

Pro gradu -tutkielma

**Kahden lajin kasvatuksen vaikutus mikrolevien
kykyyn poistaa ravinteita kalojen
kiertovesikasvatuksen jätevedestä**

Aaro Pudas



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Akvaattiset tieteet

12.05.2021

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta
Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Akvaattiset tieteet

Aaro Pudas: Kahden lajin kasvatuksen vaikutus mikrolevien kykyyn poistaa ravinteita kalojen kiertovesikasvatuksen jätevedestä
Pro gradu -tutkielma: 38 s., 0 liitettä (0s.)
Työn ohjaajat: Yliopistonlehtori Juhani Pirhonen ja yliopistonlehtori Katja Pulkkinen
Tarkastajat:
Toukokuu 2021

Hakusanat: Fosfaatti, Kiertovesiviljely, Mikrolevä, Monilajikasvatus, Nitraatti

Mikroleviä voidaan käyttää useissa sovelluksissa, kuten biopolttoaineiden ja lisäravinteiden raaka-aineena, väriaineiden tuottajina, sekä vedenpuhdistuksessa. Veden puhdistaminen vaatii leviltä kyllin nopeaa ravinteiden ottoa vedestä ja mielellään kykyä sietää häiriöitä vedenlaadussa. Eräs tapa tehdä levistä parempia jäteveden käsittelijöitä on monilajikasvatus, jonka on todettu parantavan leväviljelmien häiriönsietokykyä. Tässä työssä tutkin mikrolevien kykyä poistaa ravinteita kiertovesiviljelmän jätevedestä. Aiemman tutkimustiedon perusteella odotin yhtä levää sisältävien viljelmien sitovan vähemmän ravinteita vedestä kuin vastaavan monilajisen viljelmän. Esikokeiden perusteella valitsin tutkimukseeni viherleviin kuuluvat *Selenastrum* sp. ja *Monoraphidium griffithii* -mikrolevät. Tein yhteensä kolme koetta, joista ensimmäisessä levät kasvoivat elatusliuoksessa (WC), toisessa levät kasvoivat RAS-jätevedessä (WW), ja kolmannessa puolet levistä kasvoi WC- ja puolet WW-liuoksessa. Levien yksin tai yhdessä viljelyllä ei ollut vaikutusta nitraattitypen määrään kokeen lopussa. Levien tilavuus kasvatuksen kokonaistilavuudesta muuttui osassa kokeista, kun leviä kasvatettiin yhdessä. Monilajikasvatuksella oli vaikutusta levien tiheyteen ja kasvatusliuoksen fosfaattifosforin määrään kokeen lopussa. Fosfaattifosforia oli vähemmän monilajikasvatuksessa kuin yksin kasvatetussa *Selenastrum* sp. -levässä. Monilajikasvatus voi siis vaikuttaa mikrolevien ravinteidenottoon, kasvatusten tiheyteen ja solujen tilavuuteen.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science
Department of Biological and Environmental Science
Aquatic Sciences

Aaro Pudas: Effects of microalgal duoculture on nutrient uptake from
recirculation aquaculture effluents

MSc thesis: 38 p., 0 appendices (0 p.)

Työn ohjaajat: Senior lecturer Juhani Pirhonen, Senior Lecturer Katja
Pulkkinen

Tarkastajat:

May 2021

Industrially grown algae has found many new uses, ranging from coloring agents, such as astaxanthin, to biofuel. Algae may also be used to clean wastewater from nutrients. Previous studies suggest that algal polyculture can increase algal productivity and resilience against environmental disturbances. In my MSc thesis, I examined if using two algae species makes nutrient uptake from recirculating aquaculture system (RAS) wastewater more efficient than using algal monocultures. Based on preliminary results I chose two green microalgae species to be used in my experiments: *Selenastrum* sp. and *Monoraphidium griffithii*. In first experiment, I grew 12 cultures of algae for seven days in artificial growth medium. In the second and third experiments, I grew another two batches of 12 cultures for ten days each. In second experiment I used RAS wastewater (WW) and in the third experiment I grew six cultures in WC and other six in WW. There was no difference between duoculturing or monoculturing when it comes to the amount of nitrates at the end of the experiments. Duoculturing seems to have an effect on biovolume. Statistically significant results were observed between algae density and which culture (mono- or duoculture) was used. At the end of second experiment, where duoculture removed statistically significantly more phosphorus from WW than *Selenastrum* sp. monoculture. This result suggest that duoculturing does, indeed affect nutrient uptake of microalgae as well as density and biovolume.

Sisällysluettelo

1 JOHDANTO.....	1
1.1 Typpi ja fosfori	2
1.2 Kiertovesikasvatus (RAS)	3
1.3 Monilajisuus ja sen hyödyt.....	6
1.4 <i>Selenastrum</i> sp. ja <i>Monoraphidium griffithii</i>	9
1.5 Tutkimushypoteesi	9
2 MENETELMÄT.....	10
2.1 Esikasvatukset ja esikoe	10
2.2 Kokeet.....	11
2.3 Tilastomenetelmät.....	14
3 TULOKSET	16
3.1 Ensimmäinen koe.....	16
3.2 Toinen koe.....	18
3.3 Kolmas koe.....	20
3.4 Yhteenveto tuloksista	23
4 TULOSTEN TARKASTELU	23
4.1 Nitraattityppi ja fosfaattifosfori	25
4.2 Biomassa ja tiheys	27
4.3 Käytetyn kasvatusnesteen vaikutus.....	28
4.4 Loppuyhteenveto ja jatkotutkimuskohteet	29
Kiitokset.....	31
Kirjallisuus	31

SANASTO JA LYHENTEET

LYHENTEET

HP	<i>Haematococcus pluvialis</i>
KA	Keskiarvo
MG	<i>Monoraphidium griffithii</i>
MGSE	Kahden lajin yhteiskasvatus, jossa on <i>Monoraphidium griffithii</i> ja <i>Selenastrum</i> sp. -leviä
RAS	Kiertovesiviljely (Recirculating Aquaculture System)
SE	<i>Selenastrum</i> sp.
WW	Jätevesi (Waste Water)

1 JOHDANTO

Levä on vaikeasti määriteltävä termi, sillä leviksi voidaan kutsua useita eri taksonomisissa ryhmissä olevia eliöitä. Mikrolevät ovat nimensäkin puolesta mikroskooppisen pieniä leviä, joiden koko vaihtelee välillä 0,2–200 µm (Razzak ym. 2013, Veyel ym. 2014, Yadav & Sen 2017, Wei ym. 2020, Flynn 2020). Mikroleviin kuuluvia ryhmiä ovat esimerkiksi sinilevät (Cyanobacteria), punalevät (Rhodophyta), viherlevät (Chlorophyta) sekä kultalevät (Chrysophyceae). Levät voidaan jakaa niiden energian hankintatavan mukaan autotrofeihin, jotka saavat energiansa yhteyttämisen avulla, ja toisenvaraisiin eli heterotrofeihin, jotka saavat energiansa muista eliöistä. Niitä leviä, jotka kykenevät sekä autotrofiaan että heterotrofiaan, kutsutaan miksotrofeiksi. Tässä tutkimuksessa levällä tarkoitetaan yksisoluisia, mikroskooppisia ja autotrofiaan kykeneviä kasvisoluja.

Leviä ja niistä peräisin olevia tuotteita on hyödynnetty jo ainakin viimeisen 1500 vuoden ajan esimerkiksi lääkkeenä (Richmond & Hu 2013). Perinteisesti leviä ja niiden tuottamia yhdisteitä on saatu luonnosta tai viljelemällä niitä maapohja-altaissa ulkona (Richmond & Hu 2013). Syynä levien kasvaneeseen suosioon niin ihmis- kuin eläinravinnonkin lähteenä voidaan pitää 1960-luvun tienoilla alkanutta huolta maapallon ruokavarojen riittämisestä alati kasvavalle väestölle (Richmond & Hu 2013). Levät sisältävät runsaasti proteiineja ja lajista riippuen muitakin ravintoaineita, kuten vitamiineja ja omega-3-rasvahappoja (Richmond & Hu 2013), mutta kaupallisesti ne ovat menestyneet lähinnä lisäravinteina johtuen levien huonosta mausta ja epämiellyttävästä ulkonäöstä (Becker 2007). Lihantuotantoon verrattuna levien tuottamisessa etuna on se, että ensin ei tarvitse kasvattaa muita eliöitä niiden ravinnoksi (Richmond & Hu 2013). Levien käyttöä viljapeltojen lannoitteena on myös tutkittu, ja tulokset ovat osoittaneet, että kuivattua tai märkää levämassaa voidaan käyttää lannoitteena (Schreiber ym. 2018). Leviä käytetään muiden raaka-aineiden valmistuksessa, esimerkiksi *Haematococcus pluvialis* -levää

käytetään lisäravinteiden valmistuksessa levän tuottamien karotenoidien takia (Beardall ym. 2016). Joidenkin levälajien korkean rasvahappopitoisuuden ansiosta niitä voidaan käyttää myös biodieselin valmistukseen (Wang ym. 2013).

Levälajit pitää valita huolellisesti käyttökohteen mukaan. Esimerkiksi paikalliset levät voivat olla parempia viljelyyn tai jäteveden puhdistukseen, koska ei tarvitse pelätä, että ne leviäisivät vieraslajeina luontoon ja oletettavasti paikallinen ilmasto on niille sopiva (Lawton ym. 2013). Myös sitä, onko levä auto-, mikso- vai heterotrofinen kannattaa miettiä, sillä energianhankintatapa vaikuttaa siihen, minkälaista ravintoa levä tarvitsee. Eräässä kokeessa *Scenedesmus* sp. levien havaittiin tuottavan enemmän biomassaa heterotrofian ja miksotrofian avulla kuin autotrofian avulla (Kamalanathan ym. 2018). Levien käytössä kannattaa myös huomioida luonnontilaisen ja rakennetun ympäristön erilaisuus (Guillemain ym. 2008). Vaikka luonnon ekosysteemeistä voi ottaa mallia toimivien lajien ja lajiyhdistelmien löytämiseksi, pitää aina varautua siihen, että lajit eivät välttämättä käyttäydy samoin keinotekoisessa ympäristössä kuin luonnossa.

1.1 Typpi ja fosfori

Typpi ja fosfori ovat elämän kannalta tärkeitä alkuaineita, joita ilman elämä ei ole mahdollista (Fields ym. 2014). Molempia löydetään esimerkiksi osana DNA:ta (Campbell ym. 2015, Smith 2016). Koska typpi ja fosfori ovat tärkeitä ravinteita, niiden saatavuus muodostaa usein kasvua säätelevän pullonkaulan, eli ne ovat useissa ekosysteemeissä minimiravinteita (Campbell ym. 2015). Se kumpi ravinteista on minimiravinne, riippuu ympäristöstä. Redfieldin suhdeluvun (1934) mukaan merellisessä planktonbiomassassa tulisi olla enemmän typpeä kuin fosforia suhteessa 16:1. Typpeä on havaittu olevan enemmän suhteessa fosforiin myös makeissa trooppisissa vesissä (They ym. 2017). Thomas & Cebrian (2008), mukaan fosfori on makeissa vesissä ja typpi merivesissä kasvua rajoittava ravinne. Typen rajoittava vaikutus johtuu osaltaan siitä, että vain osa typen esiintymismuodoista on elämälle sopivassa muodossa, sillä esimerkiksi ilmakehän

typpi N_2 ei ole useimpien organismien hyödynnettävissä. Nitriitti NO_2^- , nitraatti NO_3^- sekä ammoniakki NH_3 ovat typen esiintymismuotoja biologisessa kierrossa (Campbell ym. 2015). Näistä muodoista nitraatti ja ammoniakki ovat kasvien käytettävissä, mutta nitriittiä käyttävät vain nitrifikaatioon kykenevät bakteerit (Campbell ym. 2015). Typen muodolla on siis vaikutusta siihen, kuinka hyvin levät voivat ottaa sitä vedestä. Viiden eri viherlevälajin (*Chlorella vulgaris*, *Chlorococcum* sp., *Parachlorella kessleri*, *Scenedesmus obliquus*, *Scenedesmus quadricauda*) on havaittu poistavan nitraattia tehokkaammin vedestä kuin ammoniakkia (Lv ym. 2019). Fosforin eri muotojen (DOP eli liuennut orgaaninen fosfori ja KH_2PO_4) on myös havaittu vaikuttavan mikrolevien (*Prorocentrum donghaiense* ja *Skeletonema costatum*) tiheyteen kasvatuksissa (Ou ym. 2015).

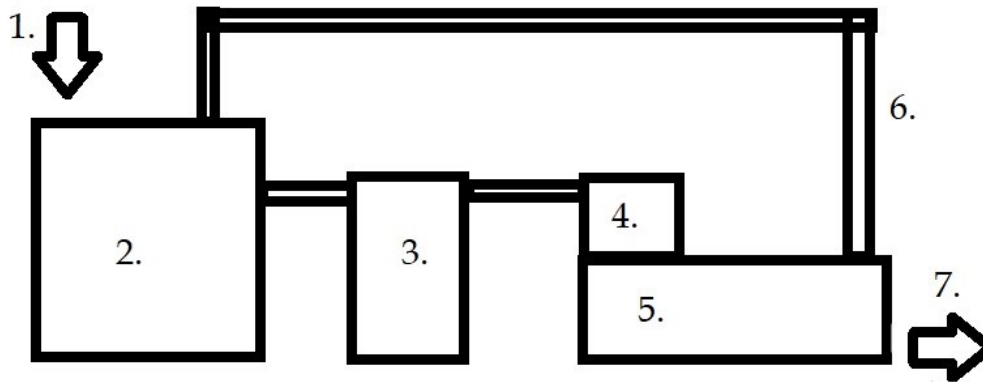
Liiallinen fosfori vesistöissä voi aiheuttaa rehevöitymistä ja haitallisia leväkukintoja, jotka vaikuttavat negatiivisesti muuhun vesistön eliöstöön (Paerl 2014, Jin & Bierma 2018). Eräiden levien tuottamat toksiinit ovat joillekin eliöille itsessään haitallisia tai ne voivat kumuloitua haitallisiin pitoisuuksiin kulkeutuessaan ylemmäs trofiatasoilla (Jin & Bierma 2018). Vähentämällä esimerkiksi kalankasvatuksesta aiheutuvia nitraatti- ja fosforipäästöjä voidaan vaikuttaa vesistöjen rehevyyteen (Paerl 2014). Myös liiallinen typpi voi johtaa haitallisten sinileväkukintojen yleistymiseen (Paerl 2014).

1.2 Kiertovesikasvatus (RAS)

Kiertovesiviljely, eli englanniksi recirculating aquaculture system (RAS), tarkoittaa sellaista vesieliöiden kasvatusta, jossa eliöiden kasvattamisessa käytetty vesi kierrätetään takaisin eliöiden käyttöön (Kuva 1). Veden kierrättämisellä pyritään pienentämään käyttöön tarvittavan veden määrää kuin perinteisemmistä läpivirtaussysteemeistä (Bregnballe 2015, Vielma ym. 2021). Pienempi vedenkulutus mahdollistaa viljelyn alueilla, joissa veden saanti on aiemmin rajoittanut perinteisten läpivirtauslaitosten rakentamista (Badiola ym. 2018). Suurimpia haasteita kiertovesiviljelyssä on laitteiston kalleus ja sähkönkulutus, sillä

sähköä kuluu paljon veden kierrättämiseen (Badiola ym. 2018). Näin ollen kiertovesiviljely voi saavuttaa perinteistä läpivirtausviljelyä pienemmän hiilijalanjäljen vain sellaisissa paikoissa, joissa on saatavilla hiilineutraalisti tuotettua sähköä (Badiola ym. 2018). Esimerkki tällaisesta paikasta voisi olla Ranska, koska siellä saatavilla paljon ydinvoimalla tuotettua sähköä (Badiola ym. 2018).

Kiertovesikasvatuksen edellytyksenä on jäteveden käsittely erilaisten biologisten ja mekaanisten prosessien avulla kasvatettaville eliöille jälleen sopivaksi (Bregnballe 2015). Biologisessa puhdistuksessa käytetään yleensä bakteereita, jotka kasvavat suodatinmateriaalin pinnalla (Kuva 1.). Bakteerit muuttavat kalojen jätöksistä veteen liukenevaa ammoniakkia nitriitiksi ja siitä edelleen nitraatiksi (Ruiz ym. 2020). Suodatinmateriaalin suuren pinta alan tehtävänä on antaa mahdollisimman paljon pinta-alaa bakteerikasvustolle. Jäteveden biologisessa puhdistuksessa voidaan käyttää apuna kasveja (Bregnballe 2015). Jäteveden avulla kasvatetut kasvit voivat olla itsessään arvokkaita, kuten vihanneksia, jotka voidaan myydä (Bregnballe 2015). Myös biologiseen puhdistukseen käytettäviä leviä voitaisiin mahdollisesti käyttää sivutulon lähteenä kiertovesisysteemiä käyttävällä kalankasvattamolla (Ojanen ym. 2017). Ongelmana levien käytöllä verrattuna bakteereihin on ollut se, että levillä menee kauemmin ottaa ravinteita vedestä kuin bakteereilla (Ojanen ym. 2017).



Kuva 1 Kaaviokuva käyttämästäni kiertovesisysteemistä. 1. tulovesi, 2. kala-allas, 3. laskeutusallas, biologinen suodatin, 5. veden pH-arvoa tasaavaa kalkkia ja superlonia viimeisten isojen hiukkasten suodattamiseen, 6. pumppu ja letku, joka kuljettaa suodatetun veden takaisin kala-altaaseen ja 7. poistovesiputki. Systeemiin tulevan veden määrä 1. ja siitä poistuvan veden määrä 7. ovat suunnilleen yhtä suuria (vuodot ja veden haihtuminen voivat pienentää poistuvan veden määrää marginaalisesti).

Levien käyttöä kiertovesisysteemien (RAS) yhteydessä on tutkittu jonkin verran. Esimerkiksi *Stigeoclonium nanum* -levän on todettu parantavan kiertovesiviljelmän kykyä sietää pH:n muutosta (Norulhuda ym. 2018). Useat levät ovat tehokkaita fosforin sitoimia, ja näin ollen ne voisivat olla yksi vartenotettava vaihtoehto jätevesien fosforin talteen ottamiseksi (Solovchenko ym. 2019). Kiertovesisysteemin vesi sisältää huomattavasti levien kasvuun tarvittavaa tyyppiä, mikä tekee siitä otollisen kasvualustan levänkasvatukselle. Esimerkiksi Bregnballeen (2015) mukaan 100–200 mg/l on useimmille kalalajeille sopiva määrä nitraattityyppiä kiertovesiviljelmissä. Kirjolohelle vastaava maksimimäärä on noin 75 mg/l (Davidson ym. 2014).

Saatavilla olevat ravinteet vaikuttavat huomattavasti siihen, millaiset levät viihtyvät ympäristössä. Donald ym. (2013) havaitsivat tutkimiansa tyyppiä ammoniumin, nitraatin ja urean, kasvattavan järvien leväbiomassaa. Tutkimuksessa havaittiin myös, että lähisukuiset lajit reagoivat usein eri tavalla lisättyyn tyyppiin, mikä viittaa siihen, että lähisukulaisuus ei välttämättä aiheuta

kilpailua levien välillä (Donald ym. 2013). Lv ym. (2019) mukaan typen muodolla, tässä tapauksessa nitraatti- tai ammonium-muodolla, on vaikutusta viherlevien kasvuun. Kokeessa havaittiin nitraattipitoisen jäteveden olevan parempi levien kasvulle kuin ammoniumpitoisen veden. Syyksi Lv ym. (2019) ehdottivat ammoniumin taipumusta laskea veden pH:ta. Levien kykyä poistaa ravinteita muistakin kuin RAS-jätevedestä on tutkittu, esimerkiksi Yao ym. (2015) ovat tutkineet *Chlorella sorokiniana* ja *Desmodesmus communis* -levien käyttöä sikaloiden ja yhdyskuntajäteveden puhdistamisessa. Tulosten perusteella em. levät voivat poistaa huomattavan määrän jäteveden kokonaistypestä ja fosforista kymmenessä päivässä (Yao ym. 2015).

Mikrolevien käyttöä kiertovesisysteemeissä ammoniakkin poistamiseksi on tutkittu myös Suomessa (Ojanen ym. 2017). Myös nitraattitypen ja fosfaattifosforin poistamista on tutkittu aiemmin (Stevčić ym. 2019). Donaldin ym. (2013) tutkimuksessa havaittiin, että *Monoraphidium* spp. vaikutti hyötyvän ammoniumista ja nitraatista. *Monoraphidium*-suku ei siis ole yhtä altis typen muotojen vaihtelulle jätevedessä kuin vain yhden typen muodon käyttöön erikoistuneet levät, eli se voisi olla häiriöitä sietävä vaihtoehto kiertovesiviljelmien jäteveden puhdistukseen.

Eräs mikrolevien etu perinteisempiin bakteerisuodattimiin ovat vähentyneet makuhaitat kasvatettavissa kaloissa (Ojanen ym. 2017). Ongelmana kuitenkin on, että mikrolevien suodatusteho ei ole yhtä tehokas suodattamaan vettä kuin perinteinen bakteerisuodatin (Ojanen ym. 2017). Näin ollen levien käyttö vaikuttaisi tällä hetkellä olevan kannattavaa ainoastaan erityisissä tapauksissa (Ojanen ym. 2017).

1.3 Monilajisuus ja sen hyödyt

Eliöiden välillä esiintyy useita erilaisia vuorovaikutuksia. Lajit voivat kilpailla keskenään samoista resursseista, kuten ravinnosta tai kasvupaikasta.

Mutualistisessa suhteessa molemmat lajit hyötyvät toisistaan, esimerkiksi useat sienet elävät symbioottisessa suhteessa jonkin puulajin kanssa jakaen tuottamiaan aineita puun kanssa ja puun jakaessa valmistamaansa sokeria (Campbell ym. 2015). Lajien välinen suhde voi hyödyttää vain toista lajia samalla kun toinen laji ei saa tai menetä mitään suhteesta (Campbell ym. 2015). Saalistajan ja saalin välisessä suhteessa toinen laji hyötyy toisen syömisestä toisen osapuolen kustannuksella (Allan & Castillo 2008, Campbell ym. 2015). Myös loisiminen voitaisiin ajatella tällaiseksi toista lajia toisen kustannuksella hyödyttäväksi suhteeksi (Valtonen ym. 2012, Campbell ym. 2015).

Levien on kuvailtu tuottavan useita erilaisia allelokemikaaleja eli aineita, jotka vaikuttavat muiden eliöiden entsyymien ja fotosynteesin toimintaan tai geneettiseen materiaaliin (Bacellar & Vermelho 2013). Esimerkiksi *Selenastrum capricornutum* -levän on havaittu lisäävän *Chlorella* sp. -levän lipidituotantoa yhdessä kasvatettaessa (Hong & Xu 2013). Lipidintuotanto on levillä merkki stressistä (Mohan & Devi 2014, Ferreira ym. 2019), eli toisen levän läsnäolo vaikutti negatiivisesti *Chlorella* sp. -levän elinvoimaisuuteen. Leväkukintojen hallitsemista muiden levien avulla on tutkittu (Qiu ym. 2019). Qiu ym. (2019) mukaan *Scenedesmus quadricauda* -levän tuottama 4-tert-butyylipyrokatekoli vaikutti *Microcystis flos-aquae* -levän biomassaan vaikeuttamalla *M. flos-aquae* -levän ravinteidenottoa vedestä (Qiu ym. 2019). Vastaavan kaltaista negatiivisesti toiseen levään vaikuttavien aineiden eritystä on havaittu myös *Peridinium aciculiferum* ja *Rhodomonas lacustris* -levien välillä (Rengefors & Legrand 2001). Rengefors & Legrandin (2001) mukaan syynä *P. aciculiferum* -levän toksiinien tuottoon olisi kilpailuedun saaminen haittaamalla kilpailijaansa.

Eräs hyöty kahden levän tai levän ja jonkin muun kasvin yhtäaikaisesta kasvattamisesta olisi toisen lajin tarjoama suoja (Bacellar & Vermelho 2013). Tuotantolajia voitaisiin siis suojata ulkopuolelta tulevilta taudeilta ja muilta epähalutuilta eliöiltä viljelemällä tuotantolajia yhdessä muille kuin tuotantolajille haitallisia allelokemikaaleja tuottavan lajin kanssa (Bacellar & Vermelho 2013).

Eräessä tutkimuksessa havaittiin, että neljän ja kuuden levän yhtäaikaiset viljelmät olivat kahden levän viljelmää paremmin laidunnusta kestäviä (Corcoran & Boeing 2012). Useamman levän vaikutus näkyi myös biomassassa. Monen lajin viljelmissä biomassat pysyivät tasaisempina, kun taas kahden lajin viljelmien biomassat vaihtelivat suuresti (Corcoran & Boeing 2012).

Naughton ym. (2015) havaitsivat yhteyden lajien määrän ja viljelmien biomassan vaihtelun välillä. Tutkimuksessa biomassassa joko kasvoi tai laski levälajista riippuen. Myös lajien sukulaisuussuhteilla oli vaikutusta tuloksiin, sillä läheistä sukua olevat levälajit kilpailivat todennäköisemmin keskenään kuin kaukaista sukua olevat (Naughton ym. 2015). Lähisukuisten lajien ekolokerot voivat olla niin toistensa kaltaisia, että ne joutuvat kilpailemaan samoista ravinteista ym. resursseista. Myös Cardinale (2011) on havainnut samankaltaisia, mutta eri syystä johtuvia vuorovaikutuksia levien monilajikasvatuksissa. Tutkimuksessa havaittiin vähän lajeja sisältävien kasvatusten poistavan keskimäärin vähemmän tyyppiä kuin useita lajeja sisältävät kasvatukset (Cardinale 2011). Syyksi havaitulle ilmiölle Cardinale (2011) ehdottaa, että kukin laji on erikoistunut omaan ekolokeroonsa. Toisin sanoen, kun elinolosuhteet muuttuvat huonoiksi yhdelle lajille, toinen paremmin vallitseviin olosuhteisiin erikoistunut laji voi alkaa kukoistaa. Levien erilaiset elinolosuhteet voivat myös täydentää toisiaan. Esimerkiksi Shurin ym. (2014), havaitsivat paljon valoa vaativien levien varjostavan samassa kasvatuksessa olleita leviä, jotka vaativat vähemmän valoa. Tällaisissa olosuhteissa monilajikasvatuksella voi olla huomattava etu yhden lajin kasvatukseen verrattuna, koska saatavilla oleva valo tulee tehokkaammin käytettyä. Tällaista toisiaan täydentävien lajien käyttöä monilajikasvatuksissa tukee myös Roelken (2017) tekemä simulaatio erilaisten levien käyttäytymisestä yhdessä kasvatettaessa. Simulaatiossa levien ominaisuudet, kuten muoto ja saatavilla olevien ravinteiden määrät vaikuttivat eniten siihen, millaiseksi kasvatettu populaatio kehittyi (Roelke 2017).

1.4 *Selenastrum* sp. ja *Monoraphidium griffithii*

Yhteistä kaikille viherleville ovat klorofylli a ja b -pigmentit (Richmond & Hu 2013). Tässä tutkimuksessa käyttämäni kaksi levää kuuluivat viherleviin (Chlorophyta). *Selenastrum* sp. on muodoltaan kuunsirpin muotoinen 16–40 µm pitkä solu, kun taas *Monoraphidium griffithii* on muodoltaan päitä kohti kapeneva sauva, jonka koko on 50–72 µm.

Monoraphidium griffithii -levän käyttöä on tutkittu mahdollisena biopolttoaineiden raaka-aineena (Tsarenko ym. 2016). *Selenastrum* sp. -levän käyttöä on aiemmin tutkittu paperiteollisuuden jäteveden puhdistamisessa (Porto ym. 2020). Porton ym. (2020) tutkimuksen mukaan *Selenastrum* sp. voi poistaa 99 % paperitehtaan jäteveden sisältämästä fosfaattifosforista (PO₄-P) ja nitraattitypestä (NO₃-N). Tosin kasvatusaika oli kokeessa varsin pitkä, 28 päivää, joten mielestäni soveltuvuus laajamittaiseen käyttöön on kyseenalainen.

Koska käyttämäni levät ovat erikokoisia keskenään, voisi olla mahdollista, että ne voisivat hyötyä kokoerostaan. Esimerkiksi Shurin ym. (2014), tulkitsivat oman tutkimuksensa tuloksia niin, että: ”-mitä erilaisempia kasvatetut levät olivat, sitä todennäköisemmin niiden väliltä löytyi toisiaan täydentäviä ominaisuuksia”.

1.5 Tutkimushypoteesi

Aiemmat tutkimukset ovat osoittaneet levien monilajiviljelyllä olevan vaikutusta levien kasvuun tutkitusta muuttujasta (tiheys, biomassan vaihtelu ajan suhteen, jne.), ympäristöstä ja levistä riippuen joko positiivisesti tai negatiivisesti (Cardinale 2011, Shurin ym. 2014, Naughton ym. 2015). Tämä voi johtua levien sukulaisuussuhteista, morfologisista ominaisuuksista tai ekolokeroiden samankaltaisuudesta (Cardinale 2011, Shurin ym. 2014, Naughton ym. 2015). Näin ollen oletin useamman lajin yhdessä kasvattamisen vaikuttavan joko positiivisesti tai negatiivisesti levien kykyyn ottaa ravinteita talteen jätevedestä. Koska levät kuuluvat samaan heimoon (*Selenastraceae*), levien välillä voisi ilmentyä

sukulaisuudesta johtuvaa kilpailua, mikä voisi olla havaittavissa toisen lajin syrjäytymisenä kahden lajin viljelmissä. Oletin myös, että ravinteidenotolla ja levien lukumäärän kasvulla on positiivinen riippuvuussuhde, eli toisen muutos näkyy samansuuntaisena muutoksena toisessa. Hypoteesini näin ollen oli, että lajien kasvattamisella yhdessä on kasvuun ja ravinteiden ottoon tilastollisesti merkitsevä vaikutus, joka voi olla joko positiivinen tai negatiivinen.

2 MENETELMÄT

2.1 Esikasvatukset ja esikoe

Kasvatin kolmea levää: *Selenastrum* sp. (SE), *Monoraphidium griffithii* (MG) ja *Haematococcus pluvialis* (HP). MG on peräisin Årungenin järvestä Norjasta, HP Trutbådanista Ruotsista, ja SE Iso-Ruuhijärveltä Suomesta (Stevčić ym. 2019). Levät sain ohjaajieni kautta Jyväskylän yliopistolta. Kasvatin leviä kasvatusliuoksessa (WC-liuos), joka sisälsi nitraattityyppiä 14 mg/l ja fosfaattifosforia 1,9 mg/l.

Otin esikasvatusta varten levänäytteet omiin pulloihinsa laminaarikaapissa kontaminaation estämiseksi. *Selenastrum* sp. ja *Monoraphidium griffithii* kasvatettiin 400 ml solukasvatuspulloissa, joita ilmastettiin akvaariopumpuilla. Leviä valaisemassa oli kaksi LED-valoputkea, jotka olivat 20 cm päässä kasvatuksista. Lamppujen malli oli Valoya L18 Spectrum AP67. Mittasin säteilyn (PAR, Photosynthetically Active Radiation) määrän olevan noin $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ kasvatusten etäisyydellä valoista. Säteilyn mittaamiseen käytin PRM-14 Kara tekniikka Oy -mittaria. Pidin valoja koko ajan päällä kokeiden ja esikasvatusten aikana.

Koeasetelmassa seitsemän kasvatuspulloa oli aseteltu vajaan 3 cm välein koko kasvatusalustan pituudelle. Levänkasvatuspullojen etäisyys valonlähteestä oli 20 cm, ja levät saivat $34\text{--}45 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ säteilyä 24 h/d (Kuva 2a ja 2b). Kokeiden alussa

pyrin tasaamaan solujen määrän siten, että jokaisessa kasvatuksessa oli saman verran soluja kokeen alussa.

Ensimmäinen koekasvatus (esikoe) kesti 8 päivää, toinen sekä kolmas kestivät 10 päivää. Esikokeiden aikana kasvatin seuraavia leväviljelmiä: HP, MG, SE, HPMG, HPSE, MGSE ja HPMGSE. Kokeiden välillä pesin aina pullot hanavedellä ja 70 % etanolilla kontaminaation estämiseksi.

2.2 Kokeet

Varsinaisissa kokeissa käytin samoja pulloja ja telineitä ja valaistusolosuhteet olivat samat kuin esikokeissa. Esikokeiden tulosten perusteella aloitin ensimmäisen kokeen käyttäen WC-elatusliuosta sekä MG- ja SE-leviä. HP-levän jätin pois, koska se ei esikokeiden tulosten perusteella kasvanut koeasetelmassa. Kokeessa oli kolme rinnakkaista käsittelyä (MG, SE ja MGSE). Jokaista käsittelyä oli neljä kappaletta. Syy sille miksi käytin WC-elatusnestettä jäteveden sijaan ensimmäisessä kokeessa johtuu siitä, että kiertovesiviljelmän ravinnepitoisuudet olivat alhaiset, alle 1 mg/l. Viljelyn ensimmäisinä päivinä lisäsin kerran päivässä elatusliuosta jokaiseen kasvatusastiaan niin, että kokeen aloittamista seuraavana päivänä lisäsin 160 ml.

Kokeen toisen päivänä lisäsin 320 ml kasvatusnestettä ja sitten 640 ml, jonka jälkeen seurasin levätiheyttä 4 vrk ajan. Puhdistin pullojen sisäpinnoille tarttunutta levää päivittäisen näytteidenoton yhteydessä steriilillä pipetinkärjellä. Suoritin puhdistuksen samalla tavoin kaikille kasvatuksille, huolimatta siitä, oliko niiden sisäpinnoille alkanut keräytyä levää vai ei. Ongelma sisäpinnoilla kasvamisen kanssa on se, että levät eivät saa silloin tasaisesti valoa, toisin kuin jos ne olisivat vapaasti vedessä kelluvia ja kuplituksen aiheuttamien virtausten liikuteltavana.

RAS-jätevesi oli peräisin RAS-systeemistä, jossa oli 12 kirjolohta. Kirjoloheet painoivat noin 120–500 g. Kalojen annettiin totutella uuteen altaaseensa neljä päivää, jolloin niille annettiin 30 g Circuit red 3,5 kalanrehua (Raisioaqua oy, Raisio

Suomi) vuorokaudessa. Kalojen ruokkiminen tapahtui hihnaruokkimella, joka annosteli 100 g kalanrehua vuorokaudessa koko kokeen ajan.

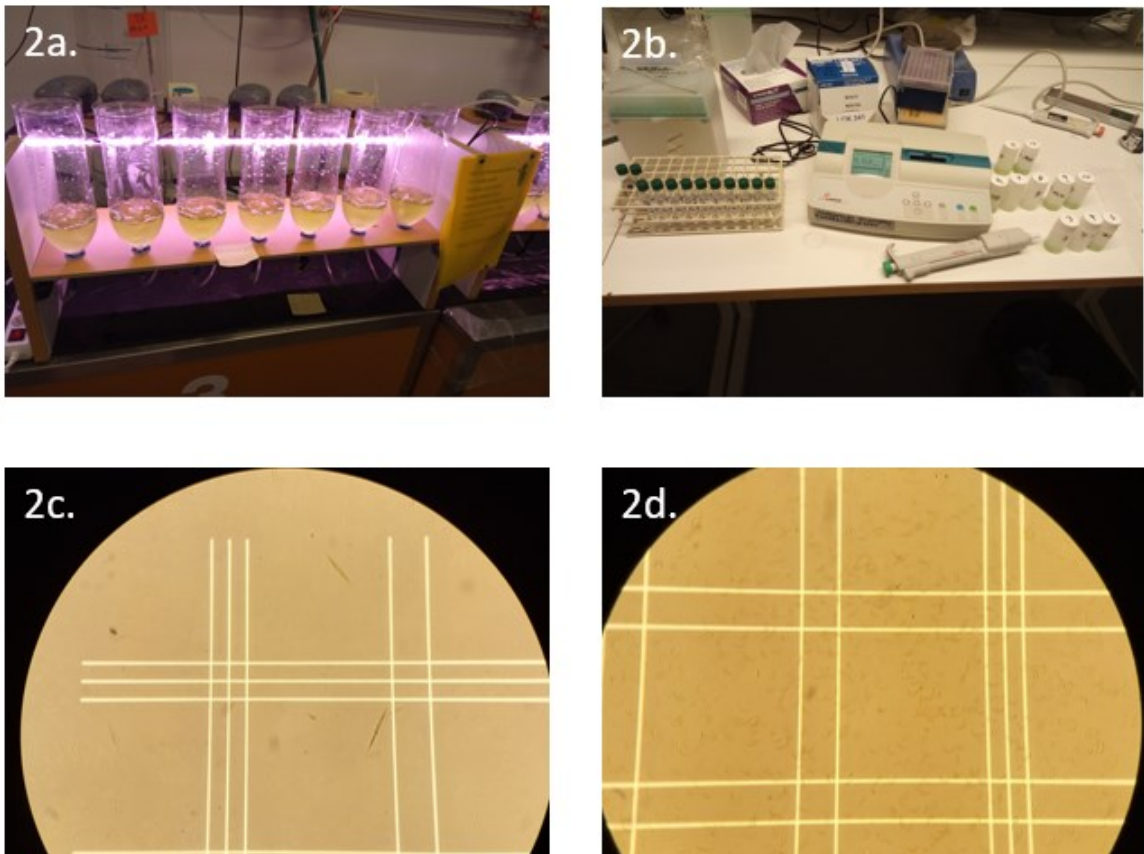
Nitraatin ja fosfaatin määrien mittaamisen tein Lasa100 -spektrofotometrillä (Dr. Bruno Lange GmbH & Co. KG, Bremen, Germany) (Kuva 2 c). Käytin spektrofotometriä kahdessa ensimmäisessä kokeessa. Tein nitraatin ja fosfaatin mittaukset ensimmäisenä ja viimeisenä päivänä. Spektrofotometrin kanssa käytin testikittejä: LCK 339 (nitraattityppi), LCK 341 (nitriittityppi) ja LCS 349 (fosfaattifosfori) (Hach, Colorado, USA) (Kuva 1 c). LCK 339 -kitin mittausalue on 0.23–13.5 mg/L NO₃-N, vastaavasti LCK 341 -kitin alue on 0.015–0.6 mg/L NO₂-N ja LCS 349-kitin alue on 0.01–0.5 mg/L PO₄-P. Kokeessa kolme nitraattityypen määrän seuranta tapahtui YSI quatro Pro- laitteella (Yellow Springs, Ohio, USA) ja fosfaattifosforin määrää en mitannut lainkaan.

Seurasin leväviljelmien tiheyttä ja solujen tilavuutta (biovolyyymi) päivittäin klo 11–15 välillä CASY-solulaskurilla (Omni Life Sciences, Bremen, Saksa). Otin päivittäin kasvatuksista 5 ml näytettä CASY laitetta varten. Näytteenotto tapahtui pipetillä ja kertakäyttöisellä steriilillä pipetinkärjellä. Lisäksi laskin solutiheyttä näytteistä Bürker -solulaskukammion (kammion mitat 3x3x0,1 mm) ja läpivalaisumikroskoopin avulla (Leitz Labolux D Ernst Leitz Wetzlar GMBH Saksa) (Kuvat 2 c & d). Valitsin mikroskopoitavat näytteet arpomalla yhden näytteen per päivä. Kokeen 3 lopussa mikroskopoin kaikki kyseisen kokeen viimeisen päivän näytteet.

Taulukko 1. Esikasvatusten biovolyymin (solujen tilavuus femtolitraa/ml). Solutiheyden perusteella laskin kuinka paljon kutakin levää tarvitsin kokeen alussa, jotta jokaisessa kasvatuksessa olisi yhtä suuri määrä soluja.

Levä- viljelmä	Solutiheys kokeen alussa kpl/ml ja kasvatusnesteiden määrä kokeen alussa		
	Koe 1	Koe 2	Koe 3
MG kpl/ml	1,015E+09	6,139E+08	1,272E+09
WC ml	128	X	119
WW ml	X	140	119
SE kpl/ml	3,035E+08	3,028E+08	1,049E+09
WC ml	150	X	123
WW ml	X	150	123
MGSE kpl/ml	6,59E+08	4,58E+08	1,16E+09
WC	139	X	123
WW	X	145	123

Toisessa kokeessa käytin levien kasvattamiseen kiertovesiviljelmän jätevettä. Kokeessa oli yhtä monta rinnakkaista käsittelyä ja toistoa kuin ensimmäisessä kokeessa. Suodatin jäteveden superlonin tai planktonhaavin läpi (tiheys 48 µm), jotta kasvatukseen ei pääsisi isoja hiukkasia ja ulkopuolisia eliöitä. Suoritin kokeen muutoin samoin kuin edellisen kokeen. Kolmannessa kokeessa käytin ainoastaan planktonhaavia jäteveden suodattamiseen. Toisin kuin kahdessa ensimmäisessä kokeessa, tässä kokeessa oli kuusi rinnakkaista käsittelyä (MG-WC, MG-WW, SE-WC, SE-MG, MGSE-WC ja MGSE-WW) joita jokaista oli kaksi kappaletta. Mittasin kolmannen kokeen aikana myös liuennutta happea (DO%), sähkönjohtokykyä (SPC) ja pH:ta kasvatuksista.



Kuva 2 a) Koeasetelma kokeen alkuvaiheessa, kun kasvatuspulloihin on lisätty ensimmäisen kerran nestettä ja leviä. b) Dr. Lange -spektrofotometri, pipetti ja testikittejä fosfaatin ja nitraatin määrittämiseen. c) *Monoraphidium griffithii* soluja nähtynä läpivalaisumikroskoopin läpi Bürker -solulaskukammiossa, jossa yhden ruudun pinta-ala oli 0,0625 mm². d) *Selenastrum* sp. soluja samanlaisessa kammiossa.

2.3 Tilastomenetelmät

Tulosten käsittelyyn käytin Microsoft Excel -ohjelmaa ja R-ohjelmointiympäristöllä (Rx64 3.6.1.Ink), sekä seuraavia R-paketteja: dplyr (mediaani ja keskiarvot), car (Levenen testi), FSAFSA v0.8.32 (Dunnin testi) ja agricolae (TukeyHSD testi). Tilastollisen merkitsevyyden rajana käytin arvoa 0,05. Nitraatteja koskevan datan muutin suhteelliseksi nitraatin määräksi, eli vertasin kokeen lopussa olevaa nitraattimäärää siihen, kuinka paljon kyseisessä kasvatuksessa oli ollut nitraattia

kokeen alussa. Kokeen 3 datalle tein myös päiväkohtaisen vertailun, jossa vertasin typen määrän muutosta yhden päivän aikana. Otin huomioon kasvatusnesteeseen lisäämisen päivinä 2–4 siten, että käytin vertailuun tuloksia ennen kasvatusnesteeseen lisäämistä. Myöhemmin päivinä en enää lisännyt kasvatusnestettä, joten nesteeseen lisäämistä ei tarvinnut huomioida näiden päivien kohdalla.

Biovolyymien ja solutiheyden suhteen käytin mittaustuloksia sellaisinaan ilman että olisin vertaillut niitä aiempiin arvoihin, kuten nitraattitypen kanssa. Testasin jokaisen käsittelyn dataa koekohtaisesti, ja käytin ainoastaan viimeisen päivän tuloksia. Tilastotestin valinta perustui kokeen datan homo-, tai heteroskedastisuuteen ja jakaumien normaalisuuteen, joita tutkin Shapiro-Wilkin-, Kolmogorov-Smirnov- ja Levenen testeillä. Ensimmäisen kokeen tulokset olivat nitraattitypen osalta homoskedastista, muttei normaalijakautunutta. Tiheyden ja biovolyymien kohdalla data ei ollut homoskedastista. Näin ollen käytin kokeen 1 tulosten testaamiseen Kruskal-Wallis testiä. Kokeen 1 fosfaattifosforin tulokset olivat normaalijakautuneita, mutta eivät homoskedastisia. Näin ollen käytin myös sen kohdalla Kruskal-Wallis testiä.

Kokeen 2 datasta nitraattityppi ja tiheys eivät olleet normaalijakautuneita, vaikka data oli homoskedastista. Tiheysdata oli kuitenkin sen veran lähellä normaalijakautunutta, että käytin sen kohdalla ANOVA-tilastotestiä. Biovolyymien ja fosfaattifosforin suhteen data oli normaalijakautunutta, muttei homoskedastista. Käytin kokeen 2 tilastolliseen tulkintaan Kruskal-Wallis testiä. Mikroskopoimalla saamani tiheyksien osalta data oli normaalijakautunutta, muttei homoskedastista, joten käytin Kruskal-Wallis testiä.

Koska kolmannessa kokeessa sain päiväkohtaista tietoa typen määrän kehityksestä, tarkastelin myös sitä. Ensimmäisen päivien kohdalla otin huomioon kasvatusnesteeseen lisäyksen mittaamalla typen määrän kahdesti, ensin ennen nesteeseen lisäämistä, ja toisen kerran nesteeseen lisäyksen jälkeen. Käytin ANOVA tai Kruskal-Wallis testiä sen mukaan oliko vuorokausikohtaisen muutoksen data

homoskedastista ja normaalijakautunutta. Muutoin toimin kolmannen kokeen tuloksien kanssa toimin samoin kuin kahden aiemman kokeen (Shapiro-Wilkin-, Kolmogorov-Smirnov- ja Levenen testit). Testien perusteella ANOVA-testin oletukset olivat voimassa nitraattitypen osalta päivinä 1-3, 6-8 ja 10. Muiden päivien tulosten kohdalla käytin Kruskal-Wallis-testiä. Tiheyden ja biovolyymin osalta tutkin vain kokeen viimeisen päivän tilastotesteillä. Fosforin määrä ei mitattu kolmannessa kokeessa, koska siinä käytetty mittauslaite, YSI quatro, ei kykene mittaamaan fosfaattifosforia. Mikroskopoinnin data oli Kolmogorov-Smirnov -testin perusteella normaalijakautunutta, muttei Shapiro-Wilkin testin perusteella. Myöskään homoskedastisuus oletus ei täytynyt, joten käytin Kruskal-Wallis testin testiä. En testannut oliko pH:lla, ominaisjohtavuudella (SPC) tai liuenneella hapella (DO%) tilastollista vaikutusta kokeen kolme tuloksiin.

3 TULOKSET

Koska jokainen varsinainen koe oli hieman erilainen esimerkiksi keston, ajankohdan ja käytetyn kasvatusnesteen suhteen, kävin kokeiden tulokset koekohtaisesti läpi.

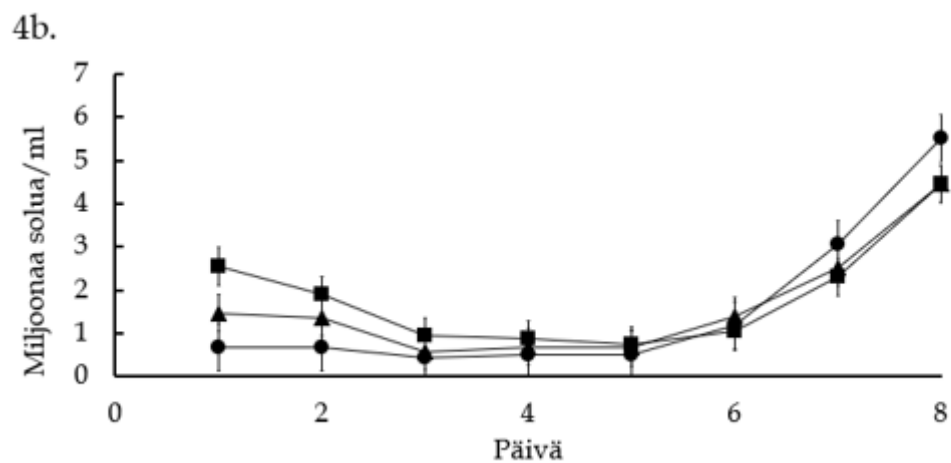
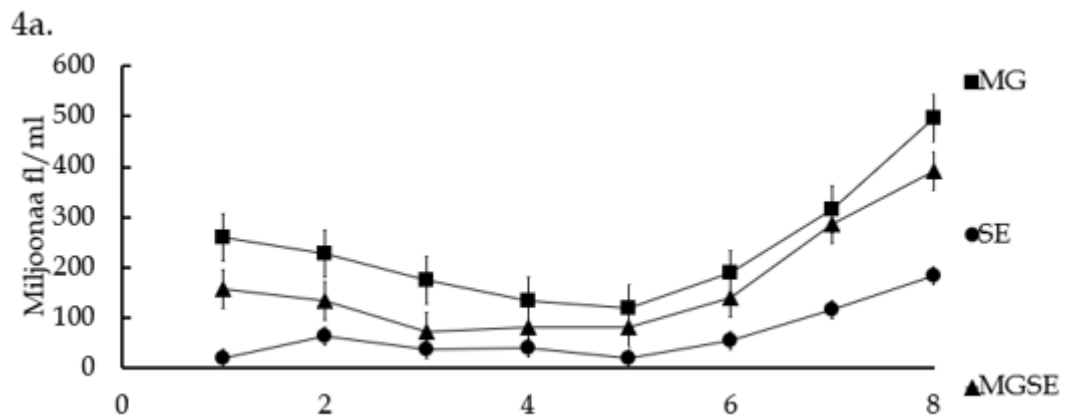
3.1 Ensimmäinen koe

Kruskall-Wallis-testin perusteella tämän kokeen tulokset, käsittelyn vaikutuksesta nitraattitypen eivät olleet tilastollisesti suuntaa antavia ($X^2=1,08$ $df=2$ $p>0,1$), samoin kuin vaihtelut fosfaattifosforin määrissä ($X^2=0,12$ $df= 2$ $p>0,1$) (Taulukko 2). Kruskall-Wallis testi näytti myös, että kasvatuksella ei ollut vaikutusta biovolyymiin ($X^2=5,54$ $df=2$ $p>0,1$) tai tiheyteen ($X^2=1,65$ $df=2$ $p>0,1$) (Kuvat 3 a&b). Läpivalaisumikroskopoinnin perusteella viljelmistä löytyi soluja koko kokeen ajan.

Taulukko 2. Nitraattitypen ja fosfaattifosforin määrä kokeen viimeisenä päivänä. Koe kesti kahdeksan päivää. Kasvattamisessa on käytetty elatusnestettä (WC-neste), jonka sisältämää

nitraattitypen ja fosfaattifosforin määriä on käytetty alkupitoisuuksina. Nitraattityppeä oli kokeen alussa noin 15 mg/l ja fosfaattifosforia noin 2 mg/l. Taulukoissa esitetyt arvot ovat viljelmien keskiarvoja ja keskihajontoja (SD).

viljelmä	Ravinne mg/l			
	NO3-N	SD	PO4-P	SD
MG	0,877	0,239	0,828	0,253
SE	2,583	1,849	0,378	0,361
MGSE	2,307	2,581	0,693	0,208



Kuvat 3a ja 3b. Kokeen 1 biovolyyymi (leväsolujen kokonaistilavuus / ml) kuvassa 3a. Kokeen 1 solutiheys kuvassa 3b. Virhepalkit kuvaavat keskihajontaa (SD). Lyhenteet: Femtolitra = fl. MG = *Monoraphidium griffithii* viljelmä. SE = *Selenastrum* sp. -viljelmä. MGSE = kaksilajiviljelmä, jossa *M. griffithii* ja *Selenastrum* sp. leviä.

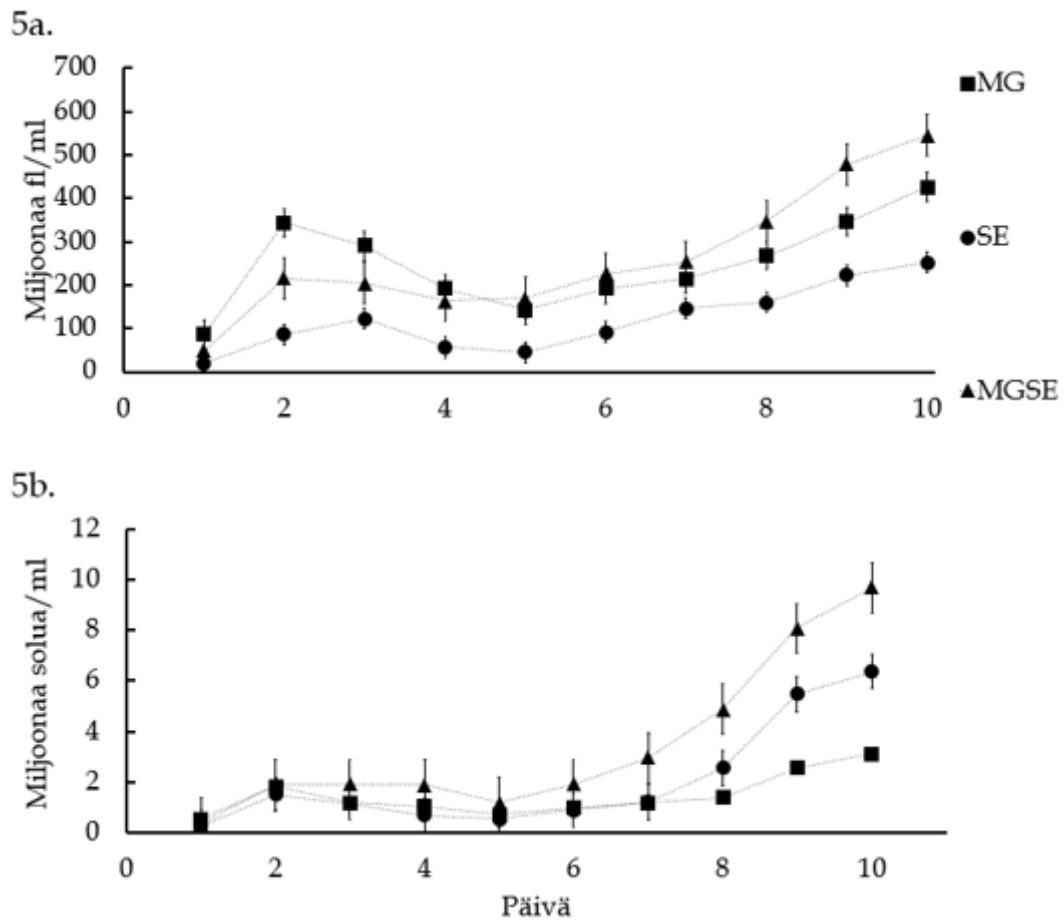
3.2 Toinen koe

Nitraattitypen ja käsittelyiden väliltä ei löytynyt tilastollisesti merkitsevää yhteyttä (Kruskall-W. $X^2=2,46$ $df=2$ $p>0,1$) (Taulukko 3). Sen sijaan kasvatuksen ja biovolyymin välinen vaikutus oli tilastollisesti suuntaa antava (Kruskall-W. $X^2=5,12$ $df=2$ $p<0,1$) (Kuva 5a). Tiheyden ja kasvatuksen väliltä löytyi tilastollisesti merkitsevä vaikutus (ANOVA $F= 5,06$ $df=2$ $p<0,05$) (Kuva 5b). Tukeyn HSD- testin perusteella tilastollisesti merkitsevät erot tiheydessä olivat SE-MG ja MGSE-MG viljelmien välillä, jossa SE oli tiheämpi kuin MG ($p<0,05$). Tiheysdatasta löytyi myös tilastollisesti suuntaa antava ero, jossa MGSE oli tiheämpi kuin MG ($p<0,1$) (Kuva 5b).

Kasvatuksilla oli tilastollisesti merkitsevä vaikutus fosfaattifosforin määrään kokeessa 2 (Kruskall-W. $X^2=7,04$ $df=2$ $p<0,05$) (Taulukko 3). Dunnin testin mukaan tilastollisesti merkitsevä ero oli SE- ja MGSE-kasvatusten välillä ($Z=2,65$ $p<0,05$) (Taulukko 3). SE-kasvatuksissa oli enemmän fosfaattifosforia, kuin MGSE-kasvatuksissa (Taulukko 3). Viimeisenä päivänä tehdyn mikroskopoinnin perusteella eri kasvatuksissa olleiden levien lukumäärien välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa, eli kaikissa kasvatuksissa oli suunnilleen yhtä monta leväsolua (Kruskal-W. $X^2=3,5$ $df=2$ $p>0,1$).

Taulukko 3. Nitraatin ja fosforin määrä toisen kokeen lopussa. Kokeen alussa nitraattityppeä oli 28 mg/l ja fosfaattifosforia 5 mg/l. Koe kesti 10 päivää. Taulukoissa esitetyt arvot ovat viljelmien keskiarvoja ja keskihajontoja.

Ravinne mg/l				
viljelmä	NO3-N	SD	PO4-P	SD
MG	6,478	0,662	1,067	0,419
SE	7,098	0,852	2,008	0,900
MGSE	5,798	0,724	0,614	0,272



Kuvat 4a ja 4b. Kokeen 2 tulokset biovolyyminille on esitetty kuvassa 4a. Vastaavasti kokeen 2 solutiheys on esitetty kuvassa 4b. Virhepalkit kuvaavat keskihajontaa (SD). Lyhenteet: Femtolitra = fl. MG = *Monoraphidium griffithii* -viljelmä. SE = *Selenastrum* sp. -viljelmä. MGSE = kaksilajiviljelmä jossa *M. griffithii*- ja *Selenastrum* sp. -leviä.

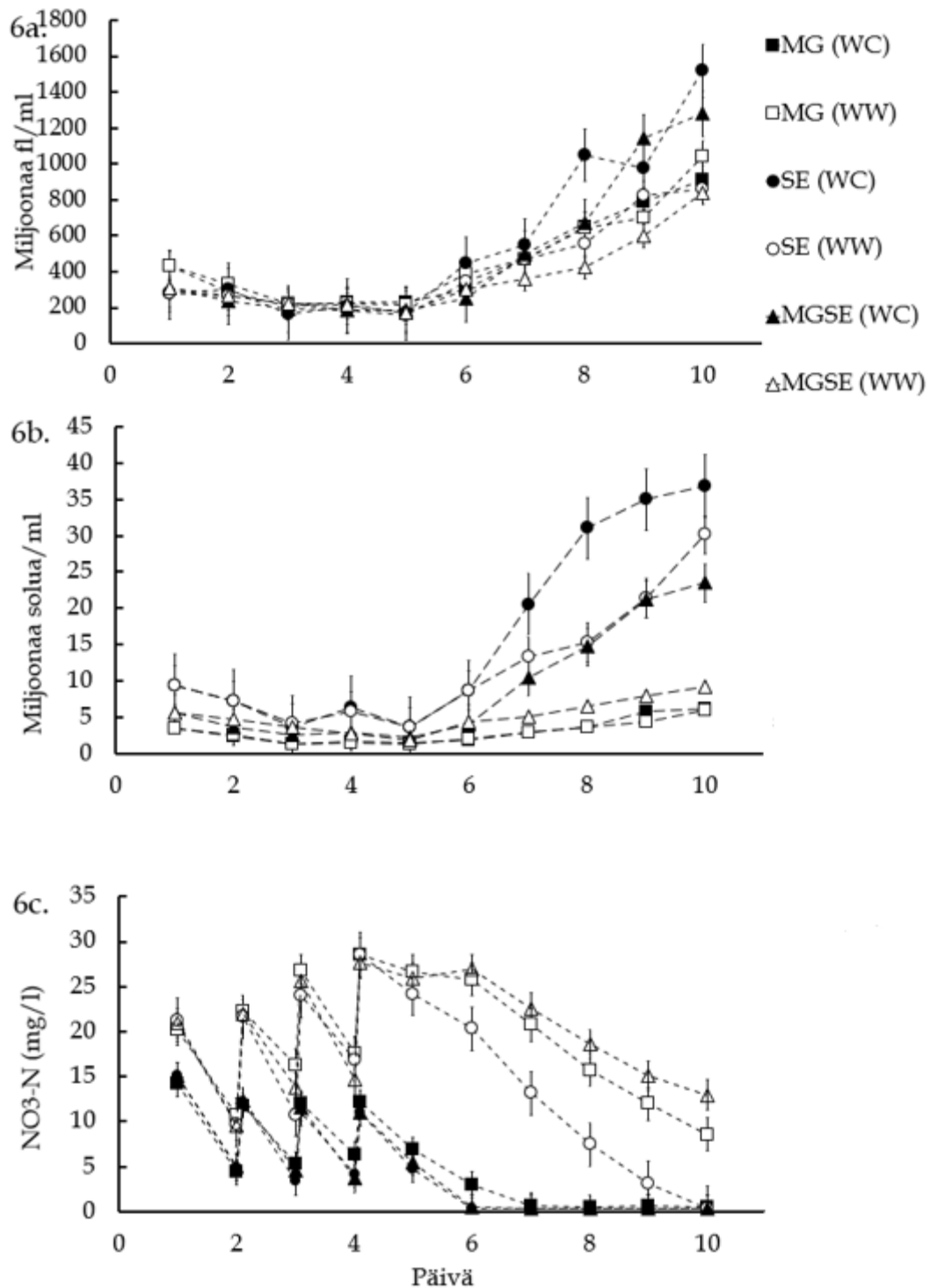
3.3 Kolmas koe

Vaikka kuvaajan perusteella kaikki leväkasvatukset ovat vähentäneet kasvatusnesteidensä typen määrää kokeen aikana ja viljelmien tiheys, sekä biovolyyymi ovat kasvaneet (Kuvat 5 a-c), tilastanalyysin perusteella kasvatetuilla levillä (MG, SE tai MGSE) ei ollut vaikutusta nitraattitypen määrään kokeen lopussa tai yhteenkään yhden vuorokauden aikana tapahtuneeseen nitraattitypen määrän muutokseen (Kruskall-Wallis päivinä 5 ja 9, muina päivinä ANOVA). Biovolyymin ja kasvatuksen väliltä ei löytynyt tilastollisesti merkitseviä tuloksia (ANOVA $F=2,92$ $df=2$ $p>0,1$). Myöskään biovolyymin ja kasvatusneste (ANOVA $F=2,88$ $df=1$ $p>0,1$) sekä kasvatusneste ja käsittelyn yhteisvaikutus eivät vaikuttaneet biovolyymiin (ANOVA $F=1.31$ $df=2$ $p>0,1$). ANOVA-testin mukaan tiheyden ja kasvatuksen väliltä löytyi tilastollisesti merkitsevä yhteys ($F=11,65$ $df=2$ $p<0,01$), kuten myös tiheyden ja käytetyn kasvatusneste väliltä ($F=12,63$ $df=1$ $p<0,05$), sekä kasvatusneste ja kasvatuksen yhteisvaikutuksesta tiheyteen ($F=5,65$ $df=2$ $p<0,05$). Tukeyn HSD -testin mukaan tilastollisesti merkitsevät erot olivat seuraavien kasvatuksien välillä: MGSE(WC)-MG(WC), MG(WW)-SE(WC), MGSE(WW)-SE(WC), MG(WW)-MGSE(WC), MGSE(WW)-MGSE(WC). Kasvatuksien SE(WC) ja MG(WC) välillä oli tilastollisesti suuntaa antava tulos ($p<0,1$). Tiheimpiä WW-viljelmistä olivat SE- (KA $3.01E+07$ SD $5.29E+06$), toiseksi tiheimpiä olivat MGSE- (KA $9.23E+06$ SD $3.34E+06$) ja vähiten tiheitä MG- (KA $6.01E+06$ SD $8.11E+05$). WC-elatusliuosviljelmistä tiheimpiä olivat SE- (KA $3.68E+07$ SD $3.70E+05$), toiseksi tiheimpiä MGSE- (KA $2.35E+07$ SD $1.76E+06$) ja vähiten tiheitä olivat MG-viljelmät (KA $2.74E+06$ SD $7.50E+05$).

Viimeisenä päivänä tehdyn mikroskopoinnin perusteella leväkasvatusten solumäärien välillä oli tilastollisesti merkitsevä ero (Kruskall-W. $X^2=7,73$ $df=2$ $p<0,05$). Dunnin testin mukaan merkitsevä ero oli SE ja MGSE kasvatusten välillä ($Z=2,65$ $p<0,05$). Toisin sanoen SE kasvatuksissa oli eri määrä leväsoluja kuin MGSE kasvatuksissa. Mikroskopoinnin perusteella WC viljelmissä keskimäärin eniten leviä oli SE-viljelmissä (KA $2,29E+07$ solua/ml SD $5,07E+05$), toiseksi eniten oli

MGSE-viljelmissä (KA $4,17E+06$ solua/ml SD $1,90E+06$). WW viljelmistä eniten soluja oli MGSE-viljelmissä (KA $2,77E+06$ SD $9,44E+05$) ja toiseksi eniten oli SE-viljelmissä (KA $2,23E+07$ solua/ml SD $6,85E+06$).

Kokeen aikana pH oli kaikissa kasvatuksissa keskimäärin 7,6 (SD 0,06) kokeen ensimmäisenä päivänä. Viimeistä nesteen lisäystä seuranneena päivänä, eli viidentenä päivänä, pH oli keskimäärin 8,3 (SD 0,43). Kokeen viimeisenä päivänä se oli keskimäärin 9,0 (SD 0,55). Vastaavat luvut sähkönjohtokyvyille olivat: ensimmäinen päivä 118 $\mu\text{S}/\text{cm}$ SD 14, viides päivä 285 $\mu\text{S}/\text{cm}$ SD 50 ja viimeisenä koepäivänä 274 $\mu\text{S}/\text{cm}$ SD 40. Liuenneen hapen osalta tulokset ovat seuraavat: ensimmäinen päivä 95 % SD 1 %, viides päivä 98 % SD 2 % ja viimeisenä päivänä 100 % SD 0,6 %.



Kuvat 5 a-c. Kokeen 3 biovolyymit ja solutiheydet, sekä nitraattityppi. Tulokset biovolyymile kuvassa 5a, ja solutiheydelle kuvassa 5b. Kuvassa 5 c nitraattitypen NO₃-N määrä kokeen aikana eri kasvatuksissa. Virhepalkit kuvaavat keskihajontaa (SD).

Lyhenteet: Femtolitra = fl. MG = *Monoraphidium griffithii* viljelmä. SE = *Selenastrum* sp. -viljelmä. MGSE = kaksilajiviljelmä jossa *M. griffithii* ja *Selenastrum* sp. leviä. WW = jätevesiviljelmä. WC = elatusnesteviljelmä.

3.4 Yhteenveto tuloksista

Käytettyjen käsittelyiden välillä (MG, SE tai MGSE) ei ollut eroa kokeen lopun nitraattitypen määrässä. Myöskään käytetyllä kasvatusliuoksella (WW tai WC) ei ollut vaikutusta nitraattitypen määrään kokeen lopussa. Monilajikasvatuksella oli kokeessa 2 tilastollisesti merkitsevä vaikutus fosfaattifosforin määrään verrattaessa SE- ja MGSE-kasvatuksia, joten voidaan todeta, että MGSE- otti enemmän fosfaattifosforia kuin SE-kasvatus. Kasvatuksella oli havaittavissa suuntaa antava vaikutus biovolyyymiin kokeessa 2: MGSE-kasvatukset olivat biovolyyymiltään suurempia kuin MG- tai SE-kasvatukset. Solutiheyden osalta käytetyllä leväkasvatuksella oli tilastollisesti merkitsevä vaikutus kokeissa 2 ja 3. Kokeessa kaksi tiheimpiä olivat MGSE-viljelmät ja kokeessa kolme SE-viljelmät. Myöskin elatusnesteellä ja elatusnesteeseen ja kasvatuksen yhteisvaikutuksella oli tilastollisesti merkitsevä vaikutus tiheyteen kokeessa 3. Jätevedessä kasvatetut levät olivat vähemmän tiheitä kuin WC-liuoksessa kasvatetut, lukuun ottamatta MG-viljelmiä. Lämpivalaisumikroskoopilla lasketuista tiheyksistä ei löytynyt tilastollisesti merkitseviä eroja kokeessa kaksi, mutta kokeessa ero löytyi MGSE- ja SE-viljelmien väliltä. SE-viljelmät olivat kokeessa kolme tiheämpiä kuin MGSE-viljelmät.

4 TULOSTEN TARKASTELU

Kokeen loppua kohden noussut pH saattoi vaikuttaa *M. griffithii* -levän kasvuun, sillä levän optimaalinen pH on 6–7,5 (Tsarenko ym. 2016). Muutos pH:ssa johtui todennäköisesti siitä, että yhteyttämisen aikana levät sitoivat hiilidioksidia, joka on

tunnettu pH:ta laskeva molekyyli. Korkean pH:n on havaittu denitrifikaatiota (Glass & Silverstein 1998), joten korkea pH olisi voinut lisätä denitrifikaatiota kasvatuksissa. On kuitenkin epätodennäköistä, että denitrifikaatiota olisi kasvatuksissa tapahtunut, sillä se on anaerobinen prosessi ja tässä kokeessa liuenneen hapen määrä vaihteli välillä 95–100 %.

Happamuudella on vaikutusta myös fosforin biologiseen saatavuuteen (Cerozi & Fitzsimmons 2016). Cerozi & Fitzsimmons (2016) suosittelevat, että hydroponisissa kasviviljelmissä pH olisi välillä 5.5–7.2. Koska kolmannessa kokeessani pH nousi kokeen puoliväliin mennessä keskimäärin kahdeksaan ja kokeen loppuessa yhdeksään, voisi olettaa, että suurin osa fosforin sidonnasta olisi tapahtunut kokeen alkupuolella pH:n ollessa alhaisempi. Tämä ajatus jää kuitenkin vain hypoteesiksi, koska en mitannut fosfaattifosforia kolmannessa kokeessa, sillä mittariini ei ollut olemassa fosfaattifosforin mittaamiseen soveltuvia mittalaitteita.

Veden sähkönjohtokyvyn on havaittu olevan yhteydessä mikrolevien kasvuun siten, että korkeampi johtokyky on yksi otollisten kasvuolosuhteiden indikaattori luonnossa (Celewicz-Gołdyn & Kuczyńska-Kippen 2017). Kuvien 5 a ja b perusteella on vaikeata havaita, että ominaisjohtavuudella (SPC) ja levien kasvulla olisi yhteyttä. Voi kuitenkin olla, että viimeisinä päivinä hieman hidastuva kasvu oli yhteydessä hieman matalampaan ominaisjohtavuuteen kokeen lopussa (274 $\mu\text{S}/\text{cm}$) kuin kokeen keskivaiheilla (285 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Tosin ilman tilastotestejä on mahdotonta sanoa mitään varmasti.

Hapen kertyminen yhteyttämisen tuotteena kasvatusliuokseen voi haitata mikrolevien kasvua (Kazbar ym. 2019). Kokeessa kolme liuenneen hapen määrä nousi kokeen aikana 95 %:sta noin 100 %:iin. Voi siis olla, että liuennut happi hidasti levien kasvua kokeen edetessä. Kuvaajien 5 a ja b perusteella tätä on kuitenkin yhtä vaikeaa perustella kuin sähkönjohtokyvyn vaikutusta kasvuun. Selityksen uskottavuutta vähentää myös se, että Kazbarin ym. (2019) kokeessa happea oli yli 30 mg/L, kun taas omassa kokeessani 100 % kyllästyneisyys noin 17 asteen

lämpötilassa tarkoittaisi, että happea oli vähemmän kuin 10 mg/L. Kun vielä otetaan huomioon, että ilmastukseen käytetty ilma oli peräisin samasta huoneesta jossa koe tehtiin, ja että koeasetelmat eivät olleet ilmatiiviitä, vaikuttaisi hyvin epätodennäköiseltä, että liuenneen hapen määrällä olisi ollut mitään vaikutusta levien kasvuun.

4.1 Nitraattityppi ja fosfaattifosfori

Kokeen kolme tulosten perusteella (Kuva 5 c) kaikki leväkasvatukset saivat käytettyä suurin piirtein kaiken lisäämäni nesteen ravinteet yhden vuorokauden aikana. Tämä näkyy päivinä 1-4 ylös alas menevänä käyränä, joka näyttäisi palaavan jokaisen huipun jälkeen yhdessä vuorokaudessa suurin piirtein edellisen vuorokauden lukemiin ennen nesteen lisäämistä. Näin ollen vaikuttaisi siltä, että kasvatukseen lisätyn nitraatin ottoaika vedestä oli noin vuorokausi.

Kokeideni tulokset eivät osoittaneet kahden lajin kasvatuksen ja yhden lajin kasvatuksien välillä olevan eroa, kun tarkastellaan nitraattitypen määrää kasvatusvedessä kokeen viimeisenä päivänä. Kokeessa 3 ei myöskään ollut havaittavissa, että nitraattitypen määrä olisi vähentynyt merkitsevästi vuorokauden aikana missään kokeen vaiheessa. Syynä tälle tulokselle voisi olla kokeiden pieni otoskoko, jolloin erot kasvatusten typenkäytön välillä eivät tulleet esiin. Toinen mahdollinen syy on käyttämäni levien samankaltaisuus typen käytön suhteen. Ehkä molemmat sitoivat nitraattityppeä yhtä nopeasti. Tätä väitettä tukee se, että erilajisten, yhden levän kasvatusten väliltä ei löytynyt tilastollisesti merkitseviä tuloksia nitraattitypen otossa. On myös mahdollista, että pienen otoskoon ja levien typensidonnan samankaltaisuuden yhteisvaikutus voi olla selittävä tekijä sille, miksi en saanut tilastollisesti merkitseviä tuloksia nitraattitypen suhteen. Neljäs mahdollinen selitys olisi se, että toinen laji syrjäytti toisen ennen kokeen loppua. Tämä selitys syrjäyttämisestä vaikuttaa kuitenkin epätodennäköiseltä tekemieni mikroskopointien perustella, sillä monilajikasvatuksista löytyi molempia leviä kokeen lopussa. Kokeen kaksi lopussa

leväviljelmien samankaltaiset tiheydet molempien yksilajisten viljelmien ja kaksilajisten viljelmien välillä viittaavat siihen, että molempien levälajien tiheydet ovat koeolosuhteissa samankaltaisia. Näin ollen syrjäyttämistä ei voida päätellä pelkästään kasvatuksien keskitiheyksistä. Voi kuitenkin olla, että syrjäyttämistä tapahtui kokeessa kolme, jossa levien lukumäärät kokeen lopussa poikkesivat monilajikasvatusten ja yksilajisten kasvatuksien välillä. Käyttämäni levät *M. griffithii* ja *Selenastrum* sp. kuuluvat samaan sukuun *Selenastraceae*, joten lähisukuisuudesta johtuva kilpailu voisi siis olla mahdollinen tuloksia selittävä tekijä. Hypoteesia sukulaisuuden vaikutuksesta kilpailuun tukee Naughton ym. (2015) tutkimus, jossa viherlevien havaittiin kilpailevan enemmän mitä läheisempää sukua ne olivat toisilleen.

Yksilajikasvatuksien väliltä ei löytynyt tilastollisesti merkitseviä tuloksia nitraattitypen määrässä, mikä viittaa siihen, että kaksilajikasvatusten ja yksilajikasvatusten eroavaisuuksien puute ei johdu lajien välisestä kilpailusta tai muusta vuorovaikutuksesta. Jos lajit vuorovaikuttaisivat, niin sen tulisi näkyä tuloksissa kasvaneena tai vähentyneenä nitraattitypen määränä verrattuna yksilajikasvatuksiin.

Kahden lajin viljelmä (MGSE) poisti vähemmän fosfaattifosforia kuin ainoastaan *Selenastrum* sp. -levää sisältäneet viljelmät. Tulos on yhteneväinen aiemman tutkimuksen kanssa, jossa monilajiset *Scenedesmus obliquus* -lajia sisältäneet viljelmät poistivat huonommin fosfaattifosforia kuin pelkkää *Scenedesmus obliquus* -levää sisältäneet viljelmät (Qu ym. 2019). Erona omaan tutkimukseeni Qu ym. (2019) kasvattivat leviään 20 päivää, kun omat kokeeni kestivät 8–10 päivää. Qu ym. (2019) kokeissa huomattavimmat muutokset fosfaattifosforin määrässä tapahtuivat päivän 10 jälkeen, ja fosfaatin määrä oli lähtiessä noin kymmenkertainen omien kokeideni fosfaattimääriin. Näin ollen oma kokeeni ja Qu ym. (2019) tutkimuksen antamat tulokset viittaavat *Selenastrum* yksilajikasvatusten olevan parempia fosfaattifosforin sitoja erilaisissa fosfaattifosforin pitoisuuksissa. Voi kuitenkin olla,

että tulosten samankaltaisuus on pelkkää yhteensattumaa, sillä en havainnut vastaavaa ilmiötä toisessa fosfaattifosforia tutkineessa kokeessa.

Tyypillisesti makeissa vesissä fosfori on kasvua rajoittava ravinne (Thomas & Cebrian 2008). Myöskin kokeissani fosforia oli vähemmän kaikissa kasvatuksissa kuin tyypeä. Näin ollen voisi odottaa, että leväviljelmät käyttäytyisivät kuin luonnossa, eli niiden kasvua rajoittaisi fosforin saatavuus, eikä nitraatin saatavuus. Tätä ajatusta tukevat myös tämän tutkimuksen tulokset, sillä nitraatin määrä kokeen lopussa ei ollut yhteydessä käytettyyn kasvatukseen, kun taas fosfaattifosforin ja kasvatuksen välillä vaikuttaisi olevan tilastollisesti suuntaa antava yhteys.

4.2 Biomassa ja tiheys

Kaksilajikasvattamisella voi olla vaikutusta viljelmän biovolyymiin, mutta tässä tutkimuksessa havaittiin vain yksi tilastollisesti suuntaa antava tulos. Kokeessa 2 MGSE-viljelmä oli biovolyymitaan suurempi kuin MG- tai SE-viljelmät. Tulos on käänteinen kuin Roelken (2017) havainto siitä, että korkeampi biodiversiteetti ennustaisi matalampaa tuottavuutta leväkasvatuksissa.

Kasvatusten tiheys oli huomattavan erilainen kaksilajisissa kasvatuksissa kuin yksilajisissa kasvatuksissa. Kokeen kaksi perusteella MGSE- ja MG-kasvatusten välillä on tilastollisesti suuntaa antava ero. Saamani tulokset biomassasta ja tiheydestä kokeessa kaksi voisivat johtua siitä, että *Selenastrum* sp. -levä, pienempänä ja tiheämpänä kuin *M. griffithii*, muodostaisi suurimman osan biomassasta. Koska CASY-mittalaite ei erotellut eri lajeja, asiaa ei voida varmistaa sen antamista tuloksista. Mikroskopointituloksista tehdyistä tiheyslaskelmista ei kuitenkaan löytynyt tilastollisesti merkitseviä eroja eri viljelmien välillä kokeessa kaksi, joten linkki *Selenastrum* sp. -levän ja kaksilajisten kasvatusten tiheyden välillä jää epäselväksi.

Kokeesta kolme löytyi eroja MGSE-, SE- ja MG-WC-viljelmien välillä CASY-datassa ja mikroskopoinnista lasketussa tiheysdatassa. Kokeen kolme tulos viittaa siihen, että SE voi kasvaa tiheämmäksi kuin MG. Vaikuttaisi siis siltä, että kaksilajikasvatuksien ja yksilajikasvatuksien väliset erot tiheydessä eivät johdu siitä, että *Selenastrum* -levän läsnäolo saa monilajisen viljelmän tiheyden muistuttamaan yksilajista *Selenastrum* sp. viljelmää, vaan siitä, että lajit vuorovaikuttavat keskenään. Tämä vuorovaikutus näkyy siis siinä, että monilajisen viljelmän tiheys on uniikki monilajiselle viljelmälle. Jos näin ei olisi tulisi viljelmän tiheyden muistuttaa jompaa kumpaa yksilajisista viljelmistä siitä riippuen, kumpi laji dominoi viljelmää.

Roelken (2017) tutkimuksessa havaittiin, että toisiaan täydentävät levälajit tuottavat enemmän biomassaa kuin toiminnallisesti hyvin erilaiset lajit. Tämä ajatus saa tukea tutkimuksestani, vaikka tutkinkin vain kahta lajia. Kaksilajiset kasvatukset olivat biomassaan läheisesti liittyvän parametrin, biovolyymin, perusteella tuottoisampia. Myös tiheyden suhteen vaikuttaisi siltä, että monilajisuus voi parantaa *M. griffithii* levien tuottavuutta.

4.3 Käytetyn kasvatusnesteiden vaikutus

Käytetty kasvatusneste, joko WC tai WW, vaikuttivat kokeessa 3 kasvatuksien tiheyteen. MGSE-kasvatukseen vaikutti se, oliko kasvatus laitettu WW- vai WC-nesteeseen kasvamaan. Yllättäen vastaavaa eroa ei löytynyt eri nesteissä kasvatettujen MG- ja SE-viljelmien väliltä. Jokin saa MGSE-viljelmän kasvamaan tiheämmäksi WC-nesteessä kuin WW-nesteessä. Vaikuttaisi siis siltä, että kaksilajikasvatukset ovat herkempiä kasvatusmedialle kuin yksilajikasvatukset. Tulos on ristiriitainen aiemman tutkimustuloksen kanssa, jonka perusteella useamman lajin läsnäolo tekisi kasvatuksista vakaampia (Corcoran & Boeing 2012). Tosin on huomattava, että Corcoran & Boeing (2012) tutkimuksessa havaittiin useamman kuin kahden lajin aiheuttavan edellä mainitun vakauttavan ilmiön. Voisi siis olla, että kaksilajisuus on ristiriitojen vaivaama siirtymä monilajisten ja

yksilajisten viljelmien välillä, jossa molempien kasvatustapojen haitat korostuvat ilman kummastakaan saatavia hyötyjä. On myös otettava huomioon, että Corcoran & Boeing (2012) tutkivat häiriötilojen vaikutusta yhteisöön. Häiriöiden puutos tutkielmassani voisi selittää sen, miksi yhden lajin kasvatuksien välillä ei ollut eroja kasvatusnesteestä huolimatta. WC-elatusnesteeseen alempi nitraattityyppi- ja fosfaattifosforipitoisuus saattoi edistää levien kasvua. Viherlevien on havaittu kasvavan aluksi biomassalla mitattuna nopeammin, jos niitä viljellään vähäravinteisissa eikä runsasravinteisissa olosuhteissa (Shurin ym. 2014). Tämä voisi selittää kuvaajan 5 c, jossa WW kasvatukset sisältävät enemmän typpeä kokeen lopussa tai typen määrä on lähtenyt myöhemmin laskuun kuin WC-kasvatuksissa.

4.4 Loppuyhteenveto ja jatkotutkimuskohteet

Jatkotutkimuksissa suurempi otoskoko saattaisi olla tarpeen, jotta mahdolliset vaikutukset saataisiin esiin biovolyymin ja kaksilajikasvatuksen sekä biovolyymin ja tiheyden välillä. Myös muutokset levien ravinteidenottokyvyssä voisivat tulla selvemmin esiin, jos otoskoko kasvatettaisiin. Koska levien tiheys vaihtelee lajista riippuen, laitoin kokeen alussa toista kasvatusta enemmän biomassojen tasaamiseksi. Jos molempia lajeja sentrifugoitaisiin niin, että levien tiheys olisi kasvatukseen lisättäessä sama, voitaisiin saada erilaisia tuloksia. Vuorokausirytmillä tiedetään olevan vaikutusta levien kasvuun, joten jatkotutkimuksessa jatkuvan valaistuksen sijaan voitaisiin valot ajastaa sammumaan yön ajaksi. Esimerkiksi Khaton ym. (2019) havaitsivat *Selenastrum bibraianum* -levän kasvun eroavan luontoa matkivan vuorokausirytmitetyn valaistuksen ja jatkuvan keinovalaistuksen välillä, niin että *S. bibraianum* kasvoi paremmin luonnonvalaistuksessa. Myös kasvatusten saamaa PAR:n määrää voitaisiin kasvattaa esimerkiksi asentamalla tehokkaampia tai useampia lamppeja. Tutkimuksessani viljelmät saivat suhteellisen vähän PAR-säteilyä, 30–45 mikroeinsteiniä/m²*s. Shurin ym. (2014) on havainnut vähäisellä valolla olevan

negatiivinen vaikutus levien kykyyn kilpailla tyydestä ja fosfaatista. Näin ollen lisäämällä valon määrää mahdolliset erot kasvatusten välisessä ravinteiden käytössä voisivat tulla selvemmin esille. Tässä tutkielmassa kasvatin leviäni samassa kasvatuspullossa enkä poistanut niistä nestettä koko kokeen aikana, lukuun ottamatta näytteitä. Näin ollen jäi vielä epäselväksi, kuinka hyvin valitsemani levät voisivat toimia, jos se integroitaisiin pysyväksi osaksi kiertovesisysteemin suodatusta.

Koska käyttämäni levät olivat suhteellisen läheistä sukua (Chlorophyta) ja samaa kokoluokkaa, tutkimusta voitaisiin laajentaa näiltä osin. Sukulaisuuden vaikutusta voitaisiin tutkia tarkemmin käyttämällä kauempaa sukua olevia lajeja samanaikaisesti lähisukuisten kanssa. Myös ravinne- ja ominaisuuskilpailun vaikutus jäi epäselväksi, koska levät olivat kooltaan ja elinympäristöiltään varsin samanlaisia. Tulokset voisivat muuttua huomattavasti, jos näitä tekijöitä säädettäisiin. Ravinnekilpailuteoriaa ja sukulaisuusteoriaa voitaisiin tutkia yhtäaikaisesti siten, että koettani laajennettaisiin ottamalla mukaan kolmanneksi leväksi jokin toinen *Monoraphidium* -levä, jonka ravinteiden tarve poikkeaa *M. griffithii* -levän ravinnontarpeesta. Tällöin avautuisi myös mahdollisuus tutkia onko ravinnekilpailun ja sukulaisuuden välillä mahdollista yhteisvaikutusta. Myös mahdollisimman kaukaista sukua olevien lajien kasvatus, joiden ravinteiden tarve olisi joko hyvin samanlainen tai erilainen kuin *M. griffithii* -levällä, avaisi mahdollisuuden tutkia hypoteesien välistä suhdetta. Jos kaukaista sukua olevien havaittaisiin heikentävän kasvatuksien kasvua, lähisukulaisuushypoteesin vaikutus *M. griffithii* -levään voitaisiin todeta olevan vähäinen tai olematon verrattaessa ravinnonhankintahypoteesiin.

Kiitokset

Kiitän suuresti molempia ohjaajiani Katja Pulkista ja Juhani Pirhosta. Ilman heidän opastustaan ja pitkäjänteisyyttään graduni tekemiseen olisi kulunut moninkertainen määrä aikaa ja vaivaa. Tutkimuksen kulut rahoitettiin Juhani Pirhosen johtamasta hankkeesta Biologiset ravinnesiepparit (EMKR 2017-2020). Apurahaa sain myös Kerttu Saalasti säätiöltä ja Maa- ja vesitekniikan tuki ry:ltä.

Kirjallisuus

- Allan D. & Castillo M. 2008. *Stream ecology; structure and function of running waters*. Second edition. Springer Dordrecht Netherlands.
- Bacellar Mendes L.B. & Vermelho A.B. 2013. Allelopathy as a potential strategy to improve microalgae cultivation. *Biotechnology for biofuels* 6: 152, doi: 10.1186/1754-6834-6-152.
- Badiola M., Basurko O.C., Piedrahita R., Hundley P. & Mendiola D. 2018. Energy use in recirculating aquaculture systems (RAS): A review. *Aquacult Eng* 81: 57-70, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2018.03.003>.
- Beardall J., Borowitzka M., Raven J. 2016. *The physiology of microalgae*. Springer International Publishing AG, Cham.
- Becker E.W. 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol Adv* 25: 207-210, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.002>.
- Bregnballe J. 2015 *A guide to recirculation aquaculture. An introduction to the new environmentally friendly and highly productive closed fish farming systems*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and Eurofish International Organisation. Opas.

- Campbell N., Reece J., Urry L., Cain M., Wasserman S., Minorsky P. & Jackson R. 2015. *Biology; a global approach*. Pearson Education Limited, Edinburgh 10. painos.
- Cardinale B.J. 2011. Biodiversity improves water quality through niche partitioning. *Nature (London)* 472: 86-89, doi: 10.1038/nature09904.
- Celewicz-Gołdyn S. & Kuczyńska-Kippen N. 2017. Ecological value of macrophyte cover in creating habitat for microalgae (diatoms) and zooplankton (rotifers and crustaceans) in small field and forest water bodies. *PloS one* 12: e0177317, doi: 10.1371/journal.pone.0177317.
- Cerozi B.d.S. & Fitzsimmons K. 2016. The effect of pH on phosphorus availability and speciation in an aquaponics nutrient solution. *Bioresour Technol* 219: 778-781, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.079>.
- Corcoran A.A. & Boeing W.J. 2012. Biodiversity increases the productivity and stability of phytoplankton communities. *PLoS one* 7: e49397, doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053277>
- Davidson J., Good C., Welsh C. & Summerfelt S.T. 2014. Comparing the effects of high vs. low nitrate on the health, performance, and welfare of juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* within water recirculating aquaculture systems. *Aquacult Eng* 59: 30-40, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2014.01.003>.
- Donald D.B., Bogard M.J., Finlay K., Bunting L. & Leavitt P.R. 2013. Phytoplankton-specific response to enrichment of phosphorus-rich surface waters with ammonium, nitrate, and urea. *PLoS one* 8: e53277, doi: 10.1371/journal.pone.0053277
- Ferreira G.F., Ríos Pinto L.F., Maciel Filho R. & Fregolente L.V. 2019. A review on lipid production from microalgae: Association between cultivation using

waste streams and fatty acid profiles. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 109: 448-466, doi: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.04.052>

Fields M.W., Hise A., Lohman E.J., Bell T., Gardner R.D., Corredor L., Moll K., Peyton B.M., Characklis G.W. & Gerlach R. 2014. Sources and resources: importance of nutrients, resource allocation, and ecology in microalgal cultivation for lipid accumulation. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 4805-16, doi: [10.1007/s00253-014-5694-7](https://doi.org/10.1007/s00253-014-5694-7)

Flynn K. 2020. Enhancing microalgal production -constructing decision support tools using system dynamics modelling. https://www.enhancemicroalgae.eu/wpcontent/uploads/2019/07/EMA_DST_4.pdf.

Glass C. & Silverstein J. 1998. Denitrification kinetics of high nitrate concentration water: pH effect on inhibition and nitrite accumulation. *Water Res* 32: 831-839, doi: [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)00260-1](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00260-1).

Guillemin M., Faugeron S., Destombe C., Viard F., Correa J.A. & Valero M. 2008. Genetic variation in wild and cultivated populations of the haploid-diploid red alga *Gracilaria chilensis*: how farming practices favor asexual reproduction and heterozygosity. *Evolution* 62: 1500-1519, doi: [10.1111/j.1558-5646.2008.00373.x](https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00373.x)

Hong Y. & Xu K. 2013. Co-existing growth relationships of a lipid-producing alga with three microalgae. *Allelopathy Journal* 32: 301-314.

Jin G. & Bierma T. 2018. Phosphorus recovery from surface waters: protecting public health and closing the nutrient cycle. *J Environ Health* 81: 16-22.

Kamalanathan M., Chaisutyakorn P., Gleadow R. & Beardall J. 2018. A comparison of photoautotrophic, heterotrophic, and mixotrophic growth for biomass

production by the green alga *Scenedesmus* sp. (*Chlorophyceae*). *Phycologia* 57: 309-317, doi: 10.2216/17-82.1

Kazbar A., Cogne G., Urbain B., Marec H., Le-Gouic B., Tallec J., Takache H., Ismail A. & Pruvost J. 2019. Effect of dissolved oxygen concentration on microalgal culture in photobioreactors. *Algal Research* 39: 101432, doi: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101432>.

Khatoon H., Norazira Abdu Rahman, Suleiman S.S., Banerjee S. & Ambok Bolong Abol-Munafi. 2019. Growth and proximate composition of *Scenedesmus obliquus* and *Selenastrum bibrainum* cultured in different media and condition. 89: 251-257. doi: <https://doi.org/10.1007/s40011-017-0938-9>

Lawton R.J., Mata L., de Nys R. & Paul N.A. 2013. Algal bioremediation of waste waters from land-based aquaculture using ulva: selecting target species and strains. *PLoS One* 8: e77344, doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077344>

Lv J., Wang X., Jia F., Liu Q., Fangru Nan, Jiao X. & Xie S. 2019. Comparison of growth characteristics and nitrogen removal capacity of five species of green algae. *J Appl Phycol* 31: 409-421, doi: <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1542-y>

Mohan V. S. & Devi M.P. 2014. Salinity stress induced lipid synthesis to harness biodiesel during dual mode cultivation of mixotrophic microalgae. *Bioresource technology* 165: 288-294, doi: 10.1016/j.biortech.2014.02.103.

Naughton H.R., Alexandrou M.A., Oakley T.H. & Cardinale B.J. 2015. Phylogenetic distance does not predict competition in green algal communities. *Ecosphere* 6: 1-19, doi: <http://dx.doi.org/10.1890/ES14-00502.1>.

- Norulhuda Mohamed Ramli, Giatsis C., FatimahYusoff, Verreth J. & Verdegem M. 2018. Resistance and resilience of small-scale recirculating aquaculture systems (RAS) with or without algae to pH perturbation. *PLoS One* 13: e0195862, doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195862>
- Ojanen S., Tyystjärvi E., Holmberg H., Kouhia M. & Ahtila P. 2017. Can bacterial biofiltration be replaced by autotrophic organisms in recirculating freshwater aquaculture? *Aquacult Int* 25: 1427-1440, doi: 10.1007/s10499-017-0126-1
- Ou L., Huang X., Huang B., Qi Y. & Lu S. 2015. Growth and competition for different forms of organic phosphorus by the dinoflagellate *Prorocentrum donghaiense* with the dinoflagellate *Alexandrium catenella* and the diatom *Skeletonema costatum* s.l. *Hydrobiologia* 754: 29-41, doi: <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1542-y>
- Paerl H.W. 2014. Mitigating harmful cyanobacterial blooms in a human- and climatically-impacted world. *Life* 4: 988-1012, doi: <https://doi.org/10.3390/life4040988>
- Porto B., Gonçalves A.L., Esteves A.F., Selene M A Guelli Ulson de Souza, Antônio A Ulson de Souza, Vilar V.J.P. & Pires J.C.M. 2020. Microalgal growth in paper industry effluent: coupling biomass production with nutrients removal. *Applied Sciences* 10: 3009, doi: <https://doi.org/10.3390/app10093009>
- Qiu Y., Wang Z., Liu F., Liu J., Tan K. & Ji R. 2019. Inhibition of *Scenedesmus quadricauda* on *Microcystis flos-aquae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 103: 5907-5916, doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09809-9>
- Qu Z., Duan P., Cao X., Liu M., Lin L. & Li M. 2019 Comparison of monoculture and mixed culture (*Scenedesmus obliquus* and wild algae) for C, N, and P removal

and lipid production. *Environmental Science and Pollution Research* 26:20961–20968 doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05339-z>

Razzak S.A., Hossain M.M., Lucky R.A., Bassi A.S. & de Lasa H. 2013. Integrated CO₂ capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 27: 622-653, doi: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.05.063>.

Redfield A. 1934. On the proportions of organic derivatives in the sea water and their relation to the composition of plankton.

Rengefors K. & Legrand C. 2001. Toxicity in *Peridinium aciculiferum*-an adaptive strategy to outcompete other winter phytoplankton? 46.

Richmond A. & Hu Q. 2013. *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology*. John Wiley & Sons, Incorporated, Hoboken.

Roelke D.L. 2017. Applying principles of resource competition theory to microalgae biomass production: a more refined relationship between species richness and productivity. *Algal research (Amsterdam)* 25: 431-438, doi: [10.1016/j.algal.2017.06.002](https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.06.002).

Ruiz P., José Miguel Vidal, Sepúlveda D., Torres C., Villouta G., Carrasco C., Aguilera F., Nathaly Ruiz-Tagle & Urrutia H. 2020. Overview and future perspectives of nitrifying bacteria on biofilters for recirculating aquaculture systems. *Reviews in Aquaculture* 12: 1478-1494, doi: [10.1111/raq.12392](https://doi.org/10.1111/raq.12392)

Schreiber C., Schiedung H., Harrison L., Briesse C., Ackermann B., Kant J., Schrey S.D., Hofmann D., Singh D., Ebenhöf O., Amelung W., Schurr U., Mettler-Altman T., Huber G., Jablonowski N.D. & Nedbal L. 2018. Evaluating potential of green alga *Chlorella vulgaris* to accumulate phosphorus and to fertilize nutrient-poor soil substrates for crop plants. *J Appl Phycol* 30: 2827-2836, doi: <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1390-9>

- Shurin J., Mandal S. & Abbott R. 2014. Trait diversity enhances yield in algal biofuel assemblages. *The Journal of applied ecology* 51: 603-611, doi: 10.1111/1365-2664.12242.
- Smith J.G. 2016. *Organic chemistry*. Fifth Edition. McGraw-Hill Education, New York, NY 10121, 2 Penn Plaza.
- Solovchenko A.E., Ismagulova T.T., Lukyanov A.A., Vasilieva S.G., Konyukhov I.V., Pogosyan S.I., Lobakova E.S. & Gorelova O.A. 2019. Luxury phosphorus uptake in microalgae. *J Appl Phycol* 31: 2755-2770, doi: <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01831-8>
- Stevčić Č, Pulkkinen K. & Pirhonen J. 2019. Screening of microalgae and LED grow light spectra for effective removal of dissolved nutrients from cold-water recirculating aquaculture system (RAS) wastewater. *Algal Research* 44: 101681, doi: 10.1016/j.algal.2019.101681.
- They N.H., Amado A.M. & Cotner J.B. 2017. Redfield ratios in inland waters: higher biological control of c:n:p ratios in tropical semi-arid high water residence time lakes. 8.
- Thomas S.A. & Cebrian J. 2008. Ecosystem patterns and processes. Teoksessa: Jørgensen S.E. & Fath B.D. (toim.), *Encyclopedia of Ecology*, Academic Press, Oxford, s. 1139-1148.
- Tsarenko P., Borysova O. & Blume Y. 2016. High biomass producers and promising candidates for biodiesel production from microalgae collection IBASU-A(Ukraine). *Oceanological and Hydrobiological Studies* 45: 79-85, doi: 10.1515/ohs-2016-0008
- Valtonen E., Hakalahti-Sirén T., Karvonen A. ja Pulkkinen K. 2012. Suomen kalojen loiset. Gaudeamus. Helsinki.

- Veyel D., Erban A., Fehrle I., Kopka J. & Schroda M. 2014. Rationales and approaches for studying metabolism in eukaryotic microalgae. *Metabolites* 4: 184-217, doi:10.3390/metabo402018
- Vielma J., Kiuru T., Koskela J., Pulkkinen J. Recirculating aquaculture internetsivusto <https://www.luke.fi/en/natural-resources/fish-and-the-fishing-industry/aquaculture/recirculating-aquaculture/> (Luettu 14.2.2021)
- Wang H., Gao L., Chen L., Guo F. & Liu T. 2013. Integration process of biodiesel production from filamentous oleaginous microalgae *Tribonema minus*. *Bioresour Technol* 142: 39-44, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.058>.
- Wei R., Li H., Chen Y., Hu Y., Long H., Li J. & Xu C.C. 2020. Environmental issues related to bioenergy. *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*, Elsevier.
- Yadav G. & Sen R. 2017. Microalgal green refinery concept for biosequestration of carbon-dioxide vis-à-vis wastewater remediation and bioenergy production: Recent technological advances in climate research. *Journal of CO2 Utilization* 17: 188-206, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2016.12.006>.
- Yao L., Shi J. & Miao X. 2015. Mixed wastewater coupled with CO₂ for microalgae culturing and nutrient removal. *PLoS One* 10: e0139117, doi: [10.1371/journal.pone.0139117](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139117)