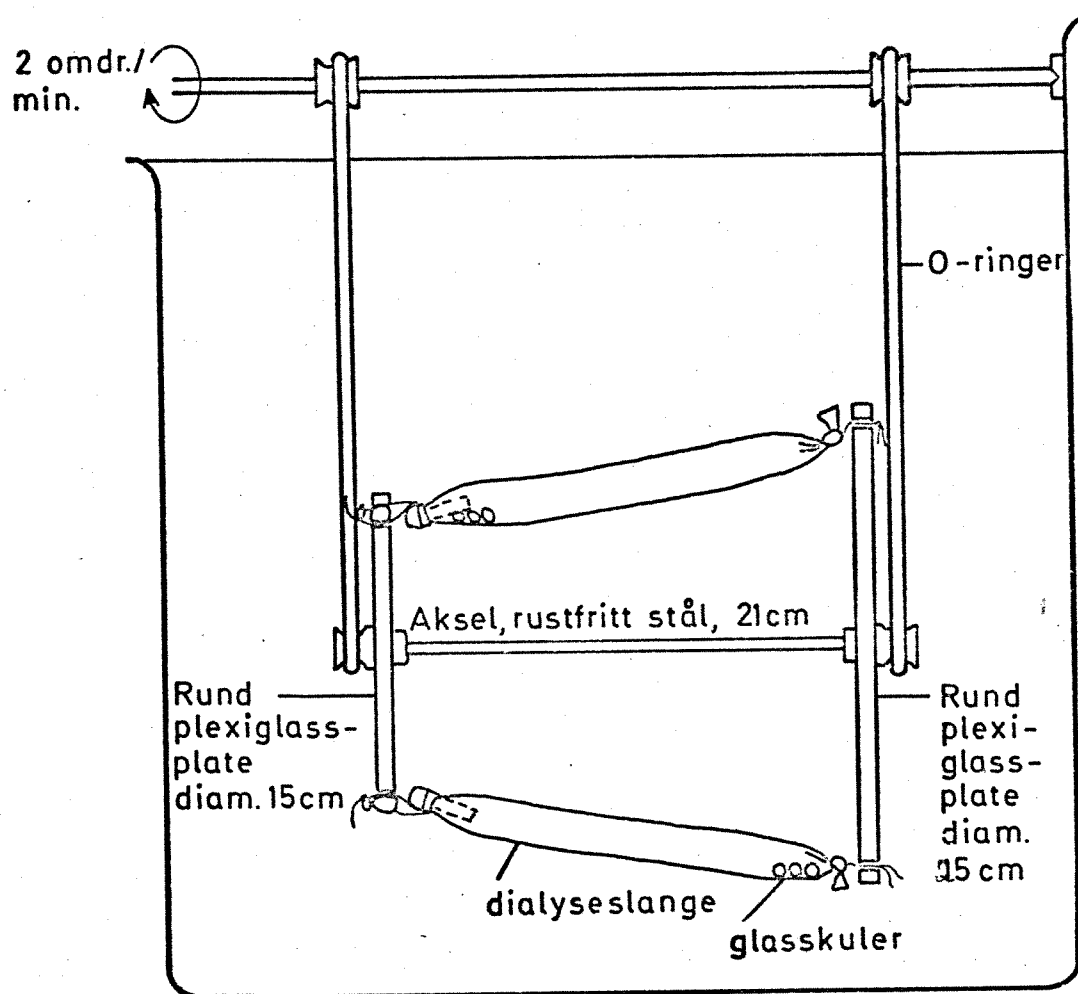


Fig.3 Prinsippskisse for opphenging av dialyseslange

- a. Anordning for sterilt prøveuttak
- b. Festeordning

samme lysstyrke i alle tre kar, er det satt opp en sort plastgardin vertikalt opp fra skilleveggene i karet (se figur 1). Dessuten er det satt et par sorte tape-strimler utenpå to av karveggene.

Rotor og sneller. Dialyseslangene er montert i sneller som roterer i karet, med dimensjoner som angitt på figur 2. Snellene er opphengt i O-ringer (21r = 80 cm) som er festet til spor i en lang stang. Stangen roterer ved hjelp av en rotor (Groschop & Co. D DM 90-60, Getrieb 1155:1) med 20 omdr./min. Snellene er laget av to plexiglass, skruer og aksel av rustfritt stål. I plexiglass-skivene er boret 12 hull for feste av slangene.

Feste av dialyseslanger. Figur 3 viser festeanordninger for dialyseslangene. I den ene enden er montert en anordning for sterilt prøveuttak. På et glassrør (ca. 4,5 mm indre diameter, 1,5 cm lengde) er festet en Millipore steriliseringshette (Cat. no. XX1104711). Den ene enden av dialyseslangen er tredd utenpå denne og festet med tykk, hvit sytråd (bjørnetråd) som knyttes tett rundt hetten og festes til den lille plexiglass-platen. 3 glasskuler, med 4-5 mm diameter, legges inni dialyseslangen og virker som røring i kulturen. I den andre enden knyttes to knuter, hvorpå slangen festes til den største platen ved hjelp av en liten gummistrikk og en liten glass-stav (figur 3).

4.4 Medium

Som standardmedium benyttes 5% løsning av Z_3 -medium (tabell 1, bilag 2). Fosfat- og nitratkonsentrasjonene fastsettes spesielt for hvert kar.

Tabell 1. Sammensetning av standardmedium, 5% Z₈.

<u>Komponent</u>	<u>Konsentrasjon, mg/l</u>
NaNO ₃	0 - 23,35
Ca(NO ₃) ₂ ·4 H ₂ O	0 - 2,95
K ₂ HPO ₄	0 - 1,55
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	1,25
Na ₂ CO ₃	1,05
FeCl ₃ ·6 H ₂ O	0,142
Fe.EDTA	0,37
Na ₂ WO ₄ ·2 H ₂ O	0,15 · 10 ⁻³
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·2 H ₂ O	0,4 · 10 ⁻³
KBr	0,6 · 10 ⁻³
KI	0,4 · 10 ⁻³
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	1,45 · 10 ⁻³
Cd(NO ₃) ₂ ·4 H ₂ O	1,25 · 10 ⁻³
Co(NO ₃) ₂ ·6 H ₂ O	1,25 · 10 ⁻³
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	1,15 · 10 ⁻³
NiSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ ·6 H ₂ O	1,45 · 10 ⁻³
Cr(NO ₃) ₂ ·7 H ₂ O	0,2 · 10 ⁻³
V ₂ O ₅	0,035 · 10 ⁻³
Al ₂ (SO ₄) ₃ K ₂ SO ₄ ·2 H ₂ O	2,35 · 10 ⁻³
H ₃ BO ₄	15,5 · 10 ⁻³
MgSO ₄	12,5 · 10 ⁻³

Mediet lages som 100% Z₈ med 25 ganger den ønskede konsentrasjonen av fosfat (eventuelt nitrat). Det autoklaveres ikke og lagres i kjølerom i 10 liters kolber.

4.5 Gjennomføring av et eksperiment

Et eksperiment bør fortrinnsvis startes på en mandag, slik at de neste 4 eller 5 ukedagene kan benyttes til målinger. Forkulturene må, som tidligere nevnt, være fysiologisk aktive og veksten begrenset av den næringsstoffkomponenten en vil undersøke. Kulturene fortynnes med sterilt medium av samme styrke som er tiltenkt under dialyseeksperimentet.

Under de innledende forsøkene ble det ikke funnet frem til eksakt riktig inokulumkonsentrasjon, men det antas at kulturene bør fortynnes ned til en beregnet optisk tetthet i området 0,01 - 0,02 (Hilger, 430 m μ). Beregnet som celledann/ml, skulle en anbefale at dette burde være ca. $5 \cdot 10^4$ for *Selenastrum* og 10^4 for *Scenedesmus*.

Igangsetting. Dialyseslangene (halve antallet av hva som trengs) kuttet opp i lengder på 60 cm. Tørre glass påmonteres steriliseringshetter, som igjen monteres i hver ende av dialyseslangene etter at disse er fuktet (figur 3). Ved bruk av ikke axeniske kulturer kokes dialyseslangene ca. 5 minutter i en EDTA-løsning (ca. 0,25 g/l) og skylles i 3xl liter destillert vann etterpå. Ved bruk av axeniske kulturer kan dialyseslangene autoklaveres på vanlig måte med litt EDTA og derpå skylles. Inokulering skjer ved at slangene kuttet i to, påfylles 35 ml algesuspensjon i hver del, som så knyttes igjen og monteres på sneller som to paralleller. Det ansees som en fordel å etterlate en liten luftboble i slangene; denne gir ytterligere sirkulasjon.

Mediene i dialysekarene må ha den riktige sammensetning fra start, derfor er trolig den beste fremgangsmåten å sette i gang gjennomstrømmingen i karet på fredag, slik at tilførselshastighetene har stabilisert seg over helgen.

Måling. Kulturene måles daglig på samme klokkeslett. Når optisk tetthet og prøver til analyse av organisk C tas ut, gjøres dette i følgende rekkefølge:

1. En snelle tas opp, tørkes med håndkle og stilles på bordet med steriliseringshettene opp. Denne enden tørkes med papirlommetørkle. Fra de homogent utseende kulturene tas så ut 2 ml ved hjelp av kanyle og injeksjonssprøyte (Steristar, 48 x 1,1 mm, hvit, og 2 ml ONCE injeksjonssprøyte) som overføres til tørkede kulturrør. Hvis veksten er klumpete, tas 2 ml ut, hvorpå en kan "homogenisere" kulturen ved å gni og klemme på slangen mellom tommelfinger og pekefinger med et papirlommetørkle. Derpå føres de 2 ml inn i slangen igjen, blandes med resten, og en homogen prøve tas ut.
2. Derpå avleses optisk tetthet fra alle slangene på snellen ved at gummistrikken i bunnen tas av, slangen tørkes med papirlommetørkle og puttes i kolorimeterholderen. Avlesning av optisk tetthet er vanskelig og krever trening. Det minste, stabile utslaget på kolorimeteret registreres, men det er viktig å påse at dialyseslangen har samme posisjon i holderen hver gang. Avlesninger av tynne kulturer blir unøyaktige, mens avlesninger over ca. 0,15 UOD viser seg å være pålitelige når kulturen er homogen. Slangene monteres på snellen igjen.
3. 2 ml medium av riktig styrke tilsettes ved hjelp av injeksjonssprøyten. En må derfor ha en serie kolber med slike injeksjonsløsninger sterilisert på forhånd (en for hver alge i hvert kar).

Snellen settes straks tilbake i karet etter hver måling. Måleoperasjonen må skje så raskt som mulig og bør ikke ta over $\frac{1}{2}$ time.

Det anbefales at veksten følges til en når stasjonære forhold, det vil si at celledmassen ikke øker lenger.

4.6 Rengjøring og skifting av slanger

Apparaturen rengjøres for hver forsøksserie. Karene tømmes og skrubbes med børste (ikke såpevann !), glassutstyr vaskes, og slangene renses for eventuelt humusbelegg. (Dette løsner bare en klemmer på utsiden). Slangebitene som ligger inni pumpehusene, skiftes for hvert forsøk. For Desagapumpen er det viktig at de 3 slangene ligger nær symmetrisk om valsen, slik at de får jevn belastning fra denne.

200 l-karet rengjøres når karveggene er dekket med humus.

5. RESULTATER

Figurene 4, 5 og 6 viser vekstforløpet under de 3 forsøkene som ble fullført. Bilag 3 gjengir detaljerte forsøksbetingelser, måletall og beregnet generasjonstid for forsøkene. Endelig gjengir tabell 2 en sammenfatning av generasjonstidene ved de tre forsøkene.

Som en vil se av resultatene, er bare *Selenastrum* og *Scenedesmus* tatt med. Ved forsøkene 1 og 2 ble også *Oscillatoria*, *Asterionella* og *Anabaena* forsøkt. De to førstnevnte algene vokste ikke, men *Anabaena* viste langsom, klumpete vekst. Måletallene for *Anabaena* ble dog ansett som for dårlige til å tas med i denne rapporten.

6. DISKUSJON

Under diskusjonen vurderes de tre forsøkene suksessivt slik at de forskjellige erfaringene og grunnene for endringer i forsøksbetingelser fremkommer.

Første forsøk viste at lysstyrken i dialysekaret var for lav, siden små forskjeller i denne gav forskjell i veksthastighet. Forsøket viste også at inokulumsmengdene var for lave ved denne veksthastigheten. Dette ga seg utslag i at dialyseslangene i flere tilfeller ble spist opp av cellulosenedbrytende bakterier før vekstperioden var slutt (7-13 dager etter start). Grunnen til at blågrønnalgene og diatomeen ikke vokste, ble på dette tidspunkt antatt å skyldes forskjell i vekstbetingelser hos forkulturer og dialysekulturer.

Fig.4 Vekstkurver for *Selenastrum* og *Scenedesmus* ved forsök 1, målt som UOD₄₃₀

Medium : 5% Z₈ tilsatt 26,6mg Na-silikat/l i springvann

Lys : 3200, 4000 og 3800 lux i 12t lys/12t mørke. Temp.: 20°

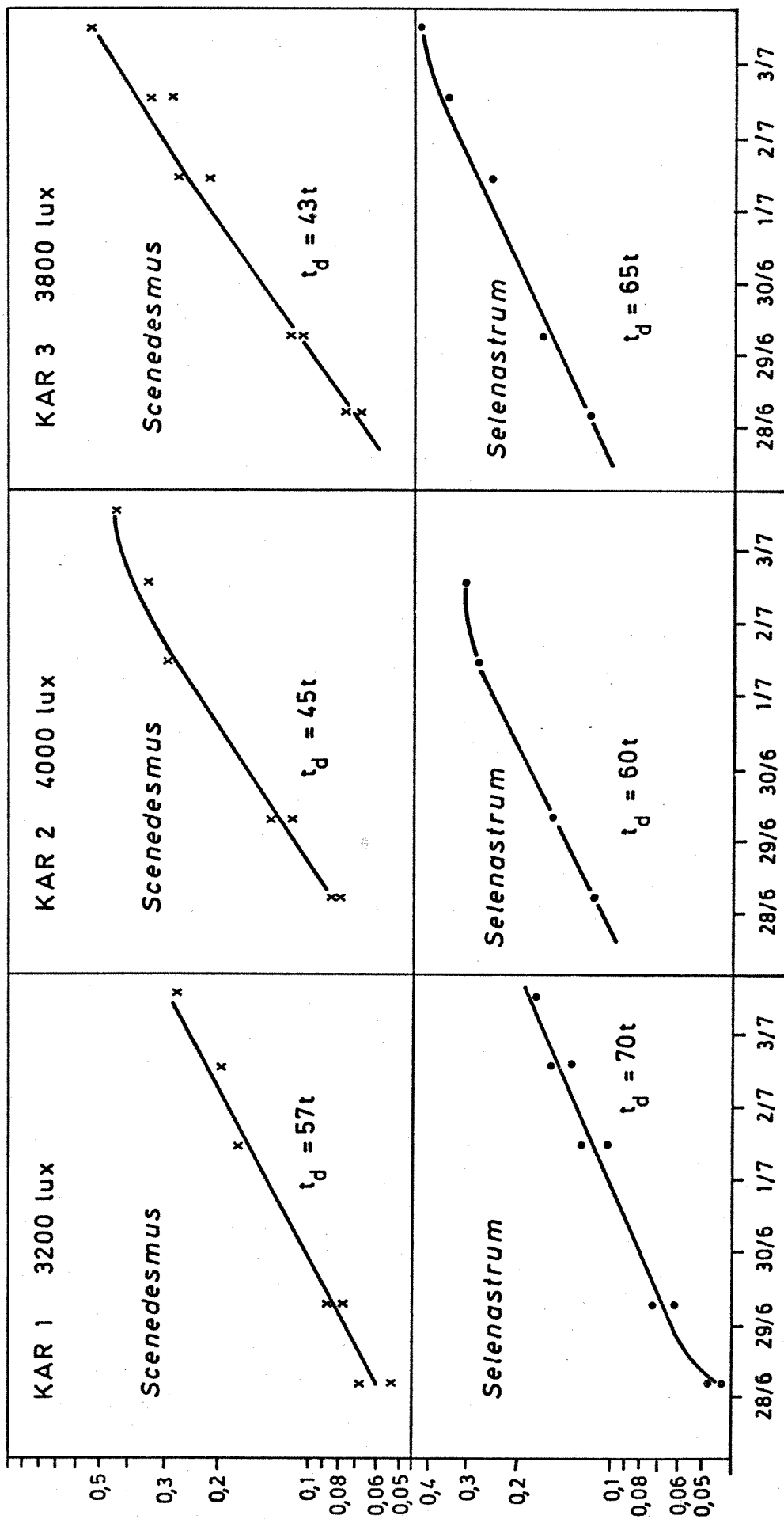


Fig.5 Vekstkurver for *Selenastrum* og *Scenedesmus* ved forsök 2, målt som OD_{430}

Medium: 5% Z_8 tilsatt 266 mg Na-silikat/l i springvann
 Lys: 7800, 9400 og 6000 lux i 18t lys/6t mørke. Temp.: 16-18°

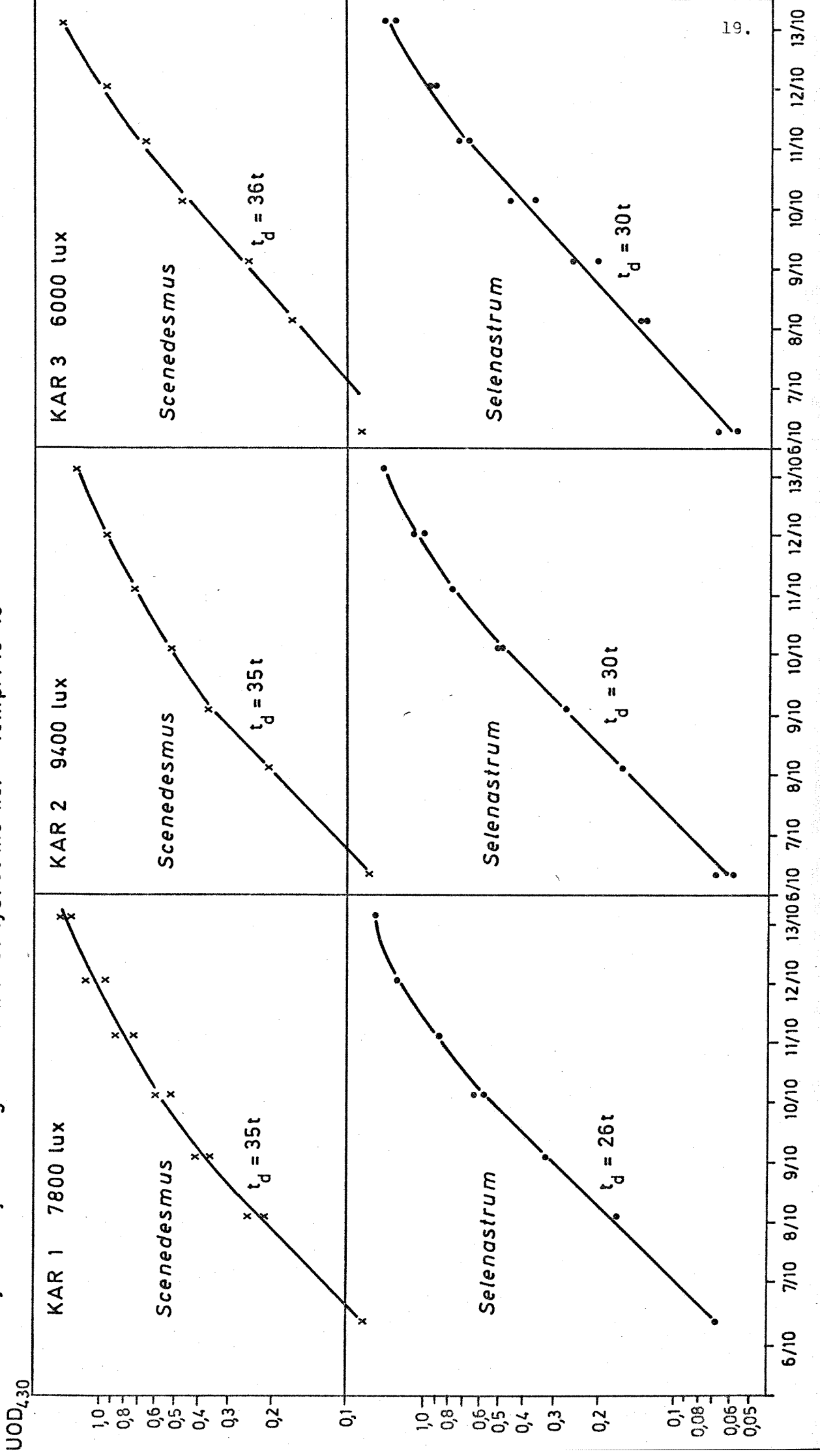


Fig.6 Vekstkurver for *Selenastrum* og *Scenedesmus* ved forsök 4, målt som org. C

Medium: 5% Z₈ tilsatt varierende mengder fosfat

Lys: 7800 lux i 18t lys/6t mörke. Temp.: 16-18°

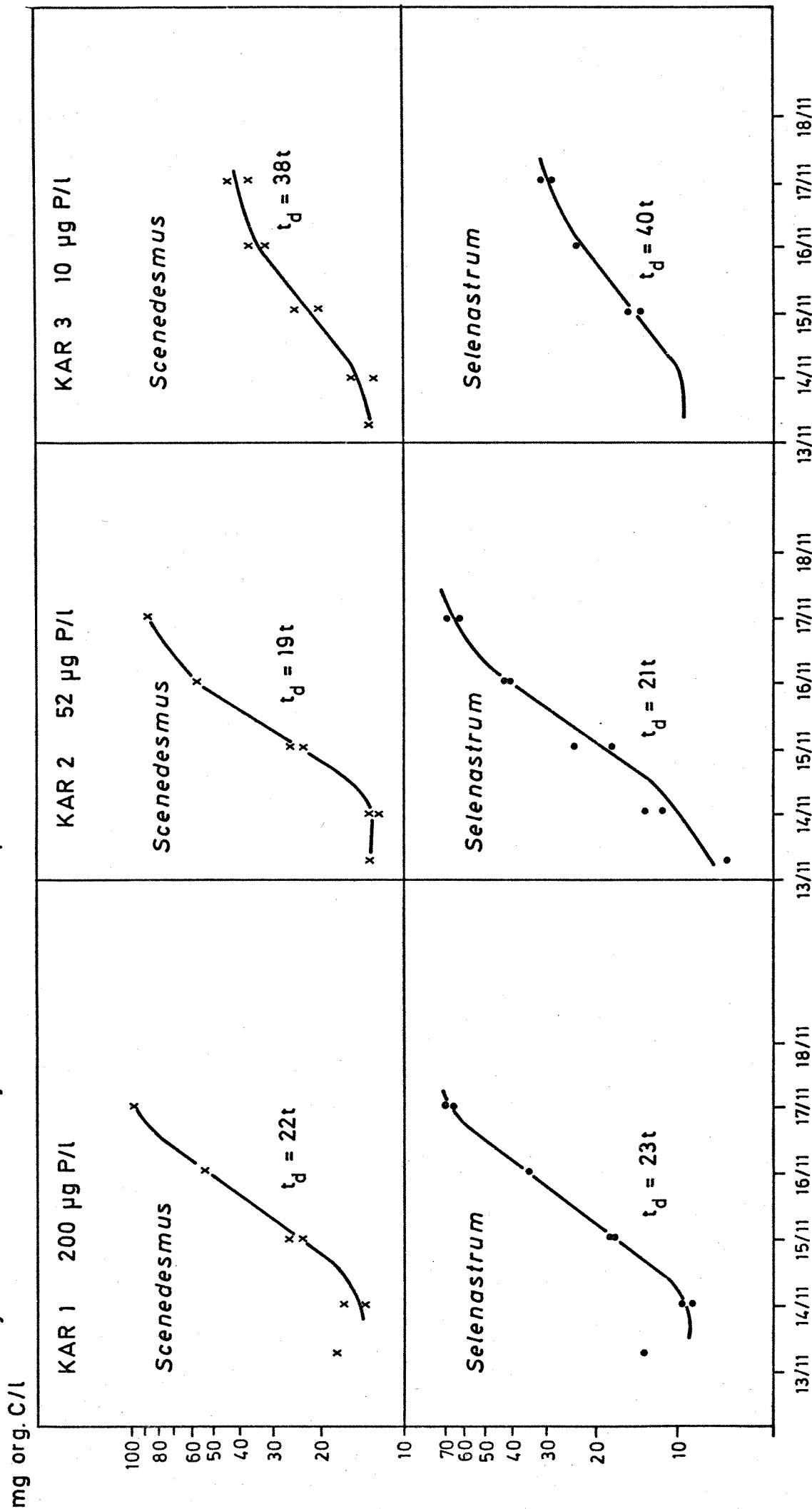
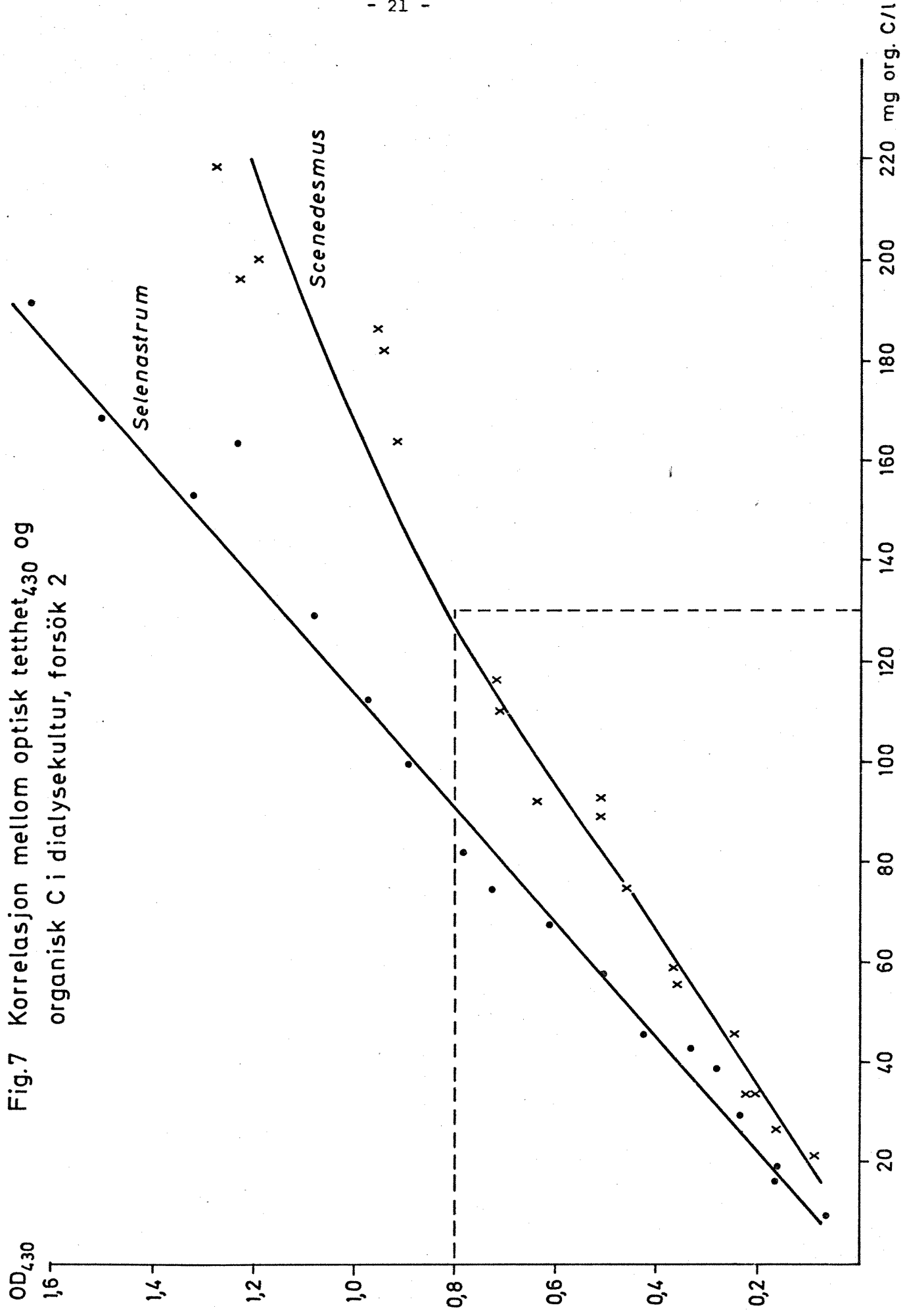


Fig.7 Korrelasjon mellom optisk tetthet₄₃₀ og organisk C i dialysekultur, forsök 2



Forut for forsøk 2 ble vekstkurver tatt opp for samtlige testalger under betingelser som best mulig skulle tilsvare forholdene i dialysekulturen (på lite gyngbord, 10 000 lux fra dagslysrør, 18 t lys/6 t mørke, temperatur = 16°). Det viste seg under denne perioden at de to grønnalgene kunne overføres og vokste reproduserbart, mens de tre andre algetypene var høyst ureproduserbare i sin vekst. Både varighet og lag-fasen veksthastigheten og celleutbyttet varierte sterkt. Dette fenomen ble tilskrevet konkurransen med bakteriene siden kulturene ikke var axeniske. En vil anta at forkulturens stadium ved overføring, samt rysting vil influere på konkurranseforholdet mellom bakterier og alger. Dette usikkerhetsmoment førte til at en anså det mest formålstjenlig å gå over til axeniske kulturer. Eventuell overgang til å benytte axeniske kulturer vil skje i samarbeid med dr. Jensens gruppe, idet de også er interessert i å utføre forsøk med de samme testalger, og har allerede fått tilsendt disse.

Ved forsøk 2 ble alle fem testalger inokulert igjen fra forkulturer som presumptivt skulle være i aktiv form (voksende kulturer). Inokulummengden ble øket; dermed gikk de to grønnalgene over i aktiv vekst uten forutgående lag-fase. Imidlertid var det bare ubetydelig vekst å spore av *Anabaena* og ingen vekst av *Oscillatoria* og *Asterionella*. Turbiditeten øket noe, men dette skyldtes bakterievekst. Det ble antatt at bakteriene dermed hadde "fått overtaket" og hemmet algekulturen.

For de to grønnalgene ble det vist god korrelasjon mellom målinger av optisk tetthet ved 430 m μ og organisk C (figur 7).

Med hensyn til lysstyrken gav 7800 og 9400 lux samme veksthastighet, mens 6000 lux gav antydning til lag-fase og reduksjon i veksthastighet for *Selenastrum*. Sammenliknet med veksthastigheten i batch (5% Z₈, 6000 lux i 24 timer og 20° på gyngbord), se tabell 2, var det innlysende at veksthastigheten i dialysekulturen var for lav (generasjonstiden for høy) - det vil si at veksten sannsynligvis var hemmet av en ukjent faktor. Det var nærliggende å tenke seg at denne faktoren måtte skrive seg fra springvannet og f.eks. skyldes restmengder av klor og organiske klorforbindelser; derfor ble forsøk 4 satt opp med

kullfiltrert vann. Som det fremgår av tabell 3, viste batchforsøk en fordobling av generasjonstiden i springvann, sammenliknet med destillert vann. Bruk av kullfiltrert vann viste samme veksthastighet som destillert vann.

Forsøk 4 viste en betydelig økning i veksthastighet (reduksjon i generasjonstid) for *Selenastrum* og *Scenedesmus* i dialysekultur med kullfiltrert vann, idet generasjonstiden respektivt gikk ned henholdsvis 18% og 37%. Enda ligger muligens generasjonstiden noe høyt, men lys og temperaturforhold er forskjellig fra batchforsøkene, slik at en sammenlikning er vanskelig. Forkulturene vokste imidlertid med en generasjonstid på 19 t for *Selenastrum* og 18 t for *Scenedesmus*, sammenliknet med henholdsvis 23 t og 22 t i dialysekultur. Det er meget mulig at den høye inokulumsmengden har bevirket at cellene for raskt gikk over i lineær vekstfase - slik at den beregnede generasjonstiden er for høy.

Forsøket viste også en raskere vekst i medium med 50 µg P/1 enn i 200 µg P/1, mens 10 µg P/1 tydelig ligger i K_s -området for de to grønnalgene. Her må imidlertid poengteres at inokulumsmengden kan ha vært for høy, og en råder til å senke denne til ca. 1/5 (til en beregnet $UOD_{430} = 0,01$). Dermed skulle en oppnå flere målepunkter for den logaritmiske vekstfasen, og sikrere bestemmelse av veksthastigheten.

Måletallene for forsøk 4 indikerer en viss nedgang i organisk stoff og optisk tetthet det første døgnet i dialysekulturene. Dette kan henge sammen med at inokulumscellene var "sultet" på fosfat og trengte et døgn for å tilpasse seg vekst igjen.

En vil foreslå at det neste forsøk utføres med mindre inokulumsmengde og med alle 5 algene. Det er etter resultatene av forsøk 4 å dømme meget mulig at inhiberingsfaktoren i springvannet har virket så sterkt på *Oscillatoria* og *Asterionella* og til dels på *Anabaena*, at dette har vært grunnen til vekststagnasjonen i dialysekulturene. Etter ett innledende forsøk med Z_8 foreslås et forsøk med rensset avløpsvann for å peile inn doseringsforholdet for dette. Det er mulig at en må dosere næringsløsning i tillegg til avløpsvann for å få riktig forhold mellom fosfatmengde og eventuelle veksthemmende stoffer i avløpsvannet når dette er kjemisk rensset.

Tabell 3. Generasjonstider for *Selenastrum* og *Scenedesmus* i batchkulturer med ulike vanntyper i mediet.

Vekstbetingelser	Vanntype	t_d	t_d
		Selenastrum	Scenedesmus
1 liter batch, 6 000 lux i 24 t, 20°, stort gyng- bord	Destillert vann	12 timer	10 timer
	Springvann	24 "	
	Kullfiltrert vann	12 "	
25 ml batch, 10 000 lux, 18 t lys/6 t mørke, 15°, lite gyngbord	Destillert vann	19 timer	18 timer

7. LITTERATUR

1. SCHULTZ, I.S., Gerhardt, P.: Dialysis Culture of Microorganisms; Design, Theory and Results.
Bact. Rev. 33, 1-47, 1969.
2. JENSEN, A., Rystad, B., Skoglund, L.: The use of Dialysis Techniques in Phytoplankton studies.
J. exp. marine biology and ecology 8, 241-248, 1972.
3. JENSEN, A., Rystad, B.: Semi-continous monitoring of the capacity of sea water for supporting growth of phytoplankton.
Innsendt for publikasjon.
4. SKULBERG, O.M.: Algal cultures as a means to assess the fertilizing influence of pollution.
Int. Conf. Wat. Pollut. Res., 3, Munich 1966.
Vol. 1. Wash., Water Pollution Control Federation,
pp. 113-127, 1967.

NORSK INSTITUTT FOR VANNFORSKNING

HeS/ibo
22.6.72

Blindern

Supplerende delprosjekt til forsøksanlegget på Kjeller:
Veksthastighet for alger - en parameter til bedømmelse
av kvalitet av rensset avløpsvann.

1. PROBLEMSTILLING

Til rensset avløpsvann må en generelt kunne stille det krav at utslipp i resipient ikke skal forårsake noen dyptgripende endring i de biologiske prosessene i resipienten.

Kommunalt avløpsvann er først og fremst rikt på vekststimulerende komponenter, derfor består rensing av dette i høygradig fjerning av organisk stoff og visse næringssalter. Mye tyder imidlertid på at alminnelig kommunalt avløpsvann samtidig inneholder veksthemmende stoffer. Ved bruk av kjemiske rensemetoder introduseres også kjemikalier (aluminium-, jern- eller Ca-salter) uten at en idag kjenner til den biologiske virkningen når avløpsvann med restmengder av kjemikaliene samt forurensninger i disse belastes resipienten.

For å kunne anbefale vidtgående bruk av en rens metode må det dog være en forutsetning at avløpsvannet ikke inneholder noen komponenter i slike konsentrasjoner at utslippet kan forårsake veksthemmende virkning på en eller flere av organismegruppene i det akvatiske samfunnet.

En forenklet måte å skaffe til veie kvantitative mål for veksthemmende (evt. vekststimulerende) virkning er å ta ut én gruppe av organismesamfunnet og teste utvalgte arter innen denne gruppen med hensyn til produksjonshastigheten ved forskjellige tilblandinger av rensset avløpsvann. Planktoniske primærprodusenter, det vil si planktoniske alger, har ofte tjent som en slik gruppe i liknende problemstillinger.

Produksjonshastigheten hos alger er en funksjon av konsentrasjonen av veksthastighetsbegrensende næringskomponent når dyrkningsbetingelsene ellers er tilrettelagt. Produksjonshastigheten i resipient tilblandet rensset avløpsvann skulle dermed være gitt ut fra konsentrasjonen av hastighetsbegrensende næringskomponent. Eventuelt avvik skulle indikere veksthemmende virkning.

Bruk av veksthastighet som parameter forutsetter definerte og konstante dyrkningsbetingelser. Dette vil si at næringskonsentrasjoner, lys, temperatur osv. må holdes konstante under dyrkningsperioden. Samtidig må de eksperimentelle betingelsene være slik at de simulerer forholdene i naturen så godt som mulig. Det vil si at næringskonsentrasjonene må ligge i det området en finner i resipienten, hvilket er mye lavere enn de som gjerne brukes i klassiske laboratorieeksperimenter med batchkultur. Dessuten er det viktig at vanntypene som brukes (resipientvann og rensset avløpsvann) ikke behøver noen forbehandling (autoklaving eller filtrering) som kan endre sammensetningen og dermed vekstegenskapene. Temperatur og lys må også velges innen de betingelser en finner i naturen.

2. UTFØRELSE

En teknikk som langt på vei imøtekommer ovenstående krav til eksperimentelle betingelser for måling av veksthastighet er den såkalte dialyse kulturteknikken (1), som i de senere år er tatt opp her i landet og tilpasset forurensningsproblematikken (2).

Ved denne teknikken (som forøvrig også kan anvendes for bakterier) dyrkes algene i dialyseslanger som roterer nedsenket i resipientvannet. Utvalgte testalger podes i dialyseslangene og får på denne måten vokse fysisk adskilt fra resipientvannet, mens næringsstoffene (alle stoffer med molvekt under 5 - 10.000) kan diffundere fritt gjennom dialysemembranen (altså noe nær en filtrering). Næringsstoffene holdes på et bestemt konsentrasjonsnivå under dyrkningsperioden ved hjelp av gjennomstrømning i dialysekaret. Prinsippet er vist på vedlagte figur.

Arbeidet bør fremføres i følgende trinn:

1. Utvelgelse av riktige testalger, oppbygning og utprøving av egnet apparatur. Krav til testalgene må være at de representerer alger med forskjellige vekstkrav (rentvannsalger og alger som finnes i forskjellige forurensede miljø), de må kunne vokse slik at de danner en homogen kultur i dialyseslangen, og de må ikke ha for lav maksimal veksthastighet. Apparaturen bygges slik at den er egnet for rutinearbeid.

2. Fastleggelse av de ulike testalgenes veksthastighet som funksjon av konsentrasjon av hastighetsbegrensende næringskomponent i et standardisert medium, og beregning av algenes metningskonstanter. Som hastighetsbegrensende næringskomponent undersøkes i første rekke fosfat, eventuelt også nitrat, og senere eventuelle næringskomponenter som kan antas å være hastighetsbegrensende i resipienten.
3. Testing av veksthastighet i ulike kvaliteter og konsentrasjoner av rensset avløpsvann. Korrelert med konsentrasjon av hastighetsbegrensende næringskomponent skal dette gi et kvantitativt mål for veksthemmende virkning. Denne parameter vil f.eks. kunne angis som

$$\% \text{ veksthemning} = \frac{100 \cdot (V_{sc_p} - V_{ac_p})}{V_{sc_p}}$$

der - V_{sc_p} er veksthastighet for en av testalgene i standardmedium med fosfat i konsentrasjon c_p som hastighetsbegrensende næringsfaktor.

- V_{ac_p} er veksthastighet for samme testalge i en konsentrasjon av avløpsvann der den hastighetsbegrensende fosfatkonsentrasjon er den samme som for standardmediet, c_p . % veksthemning for hver testalge bør kunne angis som funksjon av konsentrasjon av innblandet avløpsvann. Eventuell vekststimulans i forhold til standardmedium beregnes på liknende måte.

4. Supplerende forsøk med tilsats av hastighetsbegrensende næringskomponent til avløpsvann og måling av resulterende vekstøking. Også tilsats av ulike konsentrasjoner av fellingskjemikalier til avløpsvannsmedier evt. standardmedier, kan bli aktuelt, for dermed å teste kjemikalienes spesifikke virkning.

Ovenstående program skulle, så langt en kan resonnerer på det nåværende tidspunkt, kunne gi et nyansert bilde av hvordan virkning ulike typer rensset avløpsvann innblandet resipientvann kan ha på produksjon av forskjellige typer alger.

3. HITTIL UTFØRT ARBEID

Prosjektet er påbegynt, og noe arbeid utført. Det er funnet frem til følgende testalger, som etter innledende forsøk ser ut til å egne seg:

- a) diatomeen *Astrionella formosa* (innført fra dr. Lund, England, men også funnet lokalt dominerende i Mjøsa).
- b) blågrønnalgen *Oscillatoria agardhii* (isolert fra Gjersjøen).
- c) grønnalgen *Scenedesmus quadricauda* (isolert fra Årungen, Akershus).
- d) grønnalgen *Selenastrum capricornutum* (vanlig testalge i laboratoriet - isolert fra Gjersjøen).

Apparatur med tre parallelle dialysekar er bygget opp og delvis utprøvet med pumper, lys, temperaturregulering, røring og roterende sneller til festing av opptil 12 dialyseslanger. De tre karene kan opereres delvis uavhengig.

Som mål for algetetthet i kulturen håper en å kunne anvende optisk tetthet ved 430 m μ . I en innledningsperiode skal optisk tetthet korreleres med organisk karbon under vekstperioden.

4. ANDRE BRUKSOMRÅDER

Bruk av ovenstående teknikk har et meget vidt bruksområde. Den har allerede vist seg svært nyttig for vekstkinetiske studier i naturlige resipienter (Trondheimsfjorden (3)), og for fastleggelse av toleransegrenser for veksthemmende virkning av tungmetaller på alger i saltvann (3). Metoden kan nyttes til måling av veksthemmende effekter i alle typer resipientvann, eventuelt tilsatt ulike typer og konsentrasjoner av industrielt avløpsvann, naturfremmende stoffer osv.

Sist men ikke minst vil resultatene fra forsøk med standardmedia gi kunnskap om de individuelle algenes vekstfysiologiske krav, i form av verdier for metningskonstanter (Ks-verdier). Som en ser under avsnitt 3 er det valgt ut alger som har vid utbredelse i påvirkede norske vannforekomster. Dermed skulle slike kunnskaper kunne inngå som en verdifull del-informasjon i vassdragundersøkelser der disse algene dominerer.

5. LITTERATUR

1. Schultz, I. S., Gerhardt, P. (1969) Dialysis Culture of Microorganisms: Design, Theory and Results.
Bact. Rev. 33, 1-47.
2. Jensen, A., Rystad, B., Skoglund, L. (1972). The use of Dialysis Techniques in Phytoplankton studies.
J. exp. marine biology and ecology 8, 241-248.
3. Jensen, A. Institutt for marine biokjemi, NTH, personlig meddelelse.

NORSK INSTITUTT FOR VANNFORSKNING - 1969

Forskrift til fremstilling av næringsløsning Z 8

0. NÆRINGSLØSNINGENS SAMMENSETNING 100% Z₈

NaNO ₃	467,0	mg/l	
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	59,0	"	
K ₂ HPO ₄	31,0	"	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	25,0	"	
Na ₂ CO ₃	21,2	"	
Fe-komplexon	10,00 ml/l		(585,7 µg Fe/l, se punkt 1.6)
Sporstoffløsning	0,8	"	(se punkt 1.7)

1. STOFFER OG UTGANGSLØSNINGER:

Som utgangsstoffer skal benyttes "p.a. Merck" reagenser, eller andre merker med tilsvarende kvalitet.

1.1 NaNO₃:

46,700 g NaNO₃ løses opp i dest. vann og fortynnes til 1000 ml.
(Dosering: 10 ml/l).

1.2 Ca(NO₃)₂ · 4H₂O:

59,000 g Ca(NO₃)₂ · 4H₂O løses opp i dest. vann og fortynnes til 1000 ml. Ta ut av løsningen 100 ml og fortynn til 1000 ml.
(Dosering: 10 ml/l).

1.3 K₂HPO₄:

31,000 g K₂HPO₄ løses opp i dest. vann og fortynnes til 1000 ml. Ta ut av løsningen 100 ml og fortynn til 1000 ml. (Dosering: 10 ml/l).

1.4 MgSO₄ · 7H₂O:

25,000 g MgSO₄ · 7H₂O løses opp i dest. vann og fortynnes til 1000 ml. Ta ut av løsningen 100 ml og fortynn til 1000 ml. (Dosering: 10 ml/l).

1.5 Na₂CO₃:

21,200 g ("krystallvann-fri" evt. uttørket ved 110°C) Na₂CO₃ løses opp i dest. vann og fortynnes til 1000 ml. Ta ut av løsningen 100 ml og fortynn til 1000 ml. (Dosering: 10 ml/l).

1.6 "Fe-komplexon":

1.6.1 2,700 g FeCl₃ · 6H₂O (pulverisert før innveing). Innveing må foregå fort, fordi stoffet er hydroskopisk. Løses opp i 100 ml 0,1N HCl (faktor: 1,0).

Titriplex

1.6.2 3,722 g komplexon III løses opp i 100 ml 0,1 N NaOH (faktor: 1,0)

1.6.3 Ta ut 10,5 ml av FeCl₃ løsningen. Bruk 10 ml "Gold-Line" og 1 ml gradert "Gold-Melline" pipette, og tilsett en 1000 ml målekolbe. Tilsett ca. 500 ml dest. vann, og 10,0 ml komplexon III løsning. Fortynn til merket med dest. vann (dosering: 10 ml/l).

1.7 Sporstoffløsning etter Gaffron:

1.7.1 Vei inn følgende stoffer:

Na ₂ WO ₄ · 2H ₂ O	0,0660 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 2H ₂ O	0,1760 "
KBr	0,2380 "
KJ	0,1660 "
ZuSO ₄ · 7H ₂ O	0,5740 "
Cd(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	0,3080 "
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0,2920 "
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,2500 "
NiSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ · 6H ₂ O	0,3960 "
Cr(NO ₃) ₃ · 7H ₂ O	0,0740 "
Al ₂ (SO ₄) ₃ K ₂ SO ₄ · 24H ₂ O	0,9480 "

Stoffene løses opp i dest. vann og fortynnes til 1000 ml.

1.7.2 Vei inn følgende stoff:

V ₂ O ₅	0,0447 g
-------------------------------	----------

Stoffet løses opp i dest. vann og fortynnes til 1000 ml.

1.7.3 Vei inn følgende stoffer: H_3BO_3 3,100 g (evt. oppvarming i 100 ml vann) og $MnSO_4$ 2,230 g. Løs dem opp i dest. vann. Fortynn til 1000 ml.

1.7.4 Ta ut 50 ml av 1.7.1-løsningen, overfør til 1000 ml målekolbe, tilsett ca. 500 ml dest. vann. Deretter 20 ml av 1.7.2-løsningen og 100 ml av 1.7.3-løsningen, fortynn til 1000 ml. (Dosering: 0,8 ml/l).

1.8 CO₂-mettet vann

Ta ca. 10 l dest. vann. Bruk særskilt forberedt flaske. Blås gjennom "CO₂"-gass - 2 timer. Sett trykket på manometerets første merke, og la ved åpning av doseringsventilen trykket falle på 0,9. Hvis "CO₂"-mettet vann har stått mer enn 6 timer må det igjen innblåses CO₂-gass. (Dosering: 30 ml/l).

2. SAMMENSETNING

2.1

Doseringen av de enkelte løsninger må foregå fort. Det er derfor ønskelig å bruke en egen pipette (Gold-Line) for hver enkelt løsning. Vask godt både pipetter og målekolber. Pipettene må skylles med løsningene før tilsetningen begynner. Dypp ikke pipettene i original-løsningene. Bruk begerglass. Før innstillingen skal pipetten tørres av med rent filterpapir. Pass på at det ikke er løsning på pipettens utside.

2.2

Ta en målekolbe (ikke mindre enn 1000 ml), fyll til ca. halvparten med dest. vann, og tilsett 30 ml/l CO₂-mettet vann (1.8). Etterpå tilsettes av: 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6-løsninger 10 ml/l, og av 1.7.4 tilsettes 0,8 ml/l. Innpipettering må foregå så fort som mulig. Etterpå fylles opp til merket med CO₂-mettet vann. Menisken sitter på merket.

2.3

Mål pH. Løsningen skal ha pH ca. 6. pH må ikke være høyere enn 6,3 og ikke lavere enn 5,8.

Kolben må lukkes godt. Det er ønskelig at porsjonen autoklaveres med en gang.

3. AUTOKLAVERING

Ta en rundkolbe med flat bunn og fyll til halvparten med "Z 8"-løsning. Sett i autoklav (les bruksanvisning). Ca. 7 min. etter oppvarming begynner det å blåse damp gjennom ventilen. La dampen blåse. Steng ventilen. Trykket går opp til 15 pund. La trykket stå 15 minutter på 15 pund, pass på ved regulering av flammen. Steng av gassen. La trykket synke (det tar ca. 15 minutter). Etter autoklavering avkjøles løsningen til værelsestemperatur. Dette bør foregå så snart som mulig, helst med risting i kaldt vannbad.

4. ETTERKONTROLL

Mål pH og ledningsevne (κ_{20}). pH skal være ca. 7,3 (området 7 - 8 er brukbart) og ledningsevne ca. $830 \cdot 10^{-6}$. Det må kontrolleres at løsningen er klar og blank før den benyttes.

Blindern, 11/6 1969

Josef Kotai

DETALJERTE MÅLETALL FRA INNLEDENDE FORSØK

FORSØK 1

Forsøksbetingelser:

Medium, kar 1: Springvann + 5% Z_8 + 26,6 mg Na-silikat/l
 kar 2: _____ " _____
 kar 3: _____ " _____

Vann: Springvann.

Lysstyrke, kar 1: 3200 lux }
 kar 2: 4000 " } 12 t lys/12 t mørke.
 kar 3: 3800 " }

Temperatur: 20°C.

Inokulum, beregnet UOD₄₃₀ (målt i kulturrør)

$$\text{Selenastrum: } \frac{0,37}{250} = 0,0015$$

$$\text{Scenedesmus: } \frac{0,25}{250} = 0,001$$

$$\text{Oscillatoria: } \frac{0,43}{250} = 0,007$$

$$\text{Asterionella: } <0,001$$

Tabell I. Målte fosfat- og nitratkonsentrasjoner under forsøk 1.

(Målt v/ kjemilab.)

Dato	Kl.	NO ₃ (µg N/l)				PO ₄ (µg P/l)			
		Reservoar	Kar 1	Kar 2	Kar 3	Reservoar	Kar 1	Kar 2	Kar 3
26/5		230				<2			
29/5	0800	230				<2			
29/5	1530	220				<2			
30/5	1030	210				<2			
30/5	1530	210				<3			
31/5	0830	220				<2			
31/5	1530	210				<2			
1/6	0800	210				<2			
1/6	1515	200				<2			
2/6	0830	210				5			
2/6	1545	200				3			
8/6	1300	235				2			
13/6		230				2			
15/6	0800	240				<2			
22/6	1530	200	4300	4250	4250	4	260	260	270
27/6	0800	210	4700	4700	5000	5	220	220	230
30/6		190	3150	2900	3350	4	160	170	170
4/7		200	3850	4250	4350	<2	180	200	210

Tabell II. Korrigerte verdier^{x)} for UOD₄₃₀ og organisk C under vekst, forsøk 1.

Organisme	Dato	Kl.	Kar 1						Kar 2						Kar 3					
			UOD ₄₃₀		mg org. C/l		UOD ₄₃₀		mg org. C/l		UOD ₄₃₀		mg org. C/l		UOD ₄₃₀		mg org. C/l			
			1.1	1.2	1.1	1.2	2.1	2.2	2.1	2.2	2.1	2.2	3.1	3.2	3.1	3.2	3.1	3.2		
Selenastrum	28/6	1305	0,048	0,042	6,5		0,116	-												
	29/6	1500	0,074	0,063			0,159	-												
	1/7	1915	0,101	0,125	13,2		0,279	-												
	2/7	2200	0,134	0,159			0,302	-												
	3/7	2030	0,177	-	21,3		-	-												
Scenedesmus	28/6	1305	0,066	0,053			0,082	0,081												
	29/6	1500	0,086	0,078			0,116	0,130												
	1/7	1915	(0,122)	0,173			-	0,286												
	2/7	2200	-	0,196			-	0,340												
	3/7	2030	-	0,272			-	0,413												
	5/7																			

Forsøksbetingelser: 5% Z₈ tilsatt 26,6 mg Si/l i springvann.

Temperatur: 20°C.

Lys: Kar 1: 3200 lux, kar 2: 4000 lux, kar 3: 3800 lux, 12 t lys/12 t mørke.

Start 23/6, kl. 20.00.

x) Korrigert for uttak av prøver til bestemmelse av organisk C.

Tabell III. Generasjonstid for de to grønnalgene ved forsøk 1.
(5% Z_8 + Si i springvann, 12 t lys/12 t mørke)
(basert på OD-målinger)

	Selenastrum	Scenedesmus
3200 lux	70 timer	57 timer
3800 "	65 "	43 "
4000 "	60 "	45 "

FORSØK 2

Forsøksbetingelser:

Medium, kar 1: Springvann + 5% Z_8 + 26,6 mg Na-silikat/l.

kar 2: _____ " _____

kar 3: _____ " _____

Vann: Springvann.

Lysstyrke, kar 1: 7800 lux }
 kar 2: 9400 " } 18 t lys/6 t mørke.
 kar 3: 6000 " }

Temperatur: 16 - 18°C.

Inokulum, beregnet UOD₄₃₀ (målt i kulturrør)

Selenastrum: 0,03

Scenedesmus: 0,04

Oscillatoria: 0,065

Anabaena: 0,009

Asterionella: 0,025

Tabell IV. Målte fosfat- og nitratkonsentrasjoner under forsøk 2.

Dato	NO ₃ (µg N/l)				PO ₄ (µg P/l)			
	Reservoar	Kar 1	Kar 2	Kar 3	Reservoar	Kar 1	Kar 2	Kar 3
4/10	100				2			
5/10	100				2			
6/10	100				3			
9/10		4100	4100	4100		210	220	220
13/10		3900	3800	3800		210	200	200

Tabell V. Korrigerede verdier^{x)} for UOD₄₃₀ og organisk C under vekst, forsøk 2.

Organisme	Dato	Kl.	Kar 1			Kar 2			Kar 3						
			UOD ₄₃₀		mg org. C/l	UOD ₄₃₀		mg org. C/l	UOD ₄₃₀		mg org. C/l				
			1.1	1.2	1.1	1.2	2.1	2.2	2.1	2.2	3.1	3.2	3.1	3.2	3.3
Scenedesmus	6/10	1600	0,085	0,085	20,8	20,8	0,081	-	20,8	0,095	0,085	20,8	0,095	0,085	20,8
	8/10	1030	0,245	0,220	33,8	33,8	0,205		33,5	0,160	0,161	26,5	0,160	0,161	26,5
	9/10	1000	0,400	0,360	58,9	58,9	0,360		55,6	-	0,246	45,5	-	0,246	45,5
	10/10	1100	0,590	0,510	92,4	92,4	0,510		89,0		0,452	74,8		0,452	74,8
	11/10	1030	0,860	0,720	116	116	0,710		110		0,640	91,7		0,640	91,7
	12/10	0900	1,10	0,950	184	184	0,940		182		0,915	163,0		0,915	163,0
	13/10	1030	1,40	1,27	219	219	1,22		196		1,19	200		1,19	200
Selenastrum	6/10	1600	0,070	0,068	7,50	7,50	0,070	0,060	7,50	0,060	0,070	7,50	0,060	0,070	7,50
	8/10	1030	0,170	0,168	21,0	17,3	0,162	0,162	17,0	0,143	0,139	16,0	0,143	0,139	16,0
	9/10	1000	0,330	0,330	44,8	40,1	0,280	0,280	37,6	0,262	0,214	26,6	0,262	0,214	26,6
	10/10	1100	0,640	0,580	68,9	66,1	0,500	0,510	58,2	0,475	0,380	41,6	0,475	0,380	41,6
	11/10	1030	0,890	0,890	101	97,5	0,790	0,780	86,6	0,760	0,690	73,3	0,760	0,690	73,3
	12/10	0900	1,24	1,23	172	154	1,12	1,03	125	1,00	0,950	101	1,00	0,950	101
	13/10	1030	1,61	1,66	199	183	1,50	1,50	154	1,29	1,34	150	1,29	1,34	150
16/10	1400							273							

Forsøksbetingelser: 5% Z₈ tilsatt 26,6 mg Na-silikat/l i springvann.

Temperatur: 16 - 18°C

Lys: Kar 1: 7800 lux, kar 2: 9400 lux, kar 3: 6000 lux, 18 t lys/ 6 t mørke.
Start 6/10, kl. 1700.

x) Korrigeret for uttak av prøver til bestemmelse av organisk C.

Tabell VI. Generasjonstid for de to grønnalgene ved forsøk 2.

(5% Z_8 + Si i springvann, 18 t lys/12 t mørke)

Temperatur: 16-18°.

(basert på OD- og org. C-målinger).

Lysstyrke	Senastrum		Scenedesmus	
	OD	Org. C	OD	Org. C
6000 lux	30,0 t	30,3 t	36 t	35 t
7800 "	26,4 "	26,3 "	35 "	35 "
9400 "	30,0 "	26,3 "	35 "	35 "

FORSØK 4

Forsøksbetingelser:

Medium, kar 1: Kullfiltrert vann, 5% Z₈ m/ 1/1 P (200 µg/l)
 kar 2: " " , 5% Z₈ m/ 1/4 P (50 µg/l)
 kar 3: " " , 5% Z₈ m/ 1/20 P (10 µg/l)

Lysstyrke: 7800 lux.

Temperatur: 16 - 18°C.

Inokulum, beregnet UOD₄₃₀: *Selenastrum*: $\frac{0,18 \cdot 15}{90} = 0,03$
Scenedesmus: $\frac{0,24 \cdot 15}{90} = 0,04$

(Forkulturene var dyrket opp på 5% Z₈ m/ 1/4 P.

Tabell VII. Målte fosfat- og nitratkonsentrasjoner under forsøk 4.

Dato	NO ₃ (µg N/l)				PO ₄ (µg P/l)			
	Reservoar	Kar 1	Kar 2	Kar 3	Reservoar	Kar 1	Kar 2	Kar 3
13/11	<10	3900	4100	3800	4	210	58	13
14/11	<10	3800	3800	3800	7	190	52	9
15/11	<10	3800	3700	3700	3	200	52	10
16/11	20	4300	4300	4200	5	190	52	7

Tabell VIII. Korrigerte^{x)} verdier for UOD₄₃₀ og organisk C under vekst, forsøk 4.

Organisme	Dato	Kl.	Kar 1						Kar 2						Kar 3					
			UOD ₄₃₀		mg org. C/l		UOD ₄₃₀		mg org. C/l		UOD ₄₃₀		mg org. C/l		UOD ₄₃₀		mg org. C/l			
			1.1	1.2	1.1	1.2	2.1	2.2	2.1	2.2	2.1	2.2	3.1	3.2	3.1	3.2	3.1	3.2		
Selenastrum	13/11	1500	0,076	0,110	12,8	12,8	0,070	0,072	6,7	6,7	0,092	0,095	12,4	12,4	0,092	0,095	12,4	12,4		
	14/11	0830	0,100	0,105	9,0	9,4	0,096	0,080	13,0	11,4	0,085	0,080	10,0	9,4	0,085	0,080	10,0	9,4		
	15/11	0900	0,150	0,160	17,0	16,5	0,155	0,180	24,0	17,0	0,112	0,138	13,8	15,2	0,112	0,138	13,8	15,2		
	16/11	0900	0,330	0,320	36,8	37,5	0,360	0,390	40,0	42,6	0,160	0,150	22,8	23,1	0,160	0,150	22,8	23,1		
	17/11	0915	0,580	0,580	65,4	68,8	0,630	0,630	63,6	68,0	0,173	0,160	31,4	28,2	0,173	0,160	31,4	28,2		
Scenedesmus	13/11	1500	0,088	0,065	17,3	17,3	0,084	0,080	13,0	13,0	0,088	0,070	13,3	13,3	0,088	0,070	13,3	13,3		
	14/11	0830	0,102	0,110	13,9	16,3	0,095	0,096	12,3	13,0	0,118	0,095	15,3	13,0	0,118	0,095	15,3	13,0		
	15/11	0900	0,176	0,165	25,0	24,0	0,198	0,157	26,5	23,3	0,100	0,110	20,2	24,5	0,100	0,110	20,2	24,5		
	16/11	0900	0,360	0,375	53,4	54,8	0,340	0,330	55,6	56,8	0,140	0,150	35,8	31,6	0,140	0,150	35,8	31,6		
	17/11	0915	0,570	0,570	97,3	97,1	0,560	0,580	88,2	88,2	0,205	0,190	41,2	35,2	0,205	0,190	41,2	35,2		

Forsøksbetingelser: 5% Z₈ m/ 10 - 200 µg P/l i kullfiltrert vann.

Temperatur: 16 - 18°C.

Lys: 7800 lux i 18 t lys/6 t mørke.

Start 13/11, kl. 1500.

x) Korrigert for uttak av prøver til bestemmelse av organisk C.

Tabell IX. Generasjonstid for de to grønnalgene ved forsøk 4.

(5% Z_8 med 10,50 og 200 μg P/1 i kullfiltrert vann)
(basert på org. C-målinger)

Temperatur: 16-18°C. Lys: 7800 lux, 18 t lys/6 t mørke.

Fosfatkonsentrasjon	Selenastrum	Scenedesmus
200 μg P/1	23 t	22 t
50 μg P/1	21 "	19 "
10 μg P/1	40 "	38 "