

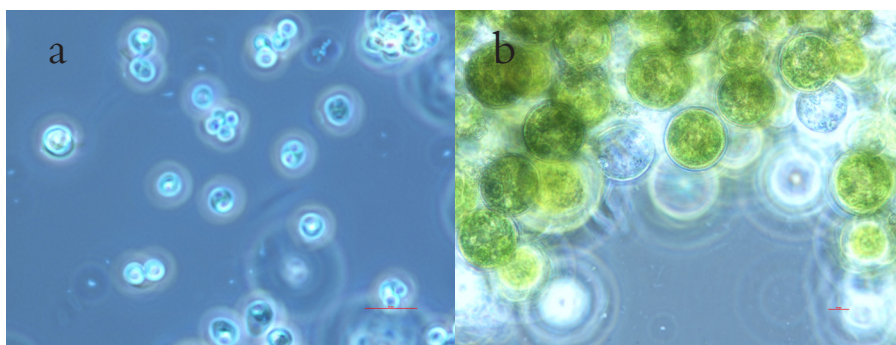
# Mikroalger i växthuset – ett redskap för minskat näringsläckage

MALIN HULTBERG, ANDERS S. CARLSSON OCH SUSANNE GUSTAFSSON

Dräneringslösning från hydroponisk växthusodling är mycket näringsrik och den är därför problematisk ur ett miljöperspektiv i de fall den inte kan recirkuleras tillbaks till odlingen. I projektet har möjligheten att reducera näringsnivåerna genom odling av mikroalger i dräneringslösning undersökts. Resultaten visar att den snabbväxande mikroalgen *Chlorella vulgaris* kunde etablera sig i obehandlad dräneringslösning och signifikant reducera mängden kväve och fosfor. Den höga reduktionen av fosfor som uppmättes i försöken, mellan 70-100%, är intressant eftersom allt mer fokus riktas på fosfor som en ändlig resurs. Vidare forskning bör riktas mot möjligheten att återvinna och återanvända denna fosfor i växtproduktionen.

I många växthusföretag odlar man i dag i näringslösning s.k. hydrokultur. Näringslösningen baseras på ett vatten av god kvalitet som sedan berikas med makro- och mikronäringsämnen. Näringsämnena kommer att i varierande grad tas upp av växten. Ur miljösynpunkt är det är önskvärt att odlaren har ett slutet system dvs. återcirkulerar näringslösningen efter att den kompletterats med näringsämnena. Alla odlare har dock inte möjlighet att ha ett slutet system, exempelvis pga. dålig råvattenkvalitet, och även de som huvudsakligen använder ett slutet system har i slutet av säsongen näringslösning som en avfallsprodukt.

Använd näringslösning kan näringsmässigt jämföras med ett avloppsvatten som också är mycket rikt på kväve och fosfor (Pufelski et



Figur 1. *Chlorella vulgaris* (a) är en snabbväxande och robust grönalg som enkelt etablerade sig och tillväxte i dräneringslösning från tomatodling. *Haematococcus pluvialis* (b) är också en grönalg men med en mer komplex livscykel. Denna mikroalg växte dåligt i dräneringslösning från tomatodling. (Foto. M. Hultberg)

al., 2010). Att rena avloppsvatten från dessa näringsämnen med hjälp av alger är en väletablerad teknik där man har sett goda resultat (Perry, 2010). Alger representerar en stor och varierad grupp av organismer som innehåller komplexa flercelliga organismer, makroalger, och mikroalger som består av encelliga organismer. Möjligheten att använda inte bara makroalger utan även mikroalger för rening av avloppsvatten har man känt till sedan 50 år tillbaks. Odling av mikroalger är också en globalt växande industri med stor potential där fokus inte enbart ligger på reningsfunktionen. Det finns tillämpningar inom livsmedel, foder och förnybara bränslen för den biomassa (mikroalger) som producerats under reningsprocessen.

I studien har fokus legat på mikroalgen *Chlorella vulgaris* (fig 1a), som

bland annat producerar fleromättade fettsyror (Hultberg et al., 2013), och på mikroalgen *Haematococcus pluvialis* (fig 1b) som producerar pigmentet astaxanthin (Fábregas et al., 2003). *Chlorella vulgaris* och extrakt av *Haematococcus pluvialis* som innehåller astaxanthin har GRAS (generally regarded as safe) status dvs de är godkända för användning i livsmedel. Det finns också en användning av de skördade mikroalgerna inom foderindustrin för att ge en god fettsyrasammansättning och god pigmentering hos bland annat odlad fisk och ägg. I projektet har vi undersökt hur produktion av fleromättade fettsyror och astaxanthin ser ut när algerna odlas i dräneringslösning.

Dräneringslösning från växthusodlingen är naturligt rik på mikroorganismer. Detta kan vara ett hinder för att de tillsatta mikroalgerna ska kun-

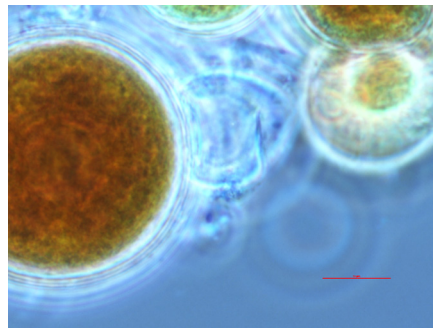
na etablera sig och tillväxa och i ett parallellt projekt har vi tittat på olika typer av filtrering som förbehandling samt identifierat den dominerande mikroalgsfloran som är naturligt förekommande i dräneringslösning.

### Försöksupplägg

Försöken har genomförts dels i en artificiell dräneringslösning som har haft näringsnivåer enligt Christensen et al. (2010) och i dräneringslösning samlade från tomatodlingar i Skåne. Kvävenivåerna i dräneringslösningen från växthus har varierat mellan 350 till 500 mg/L och fosfornivåerna mellan 15–60 mg/L. Dräneringslösningen har filtrerats med 10 µm porstorlek alternativt sterilfiltrerats, 0.45 µm, respektive lämnats obehandlad. Algodlingen har sedan genomförts i växthus i 20° C och med kontinuerlig luftning för att tillåta gasutbyte och för att förhindra att mikroalgerna sedimenterar. För de behandlingarna som inte inokulerats med mikroalger samt de behandlingar som inokulerats med *C. vulgaris* har tilläggsbelysning med 100 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> skett med 16 timmars ljus och 8 timmars natt. När *H. pluvialis* odlats har ljuset avskärmats för att nå en maximal ljusinstrålning av 20 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> under den gröna tillväxtfasen. Parallellt med odling i dräneringslösning har odling skett i standardmedium för grönalger (NIVA, 1976) för att kunna jämföra tillväxt och metabolitproduktion.

Biomassan har bestämts som torr-vikt efter frystorkning. För artbestämning av den naturligt förekommande mikroalgspopulationen har proverna fixerats med Lugol's lösning och undersökts i sedimentationskammare i ett inverterat ljusmikroskop. För näringsanalys har algbiomassan separerats med filtrering genom ett GF/C filter. Näringskoncentrationen i dräneringslösningen har därefter

bestämts enligt med ICP-OES enligt ISO 11885:2009. För analys av fettsyrasammansättningen hos *C. vulgaris* har fettsyrorerna extraherats från den frystorkade biomassan och sedan analyserats på gaskromatograf enligt Thomæus et al. (2001). Astaxanthin produktion hos *H. pluvialis* har följts genom att cellerna studerats i mikroskop. Astaxanthin ackumuleras under stressförhållande i den mogna cellen som då benämns aplanospor (Fåbrege et al., 2003).



Figur 2. Under vissa stressbetingelser mognar de grönpigmenterade och rörliga cellerna av *Haematococcus pluvialis* till större och orörliga celler (aplanospor) som ackumulerat en stor mängd av astaxanthin. (Foto M. Hultberg)

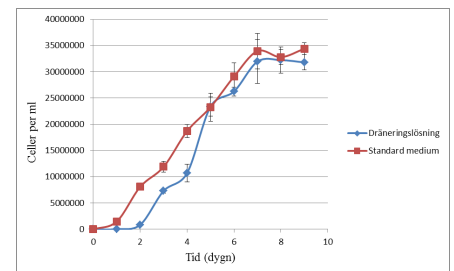
Resultaten för biomassa och fettsyrasammansättning har analyserat med ANOVA följt av Tukey's test. För analys av näringsreduktionen har parat t-test använts. Signifikans är angiven vid P≤0.05 och Minitab version 16.0 har använts för analysen.

### Resultat och Diskussion

#### Tillväxt av mikroalger i dräneringslösning

*Chlorella vulgaris* tillväxte bra i dräneringslösning från växthus och algen hade nått en stationär växtfas efter ca sju dagar (fig. 3). Inga signifikanta skillnader fanns i den mängd biomassa som producerats i de olika dräneringslösningarna jämfört med den biomassa som producerats i standard medium för grönalger

under samma odlingsförhållande. Ingen förbehandling var nödvändig för att *C. vulgaris* skulle etablera sig i dräneringslösningen och konkurrera ut den naturligt förekommande mikroalgspopulationen som dominerades av *Scenedesmus* spp.

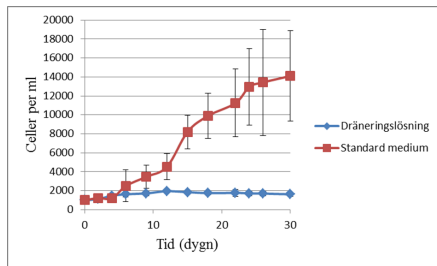


Figur 3. Tillväxt av *C. vulgaris* i dräneringslösning och i standard medium för odling av grönalger under nio dygn.

*Haematococcus pluvialis* tillväxte däremot signifikant sämre i dräneringslösning jämfört med tillväxt i standard medium (Fig 4). En möjlig förklaring kan vara att mängden joner i dräneringslösningen är för hög för att *H. pluvialis* ska kunna etablera sig. I ofiltrerad dräneringslösning samt i dräneringslösning filtrerad på 10 µm tog den naturligt förekommande algfloran över pga. *H. pluvialis* långsamma tillväxthastighet. Celler som ackumulerat pigmentet astaxanthin gick inte att detektera i dessa behandlingar. Däremot kunde dessa celler detekteras i den sterilfiltrerade näringslösningen efter ca 4 veckors odling.

#### Näringsreduktion

Nivåerna av fosfor och kväve reducerades signifikant genom alg tillväxten. Kvävereduktionen låg mellan 35–75 mg/L under nio dagar. Denna mängd stämmer väl överens med tidigare publicerade studier på näringsrika vatten, exempelvis avloppsvatten (Shi et al., 2007; Li et al., 2012; Zhou et al. 2012). Dock är dräneringsvatten från



Figur 4. Tillväxt av *H. pluvialis* i dräneringslösning och i standard medium för odling av grönalger under 30 dygn.

växthus mycket kväverikt och den procentuella reduktionen av kväve var mellan 15–30% oavsett behandling. Med avseende på kvävereduktion kan därför algbehandling inte anses vara tillräckligt för dräneringslösningen utan vidare åtgärder behövs för kvävereduktion. Det är möjligt att någon typ av anaerob behandling för att stimulera denitrifieringen, som hämmats av syretillförsel via luftning och algernas syreproduktion, skulle kunna vara en möjlig lösning.

Däremot uppmättes en mycket hög procentuell reduktion, mellan 70–100% jämfört med ursprungskoncentrationen, av fosfor. Algbaseerade reningsprocesser är mycket intressanta när det gäller rening av fosfor eftersom reduceringen sker på två sätt. Dels assimileras fosfor i den bildade biomassan men reduktionen sker också pga precipitering då pH höjs (Larsdotter, 2006). Denna höjning är en naturlig följd av algens fotosyntes som konsumerar den koldioxid som lösts i vattnet. I flertalet av de behandlingar som ingick i denna studie var pH över 9 när experimenten avslutades. Dräneringslösningen innehåller också en hög halt av joner som kalcium och magnesium vilket ytterligare stimulerar utfällningen av fosfor som fasta salter. Mängd fosfor som assimileras i algbiomassa har rapporterats ligga mellan 0,5–3,3% av torrvikten (Richmond, 2004) och även om man

antar att fosforinnehållet i biomassan låg nära maxvärdet är det tydligt att en stor del av fosfor har avlägsnats genom utfällning.

### Metabolitproduktion

De dominerande fettsyrorerna hos *Chlorella vulgaris* var palmitinsyra, oljesyra och linolensyra.

Den totala mängden lipid, beräknat som summan av fettsyraestrar, var ca 3% av biomassans torrsvikt när *C. vulgaris* odlats i dräneringslösning. Detta var signifikant lägre jämfört med det totala lipidinnehållet då *C. vulgaris* odlats i standard medium där total mängden lipider låg på ca 10% av biomassans torrsvikt. Även mängden av fleromättade fettsyror var signifikant lägre hos biomassan odlad i dräneringslösning.

Både sammansättningen av fettsyror och den totala kvantiteten av fettsyror hos mikroalger påverkas av odlingsbetingelserna (Guschina and Harwood, 2006). I denna studie har *C. vulgaris* odlats under samma betingelser vad gäller ljus, temperatur och syresättning och den enda parameter som skiljer är odlingsmediet. Det är möjligt att de höga kvävenivåerna i dräneringslösningen, som var ca fyra gånger högre än nivåerna i standardmedium, påverkat lipidproduktionen negativt. Detta eftersom låga kvävenivåer har visats inducera lipidproduktion hos *C. vulgaris* (Sharma et al., 2012).

*Haematococcus pluvialis* tillväxte mycket långsamt i näringslösning och även induktionen av astaxanthin var mycket sen och kunde bara observeras i de sterilfiltrerade behandlingarna. I standard medium startade syntesen av pigmentet efter ca 14 dagars tillväxt medan en tillväxtperiod på mellan 30–40 dagar krävdes för induktion av pigmentproduktion i dräneringslösning.

### Sammanfattning och utvecklingsområden

Trots att produktionen av lipider var låg när *C. vulgaris* odlats i dräneringslösning från växthus är det tydligt att mikroalger har en potential att användas för att minska näringsläckaget. I framtiden kommer det att vara viktigt att återvinna och återanvända näringsämnen, speciellt fosfor, eftersom den viktigaste källan till fosfor idag, råfosfat, är en icke-förnybar resurs (Cordell et al., 2009). Att fånga fosfor, via assimilering i algbiomassa och via den utfällning som sker när pH höjs, kan vara ett sätt att minska en del av fosforläckaget. Dock är skörden av mindre mikroalger som *C. vulgaris* komplicerad och energikrävande. De tekniska lösningar som finns för närvarande är ofta baserade på sedimentering via tillsats av kemikalier eller centrifugering. Ingen av dessa lösningar är hållbara och därför behövs vidare utveckling för att mikroalger ska kunna användas på ett enkelt och miljövänligt sätt för att reducera näringsläckage.

Ett intressant utvecklingsområde är att den algbiomassan som produceras har potential att återvinnas tillbaka till växthuset som gödningsmedel. Ny forskning pekar på tillväxtfrämjande effekter av mikroalger då de använts för gödning. En eventuell förklaring till detta är förekomst av höga halter av växthormoner som cytokininer och auxin i mikroalgernas biomassa (Stirk et al., 2002). De näringslösningar som för närvarande är vanligast i hydrokultur är huvudsakligen baserade på oorganiska salter av kväve och fosfor. Om någon av dessa näringskällor skulle kunna ersättas av algbiomassa skulle hållbarheten i växthusproduktion öka.

## Litteratur

- Christensen I, Hansson T, Svensson SE (2010) Gödsling i slutet odlings-system i växthus. Landskap Trädgård Jordbruk Report 15. ISBN 978-91-86373-22-1.
- Fábregas J, Dominguez A, Maseda A, Otero A (2003) Interactions between irradiance and nutrient availability during astaxanthin accumulation and degradation in *Haematococcus pluvialis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 61: 545-551.
- Gushina LA, Harwood JL (2006) Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog Lipid Res* 45: 160-185.
- Hultberg M, Carlsson AS, Gustafsson S (2013) Treatment of drainage solution from hydroponic greenhouse production with microalgae. *Bioresource Technology*, 136: 401-406.
- Larsdotter K (2006) Wastewater treatment with microalgae – a literature review. *Vatten* 62: 31-38.
- Li Y, Chen YF, Chen P, Min M, Zhou W, Martinez B, Zho J, Ruan R (2011) Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. *Bioresource Technology* 102: 5138-5144.
- Perry A (2010) Algae, a mean green cleaning machine. *Agricultural Research*, may-june, pp. 20-21.
- Pufelski N, Aravinthan V, Yusaf T (2010) How effective is microalgae treatment of nursery wastewater for nutrient removal. Southern Region Engineering Conference, 11-12 Nov, Toowoomba, Australia. SREC2010-T1-4.
- Richmond M, ed (2004) *Handbook of Microalgal culture*. Blackwell Science Ltd., Oxford, UK.
- Sharma KK, Schuhmann H, Schenk PM (2012) High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies* 5: 1532-1553.
- Shi J, Podola B, Melkonian M (2007) Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae immobilized on twin layer: an experimental study. *J Appl Phycol* 19: 417-423.
- Stirk WA, Ördög V, Van Staden J, Jäger K (2002) Cytokinin- and auxin-like activity in Cyanophyta and microalgae. *J Appl Phycol*. 14: 215-221.
- Thomæus S, Carlsson AS, Stymne S (2001) Distribution of fatty acids in polar and neutral lipids during seed development in *Arabidopsis Thaliana* genetically engineered to produce acetylenic, epoxy and hydroxyl fatty acids. *Plant Science* 161: 997-1003.
- Zhou W, Li Y, Min M, Hu B, Zhang H, Ma X, Li L, Cheng Y, Chen P, Ruan R (2012) Growing wastewater-born microalgae *Auxenochlorella protothecoides* UMN280 on concentrated municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and energy feedstock production. *Applied Energy* 98: 433-440.

---

Faktabladet är utarbetat inom LTJ-fakultetens institutionen för biosystem och teknologi

Projektet är finansierat av Partnerskap Alnarp och Region Skånes Miljövårdsfond

Projektansvarig/författare: Malin Hultberg, Malin.Hultberg@slu.se, institutionen för biosystem och teknologi

Område Hortikultur

epsilon.slu.se