

Mastergradsoppgave

Mads Preben Jenssen

Effektene av ulik lysintensitet og  
nitratkonsentrasjon på vekst og  
microcystinkonsentrasjon hos  
*Microcystis aeruginosa*



**Høgskolen i Telemark**

Fakultet for allmennvitenskapelige fag

Masteroppgave i Natur-, Helse- og Miljøvern

Mads Preben Jenssen

Effektene av ulik lysintensitet og  
nitratkonsentrasjon på vekst og  
microcystinkonsentrasjon hos *Microcystis  
aeruginosa*

Høgskolen i Telemark  
Fakultet for allmennvitenskapelige fag  
Institutt for natur-, helse- og miljøvern fag  
Hallvard Eikas plass  
3800 Bø i Telemark

<http://www.hit.no>

© 2014 Mads Preben Jensen

# Sammendrag

Oppblomstring og toksinproduksjon hos cyanobakterier har lenge vært et problem verden over og det er mye forskning på dette området. En av de bakteriene som det er forsket mest på er *Microcystis aeruginosa*, og som produserer toksinet microcystin. De to viktigste elementene for vekst og microcystinproduksjon er lys og temperatur, mens andre viktige elementer er nitrogen, fosfor og fem sporstoffer. I denne oppgaven har vekst og microcystinkonsentrasjon ved ulik lysintensitet og nitratkonsentrasjon blitt studert.

I denne studien ble en ikke-microcystinproduserende mutant (MCYB<sup>-</sup>) og en toksisk stamme av *M. aeruginosa* undersøkt (PCC 7806) under lav (8  $\mu$ E) og høy (104  $\mu$ E) lysintensitet og med ulike nitratkonsentrasjoner (normalt O<sub>2</sub>-medium og 1/50 av normal nitratkonsentrasjon (10 mg NaNO<sub>3</sub>/L)). Dyrkingsforsøkene varte i 4 uker, med uttak av prøver til analyse hver andre dag.

Lys var det mest avgjørende for vekst og microcystinkonsentrasjon. Nitrat var begrensende for vekst og microcystinkonsentrasjon ved lavere lysintensitet hvor omdanninga av nitrat til ammonium ikke ble hemmet av høy lysintensitet. Ved høy lysintensitet virket lyset som en stressfaktor fordi vekst og microcystinkonsentrasjon ble betydelig lavere enn ved lav lysintensitet, uavhengig av nitratkonsentrasjonen. Begge stammene hadde likt vekstmønster ved lav lysintensitet. Ved høy lysintensitet hadde mutanten en lag-fase på 12 dager og toksinprodusenten en lag-fase på 18 dager. Mutanten hadde like god vekst ved høy lysintensitet som ved lav lysintensitet. Dette kan tyde på at mutanten tilpasser seg overgangen til høy lysintensitet bedre og raskere enn den toksiske stammen.

Alt i alt viser dette at lys og nitrat er to viktige faktorer for microcystinproduksjon og vekst.

# Abstract

Blooming and toxin production of cyanobacteria has long been a problem world wide and there is much research on this area. One of the most-studied cyanobacteria is *Microcystis aeruginosa*, which produces the toxin microcystin. The two most important factors for growth and microcystin production are light and temperature, but other important factors are nitrogen, phosphorus and five microelements. In this study, growth and microcystin levels at different light intensity and nitrate concentrations has been studied.

In this study, a non-toxicogenic mutant (MCYB<sup>-</sup>) and a toxic strain of *M. aeruginosa* (PCC7806) were cultivated under low (8  $\mu$ E) and high (104  $\mu$ E) light intensity and with different nitrate concentrations (normal O<sub>2</sub>-medium and 1/50 of normal nitrate concentrations (10 mg NaNO<sub>3</sub>/L). The cultivation experiments lasted for 4 weeks each and with samples taken for analysis every second day.

Light was the most important factor for growth and microcystin production. Nitrate was limiting for growth and microcystin concentration at lower light intensity where the transformation of nitrate to ammonium was not inhibited by high light intensity. At high light intensity the light functions as a stress factor and growth and microcystin production were much lower than at low light intensity, independent of the nitrate concentrations. Both strains had similar growth patterns at low light intensity. At high light intensity the mutant had a lag phase of 12 days and the toxic strain had a lag phase of 18 days. The mutant had the same good growth at high light intensity than at low light intensity. This may indicate that the mutant strain adapts to the transition to high light intensity better and faster than the toxic strain.

All in all this demonstrates that light and nitrate are two important factors for microcystin production and growth.

# Innholdsfortegnelse

Sammendrag .....	3
Abstract .....	4
Innholdsfortegnelse .....	5
Forord.....	6
<b>1 Innledning .....</b>	<b>7</b>
1.1 Generelt .....	7
1.2 Problemstilling og målsetning.....	10
<b>2 Material og metode.....</b>	<b>11</b>
2.1 Eksperiment oppsett .....	11
2.2 Analysemetoder.....	11
<b>3 Resultater og diskusjon .....</b>	<b>14</b>
3.1 Vekst av <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	14
3.2 Proteinmengde (biomasse) .....	16
3.3 Microcystin.....	17
3.4 Nitrat.....	19
3.5 Økologisk perspektiv .....	21
<b>4 Konklusjon .....</b>	<b>22</b>
<b>5 Referanser/litteraturliste.....</b>	<b>23</b>
<b>Vedlegg .....</b>	<b>26</b>

# Forord

Denne masteroppaven er den ene halvdel av masterstudiet natur, helse og miljøvern ved Høgskolen i Telemark avd. Bø. Oppgaven omfatter 60 studiepoeng og ble gjennomført skoleåret 2013/2014.

Prosessen med å lage en masteroppgave har vært lang og endelig har jeg kommet til siste vers på visa. Det har vært greie dager og noen tunge dager, men jeg har lært masse. Både når det gjelder oppgaveskriving, labarbeid og kunnskap om disse fæle små bakteriene. Jeg hadde aldri klart det uten enkelte personer. Første av alt vil jeg takke veilederne mine, Synne Kleiven og Hans Utkilen, for god hjelp og veiledning. Bjørn Steen og Karin Brekke Li fortjener takk for hjelp og veiledning på laben. Andrew Jenkins fortjener også en takk for korrekturlesing av mitt sammendrag på engelsk. Hadde ikke klart det uten dere. Den siste jeg vil takke er bikkja mi, som har hatt super tålmodighet når matfar har hatt lange dager på laben.

Porsgrunn, 14. Mai 2014

Mads Preben Jenssen

# 1 Innledning

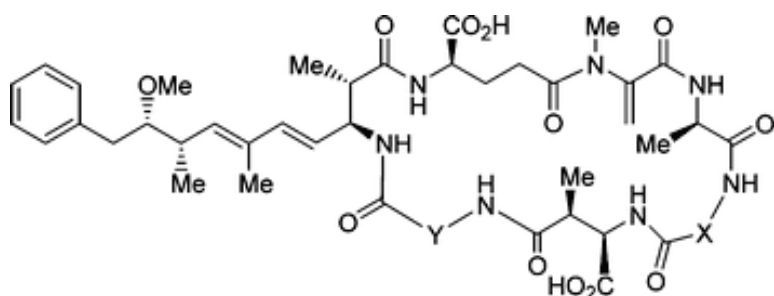
## 1.1 Generelt

Cyanobakterier er fotosyntetiske prokaryoter som inneholder klorofyll a. De kan være encellede (f. eks. *Chroococcus*) eller trådforma (f. eks. *Anabaeba*) som enten lever i kolonier eller for seg selv. (Whitton og Potts 2000). De eneste elementene de trenger for å overleve er vann, karbondioksid, uorganiske næringsstoffer og lys (Mur m. fl. 1999). Noen slekter av planktoniske cyanobakterier skiller ut toksiner. Dette kan være for å unngå konkurranse fra andre bakterier og plankton, og predasjon fra dyregrupper som krepsdyr, fisk og pattedyr (Økland, 1996). Toksinenes egentlige rolle i naturen er uklar og forsket lite på (Sivonen og Jones). Cyanobakterier lever nesten over alt på kloden. De fleste lever i vann (ferskvann, marint og brakkvann), andre terrestrisk, noen kan finnes i vulkanske, varme kilder mens andre igjen lever i arktiske strøk (Gjølme m. fl. 2010). Bakteriegruppen er også veldig gammel og de første sporene kan dateres helt tilbake til prekambrium (Schopf 2000), og var en av de første organismegruppene som invaderte land (Mur m. fl. 1999).

Rapporter om oppblomstring av cyanobakterier i ferskvann er økende i mange land (Whitton og Potts 2000) Oppblomstringer av hepatotoksiner (microcystin og nodularin) har blitt rapportert fra alle kontinenter og nesten over hele verden. Neurotoksiske oppblomstringer er litt mindre vanlig, men det er rapportert om tilfeller i Nord-Amerika, Europa og Australia. Kort oppsummert er oppblomstring av cyanobakterier et globalt problem, og gjennomsnittlig er 59 % av oppblomstringene toksiske (Sivonen og Jones 1999). I Norge er de fleste oppblomstringer observert i den sørlige halvdel av landet. Det virker å være en sammenheng mellom områder hvor det drives intensivt jordbruk og oppblomstring av cyanobakterier (Folkehelseinstituttet 2003 og Gjølme m. fl. 2010). Det er til sammen registrert 20 arter av cyanobakterier som produserer toksiner i norske vannforekomster (Folkehelseinstituttet 1999). Det er forskjell på oppblomstringer i tempererte og tropiske områder. I tempererte områder forekommer oppblomstring som regel på sensommeren da temperaturen er mer optimal. Om våren og forsommeren er vanntemperaturen ofte lav og mer optimal for grønnalger. I tropiske områder er sesongforskjellene ofte ikke stor nok til at andre planteplanktonarter kan konkurrere ut cyanobakterier. Det er som oftest en kontinuerlig dominans av cyanobakterier i de vannforekomstene de er presentert (Bartram m. fl. 1999). Skader på mennesker og pattedyr på grunn av cyanotoksiner er lenge dokumentert, og det første dokumenterte dødelige utfallet hos mennesker var for over tusen år siden og stammer



fra Han-dynastiet i Kina. Det ble rapportert om at flere soldater døde etter å ha krysset og drukket av en grønn elv (Folkehelseinstituttet 1999). I nyere tid er tragedien i Brasil en av de verste, der over 45 pasienter døde etter at hadde fått i seg dialysevæske som inneholdt microcystin (Ginn m. fl. 2009). Av cyanotoksiner er de sykliske peptidene (microcystiner og nodularin) de som er den største trusselen for mennesker, og man blir vanligvis eksponert for dette gjennom å drikke vannet. Alkaloide neurotoksiner har bare vist akutte reaksjoner på pattedyr. En vanlig eksponeringsvei for disse er via skalldyr og fisk som har tilhørighet til den forurensete vannforekomsten (Dow og Swoboda 2010). Mange av dødstilfellene blant dyr er husdyr på beite, men også ville dyr som neshorn (*Rhinocerotidae*), sebra (*Equus zebra*) og gnagere har blitt beskrevet. Man trenger ikke alltid drikke vannet for å få skader eller dødelig utfall. Hunder (*Canis lupus familiaris*) har dødd etter å ha slikket seg i pelsen etter en badetur (Chorus m. fl. 2000) og mennesker har fått hudirritasjoner (Dow og Swoboda 2010).



Figur 1: Den generelle strukturen på et microcystinmolekyl. X og Y er variable L-aminosyrer.

Det finnes flere ulike toksintyper hos cyanobakterier og en av de som er mest forsket på er microcystin. Toksinet ble først påvist hos bakterieslekten *Microcystis* (Metcalf og Codd 2012), men det finnes også andre slekter (*Anabaena*, *Planktothrix* og *Gomphosphaeria*) som produserer microcystin. Microcystin er et syklisk peptid (figur 1) som har en molekylvekt på rundt 1000 dalton. Det finnes ca. 90 varianter av microcystin og toksisiteten varierer (Gjølme m. fl. 2010). Årsaken til at det finnes så mange ulike microcystiner er fordi peptidet har to områder (X og Y) som kan settes sammen med ulike aminosyrer. X er som oftest leucin, arginin, tyrosin eller fenylalanin, mens Y som regel er arginin, alanin eller methionin (Dow og Swoboda 2000). Microcystin er et hepatotoksin og det vil si at den kan skade leveren, men det er også kjent at den kan akkumuleres i andre organer som hjerte, lunger, hjerne og nyrer (Metcalf og Codd 2012). Hjerneskadene skjer ved lave ( $\mu\text{M}$ ) konsentrasjoner (Utkilen, pers. medd.) Ved akutte store mengder kan de være direkte dødelig. I tillegg kan det være kreftfremkallende, ved at de fungerer som tumorpromotorer i lever og tykktarm. Men dette er bare kjent når microcystin forekommer sammen med nodularin (Metcalf og Codd 2012)

Andre toksiner som er hepatotoksiner er cylindrospermopsin, cyanoviridin og noduralin (Dow og Swoboda 2000). Retningsgivende verdi for microcystin i drikkevann er 1 µg/L. Dette er basert på en gjennomsnittlig voksen person på 60 kg med et daglig vanninntak på 2 liter (Falconer m. fl. 1999). Andre grupper av toksiner som produseres av cyanobakterier er neurotoksiner og cytotoxiner. Neurotoksiner angriper først og fremst nervesystemet, og anatoksin og saxitoksin er kjente toksiner i denne gruppen (Dow og Swoboda 2000 og Metcalf og Codd 2012). Eksempler på arter som produserer anatoksin er enkelte arter fra slektene *Anabaena* og *Oscillatoria*. *Planktothrix*-slekten er en av dem som produserer saxitoksin (Metcalf og Codd 2012). Cytotoxiner har ikke stor dødelighet for dyr, men noen er sekundære metabolitter. Noen eksempler på cytotoxiner er scytophyciner, lipopolysakkarider og acutiphysin (Dow og Swoboda 2000).

Nitrat er en viktig nitrogenkilde for vekst og toksinproduksjon, men cyanobakterier kan også ta opp andre former av nitrogen som ammonium, nitritt og løst atmosfærisk nitrogen gass (Oliver og Ganf 2000 og Oliver m. fl. 2012). Enzymet nitratreduktase reduserer nitrat til nitritt mens nitrittreduktase reduserer nitritt til ammonium. Det kreves energi for å redusere nitrat og nitritt ned til ammonium, og nitrat er derfor ikke den mest foretrukne nitrogenkilden. Ammonium er førstevalget som nitrogenkilde, siden denne formen kan bygges inn i aminosyrer direkte. Men som regel er det lite ammonium tilgjengelig og nitrat blir den nitrogenkilden som blir lettest å ta opp (Howarth 2010 og Oliver m. fl. 2012). Andre næringsstoffer som er viktig for vekst er jern (Fe), fosfor (P) og mikroelementer (Mn, Zn, Co, Mo og B). Jern er viktig ved syntese av klorofyll, ved elektrontransport, ved omsetning av uorganisk nitrogen og DNA-syntesen (Ginn m. fl. 2009 og Odland 2010). Fosfor er viktig i stoffskiftet ved at energi fra fotosyntesen for det meste går gjennom adenylsystemet, hvor ATP/ADP er et viktig element. Fosfor finnes også i nukleinsyrer. Mikroelementene trengs i mindre mengder enn makroelementene, men har viktige oppgaver i nitrogenomsetning, fotosyntesen og produksjon av enzymer (Odland 2010).

Noen arter kan også fiksure nitrogen. Det vil si at de tar opp løst atmosfærisk nitrogen og omdanner det til ammonium (Stal 2000 og Campbell m. fl. 2008). Dette krever mye energi og det brukes 16 ATP for å lage to molekyler med ammonium og et molekyl med H<sub>2</sub> (Stal 2000 og Oliver m. fl. 2012). Det er vanligst å finne nitrogenfikserende cyanobakterier i innsjøer med nitrogenbegrensning og dårlige lysforhold (Mur m. fl. 1999 og Marino og Howarth 2009). De vanligste cyanobakteriene som fikserer nitrogen hører til slektene *Anabaena*, *Aphanizomenon* og *Nostoc* (Marino og Howarth 2009). Cyanobakterier har også den fordel at de kan lagre nitrogen når det er overflod av næringsstoffer til stede. På den andre siden har

noen cyanobakterier muligheten til å gå i hvilemodus når det er mangel på nitrogen (Oliver m. fl. 2012).

De to viktigste faktorene for produksjon av microcystin er lys og temperatur, men også nitrogen, fosfor og de fem sporstoffene er viktige faktorer. Temperatur ved 25 °C gir optimal produksjon (Gjølme m fl. 2010). Ved økning av lysintensitet vil microcystinproduksjon øke opp til 30-40 µE og så flate ut ved høyere lysintensitet (Utkilen og Gjølme 1992, Wiedner m.fl 2003 og Gjølme m. fl. 2010). Det er vanlig at microcystinproduksjonen varierer fra en vannforekomst til en annen vannforekomst under ellers like forhold. En mulig årsak til dette er forholdet mellom microcystinproduserende stammer og ikke-produserende bakteriestammer. *Microcystis* som ikke produserer microcystin kan virke dominerende over den gruppen som produserer microcystin (Briand m.fl. 2012). Toksiner er små peptider som normalt produseres direkte ved hjelp av ribosomer, altså ved hjelp av translasjon. Men for microcystin er det annerledes. Microcystin er ikke avhengig av mRNA og ribosomer for å bli translert, men produseres ved hjelp av et enzym som kalles syntetase (Gjølme m. fl. 2010 og Metcalf og Codd 2012).

## 1.2 Problemstilling og målsetning

Oppblomstring av toksinproduserende cyanobakterier er et stort problem på verdensbasis, og det kreves mer forskning på området for å redusere fremtidige problemer. Lystilgang og nitratkonsentrasjon er to viktige faktorer som regulerer en oppblomstring. Problemstillingen i denne oppgaven er om vekst og toksinproduksjon hos *Microcystis aeruginosa* påvirkes av ulike mengder med lys og nitrat. Målsetningen med oppgaven er å studere hvordan henholdsvis normal (500 mg NaNO<sub>3</sub>/L) og lav nitratkonsentrasjon (10 mg NaNO<sub>3</sub>/L) påvirker vekst og toksininnhold hos *M. aeruginosa* ved høy og lav lysintensitet. Resultatene fra denne oppgaven kan være med å indikere hvor mye nitrat som må til, under ulike lysforhold, for å få en oppblomstring og toksinproduksjon av *M. aeruginosa*. Man kan kanskje også gi et svar på om det er lysintensitet eller nitratkonsentrasjon som er den begrensende faktor for vekst og microcystinkonsentrasjon.

## 2 Material og metode

Materialet er en kultur av *M. aeruginosa* (PCC 7806) og en mutant variant fra samme arten hvor en mutasjon i microcystingenet fører til at den ikke kan produsere microcystin. Den toksiske varianten kommer fra Pasteur instituttet, mens mutanten er fra universitetet i Berlin.

### 2.1 Eksperiment oppsett

Alle analyser ble utført ved Høgskolen i Telemark. Kulturene ble dyrket i et Termaks konstantskap ved 25 °C over en periode på 4 uker. Eksperimentet ble utført ved lav lysintensitet (8  $\mu$ E) hvor den toksiske og den mutante varianten ble dyrket med vanlig O<sub>2</sub>-medium (vedlegg 1) og O<sub>2</sub>-medium med redusert konsentrasjon av NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (1/50 av normal konsentrasjon(10 mg NaNO<sub>3</sub>/L)). Lysintensiteten ble målt med et Hagner universal fotometer. Apparatet målte i lux, så målingene ble regnet om til  $\mu$ E etterpå (lux  $\times$  0,014). Prøvene ble dyrket i flasker på 2 liter og ble boblet med luft (figur 2). Alle variantene hadde to paralleller. Hver andre dag ble det tatt ut prøver (20 ml) til analyse for optisk tetthet (OD) og nitratkonsentrasjon, samt protein og microcystinkonsentrasjon. Samme forsøket ble også utført med høy lysintensitet (104  $\mu$ E).



*Figur 2: Illustrasjon av eksperimentoppsett*

### 2.2 Analysemetoder

Bakterieveksten ble målt som forandring av optisk tetthet (OD), og ble målt med et Lambda 20 UV/VIS Spektrofotometer ved en bølgelengde på 740 nm samme dagen som prøvene ble tatt. Prøver til analyse av NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, protein og microcystin ble fryst ned (-18 °C) og analysert på et senere tidspunkt.

Analyse av microcystin ble utført ved hjelp av Adda ELISA-kit fra Abraxis for microcystin og ble avlest (bølgelengde 450 nm) ved hjelp av en ELISA Accu Reader. Metodebeskrivelse fra Abraxis ble fulgt. Første brønnraden bestod av seks standarder, hvor standard 0 og 5 hadde to paralleller. De andre brønnradene bestod av prøver med to paralleller. Resultatene i  $\mu\text{g/L}$  kommer opp på dataskjermen ved hjelp av regneark i Excel med forhåndskrivde formler. På grunn av at fleste prøvene hadde høyere konsentrasjon enn standardene (høyeste standard 5  $\mu\text{g/L}$ ) måtte de fortynnes (x20, x100, x500 eller x1000) for å få resultatene innenfor standardkurven.

Analyse av proteinkonsentrasjon er basert på Lowrys metode (1951), men noe av metoden er endret. Prøvene til proteinbestemmelse ble frosset i syrevaskede dramsglass (1 M  $\text{HNO}_3$ ). Det pipetteres ut tre parallelle prøver av 0,5 ml. Dramsglassa fryses ned og plasseres skrått i fryseren. Disse kan stå natten over.

Til analysen må det lages fire reagenser og en stamløsning av Bovin Serum Albumin (BSA). Reagens 1 lages ved at 25,0 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  løses i destillert vann og fortynnes til 500 ml. Reagens 2 lages ved at 0,5 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  og 1,0 g Na-K-tartrat $\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  løses i destillert vann og fortynnes til 100 ml. Bunnfallet må synke ned og løsningen filtreres med 0,47  $\mu\text{m}$  filter før bruk. Reagens 3 lages ved å blande 50 ml av reagens 1 med 2,0 ml av reagens 2 rett før bruk. Reagens 4 består av Folin-Ciocalteu som er fortynnet med destillert vann i forholdet 1:1. Stammløsninger av BSA lages ved å veie inn 100 mg BSA og tilsette 20,0 ml destillert vann. Løsningen løses opp ved å røre forsiktig rundt, og fryses ned i porsjoner på 2,0 ml.

Standardløsningene lages i syrevaskete reagensrør og med tre paralleller. Tilsett 2,5 ml med reagens 3 til hvert av reagensrørene. Konsentrasjonen av BSA i standardløsningene var 1,25, 2,5, 5, 10, 15, 25 og 40  $\mu\text{g/ml}$  ved å tilsette henholdsvis 0,75, 1,5, 3, 6, 9, 15 og 24  $\mu\text{l}$  stamløsning til hvert rør. Tilsett så 0,5 ml med reagens 4 til ett rør av gangen. Løsningen vortexes i fem sekunder og står i 60 minutter i romtemperatur, før resultatet måles ved hjelp av et Lambda 20 UV/VIS Spektrofotometer med en bølgelengde på 750 nm. Gjennomsnittet av de tre parallellene brukes som standarder. Kontrolløsninger bør også lages for å være sikker på at man får de riktige konsentrasjonene. I dette forsøket ble det valgt kontroller som hadde konsentrasjoner på 1,6, 4, 8 og 12  $\mu\text{g/ml}$ .

De fryste prøvene settes direkte inn i frysetørkeren. Når prøvene er ferdig frysetørket tilsettes de 0,5 ml destillert vann og 0,5 ml 1 M NaOH, og de kokes i vannbad i fem minutter. Prøvene tilsettes så reagens 3 og 4 på samme måte som ble gjort med standardene og de hviler i 60

minutter i romtemperatur. Prøvene måles på et Lambda 20 UV/VIS spektrofotometer ved en bølgelengde på 750 nm. Konsentrasjonen som blir lest av er i  $\mu\text{g/ml}$ .

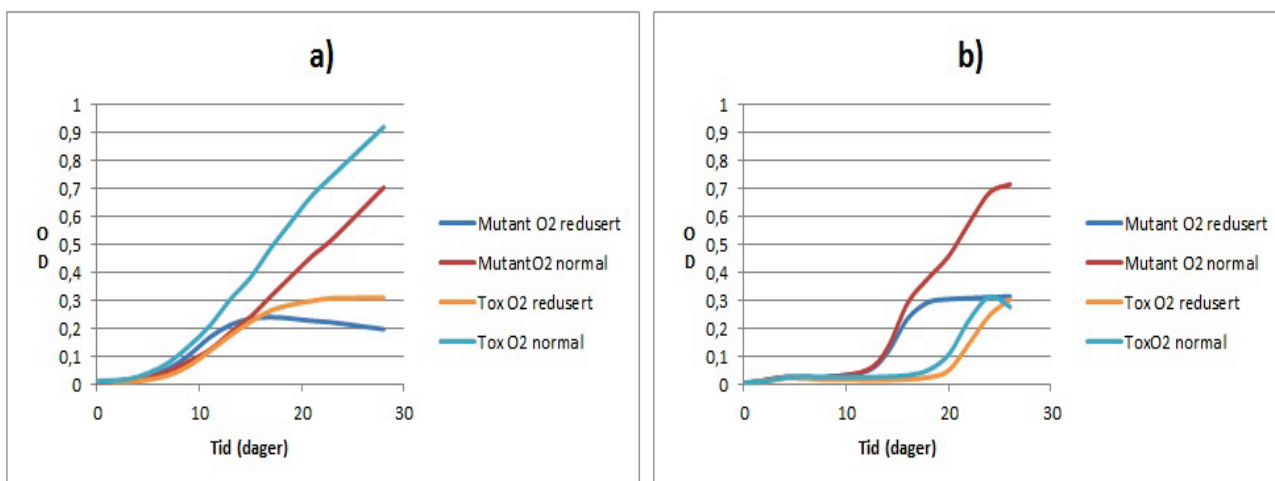
Analyse av  $\text{NO}_3^-$ -N ble utført ved hjelp av en FiaLab 2500 etter standard ASN 136-01/91 Tecaton. UV-lampen på instrumentet hadde en bølgelengde på 520 nm og resultatet blir lest av i  $\mu\text{g/L}$ .

## 3 Resultater og diskusjon

### 3.1 Vekst av *Microcystis aeruginosa*

For å få vekst av fotosyntetiske organismer er man avhengig av lys. Det vil også si at økende lysintensitet gir økende vekst. Ved for lavt lys (<3,68  $\mu\text{E}$ ) vil det ikke bli noe vekst (Hesse og Kohl 2001) Veksten vil være økende opp til 80  $\mu\text{E}$  som virker å være et optimum. Etter dette vil veksten være konstant eller gradvis synkende (Wiedner m. fl. 2003).

Bakterieveksten ble målt som forandring av optisk tetthet (OD). Forsøket med lav lysintensitet (8  $\mu\text{E}$ ) ga resultater som vist i figur 3a. Resultatene viser at ved lav lysintensitet vokser kulturene med normal nitratkonsentrasjon bedre enn kulturene med lav nitratkonsentrasjon (10 mg  $\text{NaNO}_3/\text{L}$ ). Noe som viser at den lave nitratkonsentrasjonen brukt i denne studien er begrensende for veksten. Det er ingen store forskjeller mellom toksisk og mutant stamme, men den toksiske vokser generelt litt bedre enn mutanten. Dette har også blitt vist tidligere (Vezie m. fl. 2002), men bare ved høye konsentrasjoner av næringsstoffer. Annen forskning viser at toksiske og mutante stammer vokser svært likt (Hesse m. fl. 2001, Briand m. fl. 2008 og Briand m. fl 2012). Et kinesisk forsøk (Li og Li 2012) viser at mutanten vokser bedre enn den toksiske. Svakheten hos Li er at mutanten stammer fra *Microcystis wesenbergii*. Parallellene i forsøket med lav lysintensitet var relativt like, noe som styrker resultatene.



Figur 3: Vekst av mutant og toksisk stamme av *M. aeruginosa* under lav lysintensitet (a) og under høy lysintensitet (b).

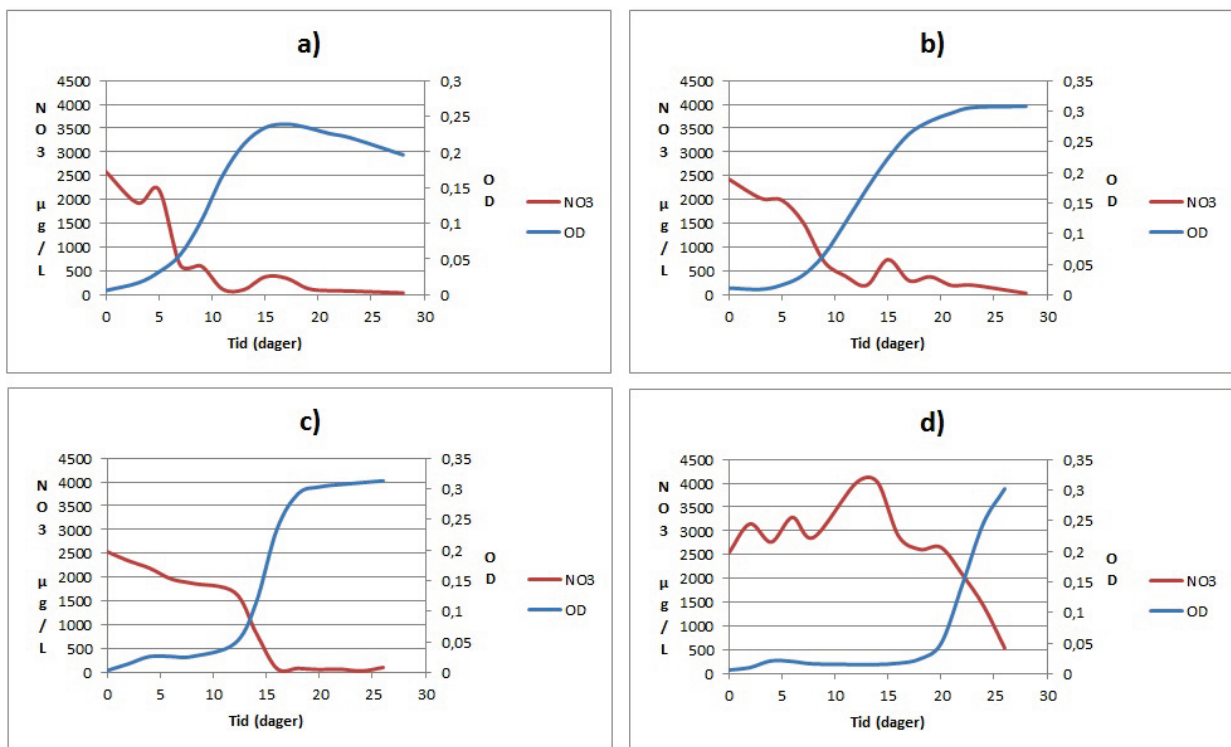
Ved forsøket med høy lysintensitet ble veksten noe annerledes (figur 3b). De største forskjellene er at veksten hos den toksiske stammen var mye dårligere sammenliknet med

forsøket med lav lysintensitet og det tok lang tid før begge stammene begynte å vokse. Ser man på figur 4c og 4d tok det også lenger tid før nitrat ble forbrukt. Det kan tyde på at den lange tiden benyttes til å tilpasse cellene til den høye lysintensiteten. Ved en adaptasjon er det mange prosesser som må gjøres for å unngå skader på cellene (Oliver m. fl. 2012). Både den mutante og toksiske stammen vokste litt i starten, men stoppet opp etter få dager. Hos mutanten startet veksten igjen ved dag 12. Som ved forsøket med lav lysintensitet, stopper mutanten med lite nitrat å vokse etter dag 18, mens kulturen med normale nitratmengder fortsetter å vokse. De toksiske stammene klarte ikke å ta opp veksten igjen før det hadde gått 18 dager. Dette kan komme av at mutanten kan være bedre tilpasset overgangen til høy lysintensitet enn den toksiske stammen (Utkilen pers. medd.). Verdt å nevne er at kulturene ved dette forsøket aldri har blitt eksponert for noen særlig høyere lysintensitet enn  $8 \mu\text{E}$ . Veksten til den toksiske stammen ved normal nitratmengde og redusert nitrat var så å si lik til forsøket tok slutt. Den siste dagen fikk kulturen med normalmedium en liten reduksjon i OD. I tillegg hadde sistnevnte en mye lavere OD enn alle de andre kulturene med normalmedium. Parallellene i forsøket med høy lysintensitet var svært like, bortsett fra mutanten med normalmedium som hadde litt sprikende OD mot slutten av forsøket.

Det er kjent at vekst øker med økende lysintensitet opp til  $80 \mu\text{E}$ , men vårt forsøk med høy lysintensitet var i denne undersøkelsen ved  $104 \mu\text{E}$ . Dette er for høyt til at veksten kan øke ytterligere, og vil gradvis synke med økende lysintensitet (Wiedner m. fl. 2003). Dermed ser det ut som den lave veksten ved høy lysintensitet er som forventet. Et par observasjoner som er vanskeligere å finne et svar på er hvorfor mutanten har nesten like god vekst ved høy lysintensitet som ved lav, og hvorfor den toksiske stammen har 18 dagers lag-fase før den begynner å vokse ved høy lysintensitet sammenliknet med 5-6 dager ved lav lysintensitet. Men som nevnt tidligere kan sistnevnte observasjon skyldes at den toksiske stammen bruker lenger tid til å tilvenne seg høy lysintensitet enn mutanten.

Det virker naturlig at kulturer med redusert nitrat stopper å vokse etter en stund. Dette henger mest sannsynlig sammen med at det blir lite nitrat tilgjengelig (figur 4). I alle kulturene ble nitratet nesten brukt opp samtidig som bakterieveksten ble stor. En mulig grunn til at bakteriene klarer å vokse en stund etter at det er tomt for nitrat kan skyldes at cyanobakterier kan lagre nitrat i cellen (Oliver m. fl. 2012). En mulig forklaring på hva som skjer er at bakteriene bruker de første dagene på å ta nitrat inn i cellen for så å begynne å vokse når det er tomt for nitrat.

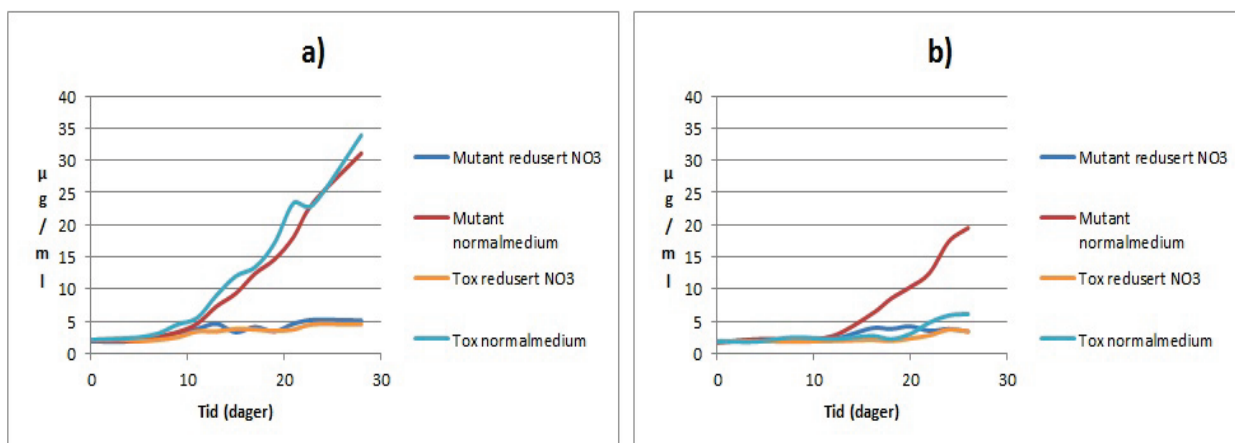




Figur 4: OD og nitratkonsentrasjon ( $\mu\text{g/L}$ ) i redusert medium, lav lysintensitet med mutant (a) og toksisk stamme (b), høy lysintensitet med mutant (c) og toksisk stamme (d).

## 3.2 Proteinmengde (biomasse)

Proteinmengden er et uttrykk for hvor mye biologisk materiale som er i prøvene. Ved forsøket med lav lysintensitet (figur 5a) hadde alle lik proteinmengde fram til dag 10. Men etter dette ble det store forskjeller mellom kulturer dyrket med normalmedium og medium med redusert nitrat. Bakterier med normalmedium viste en klar økning i biomasse, mens de med redusert nitrat aldri fikk noen klar økning i biomasse. Mutante og toksiske kulturer med likt medium hadde omtrent samme biomasseutvikling.



Figur 5: Proteinmengde ( $\mu\text{g/ml}$ ) over tid i forsøket ved lav lysintensitet (a) og høy lysintensitet (b).

Forsøket med høy lysintensitet (figur 5b) hadde dårligere biomasseutvikling enn forsøket med lav lysintensitet. Den eneste som klarte å øke mye i biomasse var mutanten i normalmedium. I de andre behandlingene ble proteinmengden doblet i løpet av forsøket. I begge forsøkene hadde alle kulturene omtrent lik biomasse fram til dag 10. Etter dette økte mutantens biomasse betraktelig, mens de andre ble værende lave. Det er også her vanskelig å finne en god forklaring på hvorfor mutanten skiller seg ut fra de andre, men det kan være at mutanten er bedre tilpasset overgangen til høy lysintensitet.

I begge forsøkene har optisk tetthet og biomasse samme utviklingsmønster. Dermed kan biomassemålingene være en bekreftelse på at tetthetsmålingene stemmer, og omvendt.

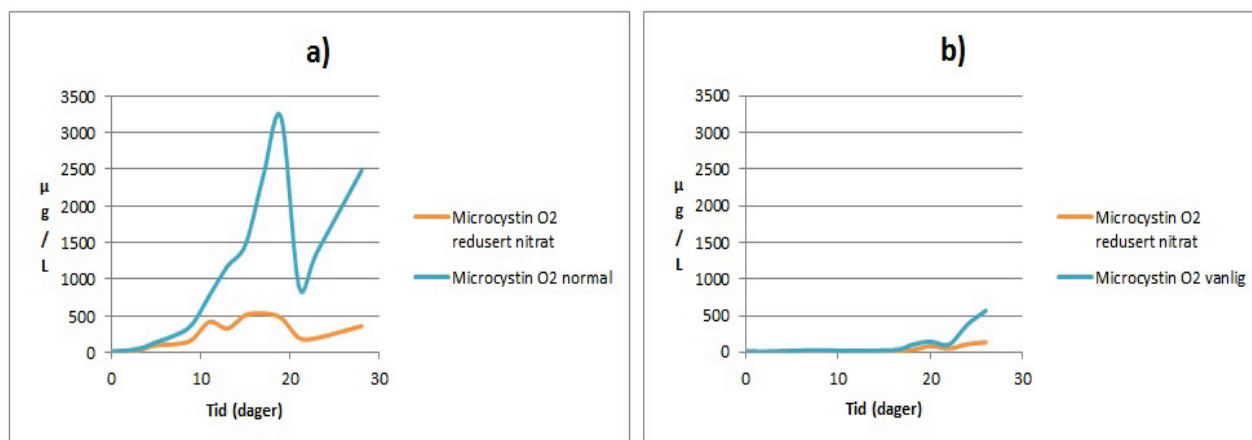
### 3.3 Microcystin

Ved forsøket med lav lysintensitet var innholdet av microcystin i parallellene høyere enn tilsvarende behandling ved høy lysintensitet. Det var store forskjeller på kulturer med normalmedium og medium med redusert nitrat (figur 6a). Kulturen med redusert nitrat nådde en konsentrasjon på  $500 \mu\text{g microcystin/L}$ , mens kulturen med normalmedium kom opp i hele  $3250 \mu\text{g microcystin/L}$ . Dette kan komme av at det kreves ammonium for å bygge microcystin som er et peptid (Gjølme m. fl. 2010). Det kan tenkes at ved nitratbegrensning blir det også ammoniumbegrensning, som igjen resulterer i lav microcystinkonsentrasjon.

En merkelig hendelse er at microcystinkonsentrasjonen sank betraktelig i alle kulturene rundt dag 20, for så å stige igjen. Parallellene var svært like ved dette konsentrasjonsfallet. En tidligere masteroppgave (Fosså 2013) viste også til samme utviklingsmønster ved normalmedium. Det er viktig å nevne at kulturene som ble brukt i forsøkene ikke var

bakteriefrie. En mulighet kan være at det finnes organismer som spiser eller bryter ned microcystin i kulturene som vi ikke er klar over. En annen mulighet er at tettheten av cyanobakterier i flaskene blir så høy at det blir for liten lysgjennomtrengning. Dette vil føre til at bakteriene ikke får nok energi til å omdanne nitrat til ammonium (Hans Utkilen pers. medd.). Det gir ingen forklaring på hvorfor konsentrasjonen går ned, men kan kanskje forklare hvorfor den ikke går enda høyere opp. Ser man godt etter på biomassen til den toksiske stammen med normalmedium (figur 5a) får denne også en liten nedgang rundt dag 20. OD ser ikke ut til å være påvirket (figur 3). Dette tyder på at microcystinnholdet avtar i forhold til cyanobakterieveksten. Dette kan igjen tyde på at det blir produsert mindre microcystin per celle, men dette kan vi ikke fastslå siden det ikke var celledeller tilgjengelig ved laboratoriet.

Generelt i hele forsøket var microcystinkonsentrasjonen såpass høy at prøvene måtte fortynnes ganske mye før analyse. Dette resulterte i at parallellene ikke ble så like når de ble ganget opp til riktig konsentrasjon, selv om de fortynna parallellene var ganske like. Det mest ideelle hadde vært og hatt flere paralleller per prøve slik at gjennomsnittet hadde blitt mer riktig.



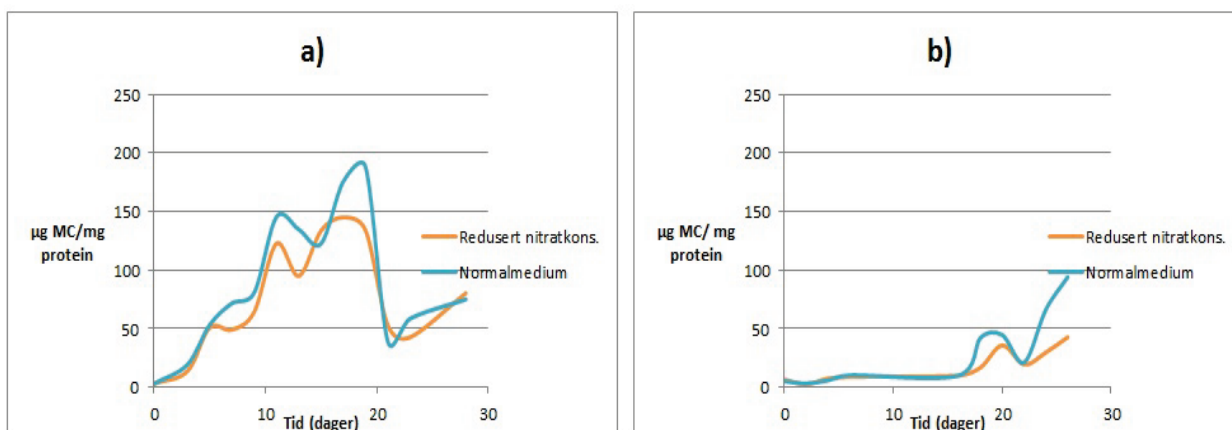
Figur 6: Konsentrasjon av microcystin ( $\mu\text{g/L}$ ) over tid ved forsøk ved lav lysintensitet (a) og høy lysintensitet (b).

Ved forsøket med høy lysintensitet var microcystinkonsentrasjonen mye lavere (figur 6b). Kulturen i normalmedium nådde sitt maksimum på  $570 \mu\text{g}$  microcystin/L og kulturen med redusert medium  $140 \mu\text{g}$  microcystin/L. I tillegg økte ikke konsentrasjonen før dag 16. Kulturene fikk den samme nedgangen i konsentrasjon som de andre rundt dag 20 og økte igjen etter det. Den store forskjellen mellom redusert og normalmedium de siste dagene skyldes mest sannsynlig de ulike nitratkonsentrasjonene.

Mest sannsynlig er grunnen til den lave microcystinkonsentrasjonen knyttet til lysintensiteten. Begge kulturene har betydelig lavere microcystinkonsentrasjon ved høy lysintensitet enn ved lav lysintensitet. Det er kjent at microcystinproduksjon (Utkilen og Gjølme 1992 og Wiedner m.fl 2003) og toksisitet (Oishi og Watanabe 1985) er økende opptil 30-40  $\mu\text{E}$  og synker etter dette. En lysintensitet på 104  $\mu\text{E}$  kan virke hemmende på microcystinproduksjonen, da lyset i stedet blir en stressfaktor.

Alt i alt kan man si at lys er den begrensende faktor for microcystinkonsentrasjon. Mangel på nitrat vil hemme produksjonen noe, men lysmengden vil bestemme hvor mye nitrat som kan omdannes til ammonium.

Det er mest vanlig å relatere microcystinkonsentrasjonen til proteinkonsentrasjonen ( $\mu\text{g}$  microcystin/ mg protein). Dette ga noe annerledes resultater enn bare konsentrasjon av microcystin i  $\mu\text{g/L}$ . Ved forsøket med lav lysintensitet (figur 7a) ble forskjellen fra grafene i figur 6a store. Det ble ingen stor forskjell mellom normalmedium og medium med redusert nitrat når man studerte microcystinkonsentrasjonen relatert til proteinkonsentrasjonen.



Figur 7: Microcystin ( $\mu\text{g/L}$ ) relatert til protein (mg/L) over tid i forsøket med lav lysintensitet (a) og høy lysintensitet (b).

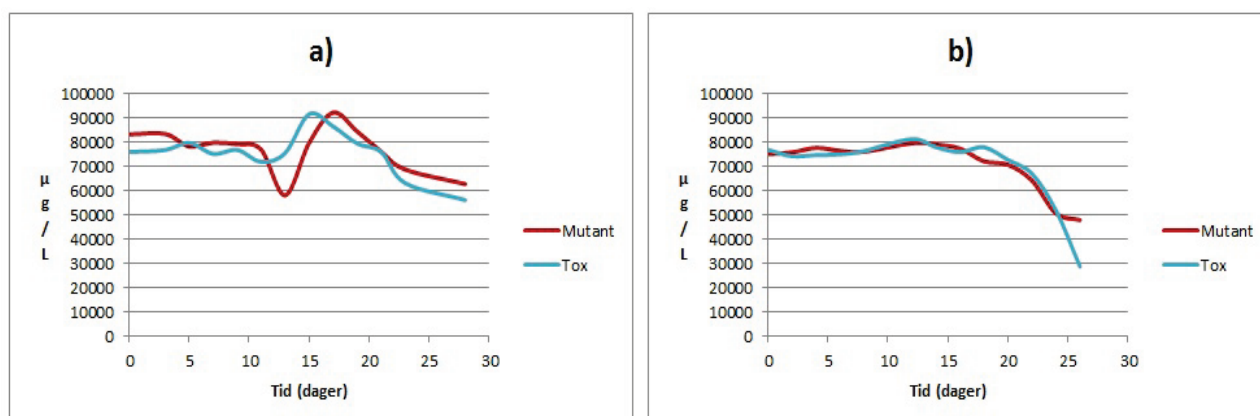
Ved forsøket med høy lysintensitet fulgte også grafene hverandre tett (figur 7b), og i tillegg liknet de på utviklingen av konsentrasjonen av microcystin i  $\mu\text{g/L}$  (figur 6b). Den største forskjellen er at kulturen med normalmedium fikk en mye kraftigere vekst enn kulturen med redusert nitrat de to siste dagene.

### 3.4 Nitrat

Nitrat er som kjent en viktig kilde for nitrogen (Oliver m. fl. 2012) og dermed en god parameter for å vise hvor mye nitrogen som blir brukt. Ved forsøkene med normalmedium

(figur 8) startet nitratkonsentrasjonen på rundt 80 000  $\mu\text{g NO}_3^- \text{-N/L}$ . Konsentrasjonen avtok som forventet. Forsøket med høy lysintensitet (figur 8b) fikk en svært stor nedgang etter dag 20, mens forsøket med lav lysintensitet (figur 8a) sank kontinuerlig, men ikke så mye. Noe som må legges merke til er at den toksiske stammen ved høy lysintensitet tok opp veldig mye nitrat til tross for at den hadde lavere vekst (figur 3b) og lavere microcystininhold (figur 6b) enn den toksiske stammen ved lav lysintensitet (figur 3a og 6a). En mulighet er at bakteriene tar opp nitrat for lagring (Oliver m. fl. 2012), men at lyset fungerer som en stressfaktor og hemmer dem i å omdanne det videre. En annen forklaring kan være at det finnes andre organismer som klarer å ta opp store mengder nitrat ved denne lysintensiteten. Som nevnt tidligere er ikke kulturene rene.

Ved lav lysintensitet (figur 8a) hadde kulturene en kraftig økning i nitratkonsentrasjonen rundt dag 15. Denne oppgangen kan skyldes at nitraten blir frigjort på grunn av celledød, men dette kan vi ikke fastslå siden vi ikke hadde celledeller tilgjengelig. Både den mutante og den toksiske kulturene fulgte hverandre godt gjennom begge forsøkene.

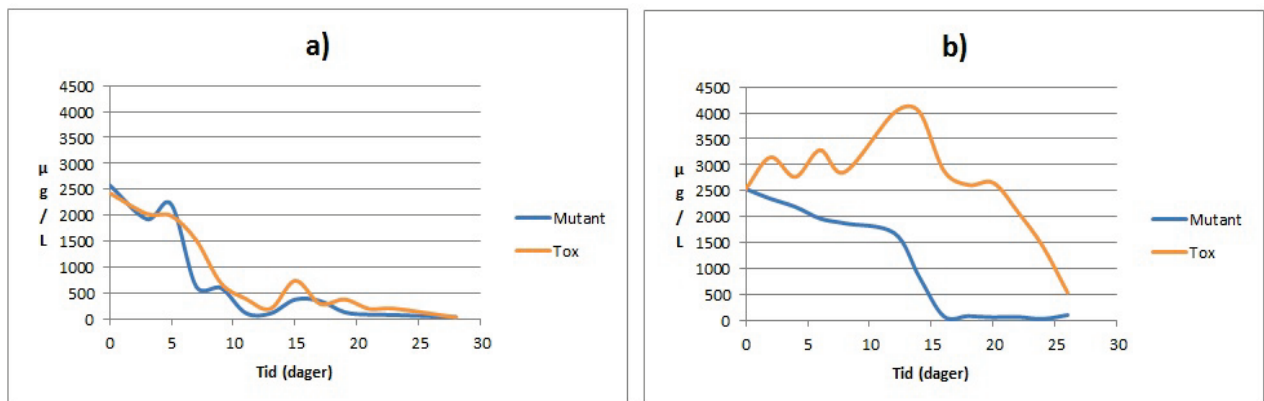


Figur 8: Utviklingen av nitratkonsentrasjon ( $\mu\text{g/L}$ ) i normalmedium over tid. Lav lysintensitet (a) og høy lysintensitet (b).

Kulturene dyrket med redusert nitrat (figur 9) startet med en konsentrasjon på rundt 2500  $\mu\text{g NO}_3^- \text{-N/L}$ . I begge forsøkene ble nesten all nitrat brukt opp, men de hadde litt ulike utviklingsmønstre. Ved forsøket med høy lysintensitet (figur 9b) var mutanten og den toksiske stammen svært ulike. Konsentrasjonen av nitrat i mutantbeholderen sank rolig og fint fram til dag 15, da den plutselig stupte og all nitrat ble brukt opp. Den toksiske stammen gikk opp og ned i konsentrasjon og økte til 4000  $\mu\text{g/L NO}_3^- \text{-N/L}$  dag 15. Etter dette sank nitratkonsentrasjonen og endte opp på 500  $\mu\text{g NO}_3^- \text{-N/L}$  den siste forsøksdagen. Ved forsøket med lav lysintensitet (figur 9a) hadde mutanten og den toksiske stammen et svært likt

utviklingsmønster. Begge brukte mye nitrat de første 10 dagene og var så å si tomme for nitrat når forsøket var over.

Det som er tydelig for kulturer med redusert medium er at nitrat blir tatt mer effektivt opp ved lav lysintensitet. En annen observasjon er at mutanten er mer effektiv enn den toksiske til nitratopptak ved høy lysintensitet. Dette kan være med å forklare hvorfor den toksiske har lenger lag-fase enn mutanten.



Figur 9: Utviklingen av nitratkonsentrasjon ( $\mu\text{g/L}$ ) i redusert medium over tid. Lav lysintensitet (a) og høy lysintensitet (b).

### 3.5 Økologisk perspektiv

Med disse resultatene, er det interessant å fundere over hvordan de ville oppføre seg ute i naturen. Lysintensitet er som regel ikke noe problem ute i det fri ettersom cyanobakterier kan flyte opp og ned i vannmassene ved hjelp av gassvakuoler (Gjølme m. fl. 2010). Ved for høy lysintensitet ville de altså synke lenger ned i vannet. Dette kunne også sees i forsøket med høy lysintensitet ved at bakteriene la seg på bunn av flaskene.

Ved lav lysintensitet hadde begge stammene en lag-fase på 6 dager, men den toksiske vokste litt bedre. Dette kan tyde på at den toksiske ville dominert over mutanten. Hvis de ikke hadde hatt muligheten til å flykte fra den høye lysintensiteten ville situasjonen vært annerledes. Mutanten ville antakeligvis utkonkurrert den toksinproduserende fordi den hadde kortere lag-fase og vokste bedre. Men ved nitratbegrensning ville populasjonen av begge stammene vært generelt lav, uavhengig om det er lav eller høy lysintensitet. Cyanobakterier vokser altså best når det er tilstrekkelig med nitrat og lav lysintensitet. Dermed virker det ganske naturlig at oppblomstringer av cyanobakterier som oftest finner sted i eutrofe innsjøer, ved at de har høyt næringsinnhold og lysgjennomtrengningen er lav.

## 4 Konklusjon

Både lysintensitet og nitratkonsentrasjon virker begrensende på vekst og microcystinkonsentrasjon, men det er i bunn og grunn lys som er den begrensende faktor. Ved høy lysintensitet vil lyset være en stressfaktor og virke hemmende på vekst og microcystinkonsentrasjon, uansett hvor høy nitratkonsentrasjonen er. Den mutante og toksiske stammen hadde ulik lag-fase ved høy lysintensitet. Mutanten hadde en lag-fase på 12 dager, mens den toksiske stammen hadde en lag-fase på 18 dager. Det kan bety at den toksiske stammen bruker lenger tid til å tilvenne seg høy lysintensitet enn mutanten. Mutanten fikk like stor vekst ved høy lysintensitet som ved lav lysintensitet.

Ved lav lysintensitet er lysmengden mer optimal for vekst og det er nitratkonsentrasjonen som virker begrensende. Veksten og microcystinkonsentrasjon har kortere lag-fase og er høyere enn ved høy lysintensitet. Alt i alt bekrefter dette at lys og nitrat er to viktige faktorer for vekst og microcystinproduksjon.

## 5 Referanser/litteraturliste

Bartram J., Carmichael W. W., Chorus I., Jones G. og Skulberg O. M., 1999, i Chorus I. og Bartram J. (eds.), Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management, S. 1-13, WHO

Briand E., Yepremian C., Humbert J. F. og Quiblier C., 2008, Competition between microcystin- and non-microcystin-producing *Planktothrix agardhii* (cyanobacteria) strains under different environmental conditions, I environmental microbiology 10, S. 3337-3348. Society for applied microbiology and Blackwell publishing Ltd.

Briand E., Bormans M., Quiblier C., Salencon M-J. og Humbert J-F., 2012, Evidence of the cost of the production of microcystins by *Microcystis aeruginosa* under differing light and nitrate environmental conditions, PLoS ONE 7(1), 10 s.

Campbell N. A., Reece J. B., Urry L. A., Cain M. L., Wasserman S. A., Minorsky P. V. og Jackson R. B., 2008, Biology 8. Edition, S. 556-574, Pearson international edition.

Chorus I., Falconer I. R., Salas H. J., Bartram J., 2000, Health risks caused by cyanobacteria in recreational waters, I Journal of toxicology and environmental health Part B critical reviews 3:4, S. 323-347, Taylor & Francis.

Dow C. S. og Swoboda U. K., 2000, Cyanotoxins, i Whitton B. A. og Potts M. (eds.), The ecology of cyanobacteria: their diversity in space and time, Kap. 22 s. 613-627, Kluwer academic publishers.

Falconer I., Bartram J., Chorus I., Kuiper-Goodman T., Utkilen H., Burch M. og Codd G. A., 1999, Cyanobacteria in the environment i Chorus I. og Bartram J. (eds.), Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management, Kap. 5, S. 155-178, WHO.

Folkehelseinstituttet, 1999, Forekomst av giftige cyanobakterier i vannkilder i Sør-Norge, <http://www.fhi.no/artikler/?id=98418>

Folkehelseinstituttet, 2003, "Algegifter" I ferskvann, <http://www.fhi.no/artikler/?id=27904>

Fosså L., 2013, Growth and microcystin production by *Microcystis aeruginosa* in batch cultures at different iron concentrations, Mastergradsoppgave, 25 s., Høgskolen I Telemark Fakultet for allmennvitenskapelige fag.



- Ginn H. P., Pearson L. A. og Neilan B. A., 2009, Hepatoxin biosynthesis and regulation in cyanobacteria- the putative involvement of nitrogen and iron homeostasis mechanisms, S. 200-223, Chiang Mai J. Sci.
- Gjølme N., Krogh T. og Utkilen H., 2010, Cyanobakterier (blågrønnalger) Oppblomstring og toksinproduksjon, Rapport 2010:4, 58 s., Nasjonalt folkehelseinstitutt.
- Hesse K., Dittmann E. og Börner T., 2001, Consequences of impaired microcystin production for light-dependent growth and pigmentation of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, FEMS microbiology ecology 37, S 39-43, Elsevier science B. V.
- Hesse K. og Kohl J.-G., 2001, Effects of light and nutrient supply on growth and microcystin content of different strains of *Microcystis aeruginosa*, i Chorus I. (ed.), Cyanotoxins: occurrence, causes, consequences, , S. 104-115, Springer
- Howart R., 2010, Nitrogen, i Likens G. E. (ed.), Biogeochemistry of inland waters: a derivative of encyclopedia of inland waters, S. 400-406, Elsevier Inc.
- Li Y. og Li D., 2012, Competition between toxic *Microcystis aeruginosa* and nontoxic *Microcystis wesenbergii* with *Anabeana* PCC 7120, J appl. Phycol. 2012 :24 S. 69-78, Springer science + business media B. V.
- Marino R. W. og Howarth R., 2009, Nitrogen fixation, i Likens G. E. (ed.), Biogeochemistry of inland waters: a derivative of encyclopedia of inland waters, S. 392-398, Elsevier Inc.
- Metcalf J. S. og Codd G. A., 2012, Cyanotoxins, i Whitton B. A.(ed), Ecology of cyanobacteria 2:their diversity in space and time, Kap. 24 s. 651-669, Springer science + Business Media B.V.
- Mur R. M., Skulberg O. M og Utkilen H., 1999, Cyanobacteria in the environment i Chorus I. og Bartram J. (eds.), Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management, WHO, kap. 2, s 15-40.
- Odland A., 2010, Planter biologi og økologi, Oppsamlingshefte, kap.5 S. 107-125 Høgskolen i Telemark, institutt for natur-, helse- og miljøvern fag.
- Oishi S. og Watanabe M. F., 1985, Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions, i Applied and environmental microbiology, s. 1342-1344, American society for microbiology.

Oliver R. L. og Ganf G. G., 2000, Freshwater blooms, i Whitton B. A. og Potts M. (eds.), The ecology of cyanobacteria: their diversity in space and time, Kap. 6 s. 149-194, Kluwer academic publishers.

Oliver R. L., Hamilton D. P., Brookes J. D. og Ganf G. G., 2012, Physiology, blooms and prediction of planktonic cyanobacteria, i Whitton B. A. (ed.), Ecology of cyanobacteria 2: their diversity in space and time, Kap. 6 s. 155-194, Springer science + Business Media B. V.

Schopf J. W., 2000, The fossil record: tracing the roots of the cyanobacterial lineage, i Whitton B. A. og Potts M. (eds.), The ecology of cyanobacteria: their diversity in space and time, Kap. 2 s. 13-35, Kluwer academic publishers.

Sivonen K. og Jones G., 1999, Cyanobacterial toxins, i Chorus I. og Bartram C. (eds.) Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management, Kap. 3 S. 41-110, WHO

Stal L. J., 2000, Cyanobacterial mats and stromatolites, i Whitton B. A. og Potts M. (eds.), The ecology of cyanobacteria: their diversity in space and time, Kap. 4 s. 61-120, Kluwer academic publishers.

Utkilen H. og Gjølme N., 1992, Toxin production by *Microcystis aeruginosa* as a function of light in continuous cultures and its ecological significance, i Applied and environmental microbiology 58, S. 1321-1325, American society for microbiology.

Vezie C., Rapala J., Vaitomaa J., Seitsonen J. og Sivonen K., 2002, Effect of nitrogen and phosphorus on growth of toxic and nontoxic *Microcystis* strains and on intracellular microcystin concentrations, i Microbial ecology 43, S. 443-454, Springer Verlag New York Inc.

Wiedner C., Visser P., Fastner J., Metcalf J. S., Codd G. A. og Mur L., 2003, Effects of light on the microcystin content of *Microcystis* Strain PCC 7806, i Applied and environmental microbiology 69, S. 1475-1481, American society for microbiology.

Whitton B. A. og Potts M., 2000, The ecology of cyanobacteria, their diversity in time and space, kap. 1, s. 1-12, Kluwer academic Publishers.

Økland J. og Økland K. A., 1996, Vann og vassdrag 2 økologi, kap 7, s. 109-130, Vett og Viten AS.

# Vedlegg

Vedlegg 1: Oppskrift på O<sub>2</sub>-medium

Vedlegg 2: Rådata eksperiment med lav lysintensitet

Vedlegg 3: Rådata eksperiment med høy lysintensitet

# Vedlegg 1

$$\frac{1}{20} N = 0.17 \text{ g/l}$$

$$\frac{1}{20} P = 0.0125 \text{ g/l}$$

## O2

$$\frac{1}{20} \text{NaNO}_3 \Rightarrow 0.25$$

a  
Microelements:

		(10 mg/L)		7L
N-26	NaNO <sub>3</sub>	500 mg/L	5 g/10 L (5,88 mM)	4,59
K-262	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	25 mg/L	0.25 g/10L	0,225
M-8	MgSO <sub>4</sub>	50 mg/L	0.5 g/10L	0,45
K-36	CaCl <sub>2</sub>	13 mg/L	0.13 g/10L	0,117
Fe-solution	NaCl	10 mg/L	10 ml/L added to the medium <u>after</u> autoclavation	
NaHCO <sub>3</sub>		5 ml/L	added to the medium <u>after</u> autoclavation	
Microelements solution		1 ml/L	added to the medium <u>before</u> autoclavation	

Fe-solution

10 ml from a FeCl<sub>3</sub>-Solution (2.80 g FeCl<sub>3</sub> is dissolved in 100ml 0.1 N HCl) and 9.5 ml from a EDTA solution (3.90 g EDTA-Na<sub>2</sub> (titriplex) is dissolved in 100ml 0.1 N NaOH), are mixed and filled up to 1000 ml with distilled water.  
Do not use very old Fe or EDTA solutions to prepare the Fe-solution.

The solution is autoclaved

NaHCO<sub>3</sub>

Make a solution containing 20 mg NaHCO<sub>3</sub>/ml, sterile filter this solution into convenient bottles.

Microelement Solution this solution is not autoclaved, but placed in the fridge

B-9	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86 g/L
M-10	MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	1.81 g/L
A-18	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MoO <sub>24</sub> 4H <sub>2</sub> O	0.002 g/L
S-10	ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.22 g/L
K-50	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.08 g/L
	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.08 g/L
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.01 g/L

NaOH 40 : 1N = 40 g/l  
0.1N = 4 g/l  
0.1N = 0.4 g/100 ml

## Vedlegg 2

Dag	Art	NaN <sub>3</sub> (dag 0)	OD (740 nm)	Protein (µg/ml)	Microcystin (µg/L)	NO <sub>3</sub> -N (µg/L)
0	Tox	10 mg/L	0,011	2,1	6,23	6114
		10 mg/L	0,011	2	6,23	
		500 mg/L	0,01	2,1	6,11	76100
		500 mg/L	0,01	2	5,95	75300
	Mutant	10 mg/L	0,006	1,9		2938
		10 mg/L	0,006	1,8		2232
		500 mg/L	0,006	1,9		
		500 mg/L	0,006	1,9		82950
3	Tox	10 mg/L	0,005	2,2	13,3	5881
		10 mg/L	0,012	2,1	44,3	2030
		500 mg/L	0,021	2,3	53	75700
		500 mg/L	0,015	2,3	35,1	77300
	Mutant	10 mg/L	0,017	1,8		2196
		10 mg/L	0,016	1,8		1664
		500 mg/L	0,017	2		25300
		500 mg/L	0,012	1,9		83150
5	Tox	10 mg/L	0,008	1,7	83,9	5542
		10 mg/L	0,024	2	104,1	1988
		500 mg/L	0,047	2,6	170,3	77600
		500 mg/L	0,033	2,4	98,1	81300
	Mutant	10 mg/L	0,03	2,1		3186
		10 mg/L	0,033	2,1		1229
		500 mg/L	0,03	2		75500
		500 mg/L	0,022	1,8		80550
7	Tox	10 mg/L	0,015	1,9	56,2	5275
		10 mg/L	0,049	2,3	157,6	1522
		500 mg/L	0,092	3,3	264,9	75500
		500 mg/L	0,062	2,9	182,3	74300
	Mutant	10 mg/L	0,055	2,4		836
		10 mg/L	0,057	2,5		425
		500 mg/L	0,053	2,6		78850
		500 mg/L	0,038	2,5		80250
9	Tox	10 mg/L	0,031	2,2	95,3	5887
		10 mg/L	0,1	2,8	237,9	695
		500 mg/L	0,157	4,7	587,6	75300
		500 mg/L	0,117	4,3	155,4	77750
	Mutant	10 mg/L	0,097	3,2		1130
		10 mg/L	0,111	3,1		75
		500 mg/L	0,091	3,4		78100
		500 mg/L	0,072	3,1		79750
11	Tox	10 mg/L	0,062	2,6	308,2	5698

		10 mg/L	0,174	4,1	519,4	392
		500 mg/L	0,238	5,2	1111,2	70050
		500 mg/L	0,178	5,7	438,4	73250
	Mutant	10 mg/L	0,164	4,1		183
		10 mg/L	0,169	3,5		53
		500 mg/L	0,138	5,5		73150
		500 mg/L	0,105	3,6		80200
13	Tox	10 mg/L	0,109	3	284	4099
		10 mg/L	0,236	3,8	362,2	199
		500 mg/L	0,334	9,8	939,1	77400
		500 mg/L	0,269	8,1	1405,2	73100
	Mutant	10 mg/L	0,213	3,8		167
		10 mg/L	0,208	5,3		50
		500 mg/L	0,199	7,2		57900
		500 mg/L	0,168	7,3		57900
15	Tox	10 mg/L	0,191	3,6	571,1	4145
		10 mg/L	0,254	4	434,5	739
		500 mg/L	0,415	13,2	1599,6	91574
		500 mg/L	0,346	10,7	1325,4	91020
	Mutant	10 mg/L	0,246	3,4		641
		10 mg/L	0,222	3,1		115
		500 mg/L	0,266	9,7		74650
		500 mg/L	0,216	8,8		103566
17	Tox	10 mg/L	0,253	3,9	567,2	3319
		10 mg/L	0,273	3,4	491,7	296
		500 mg/L	0,518	14,7	3114,8	85977
		500 mg/L	0,456	12,1	1682,7	86408
	Mutant	10 mg/L	0,255	4,5		591
		10 mg/L	0,222	3,6		110
		500 mg/L	0,337	13,2		90405
		500 mg/L	0,292	11,6		93419
19	Tox	10 mg/L	0,284	3,6	604,2	3607
		10 mg/L	0,284	3,3	329,8	380
		500 mg/L	0,61	18	3337,2	81119
		500 mg/L	0,551	16,1	3068,6	91761
	Mutant	10 mg/L	0,248	3,7		189
		10 mg/L	0,214	3,1		79
		500 mg/L	0,413	16		81549
		500 mg/L	0,358	13,2		86838
21	Tox	10 mg/L	0,302	3,6	219,3	3255
		10 mg/L	0,292	3,8	169,4	196
		500 mg/L	0,701	25,4	816,4	76139
		500 mg/L	0,644	21,3	974,7	75336
	Mutant	10 mg/L	0,243	5		135
		10 mg/L	0,209	4,2		55
		500 mg/L	0,487	19,4		87673

		500 mg/L	0,426	16,7		92345
23	Tox	10 mg/L	0,313	4,6	284,6	4218
		10 mg/L	0,298	4,3	102	203
		500 mg/L	0,776	24,6	1665,2	62310
		500 mg/L	0,712	21,6	1061,5	63449
	Mutant	10 mg/L	0,236	5,2		106
		10 mg/L	0,203	5,1		52
		500 mg/L	0,546	25,4		62444
		500 mg/L	0,49	21,3		78183
28	Tox	10 mg/L	0,317	4,5	368,7	33
		10 mg/L	0,298	4,4	345,9	33
		500 mg/L	0,931	38,7	2381,8	60032
		500 mg/L	0,902	29,1	2576,6	51971
	Mutant	10 mg/L	0,208	5,5		33
		10 mg/L	0,184	4,6		46
		500 mg/L	0,707	31,2		58491
		500 mg/L	0,695	30,9		66531

## Vedlegg 3

Dag	Art	NaN <sub>3</sub> (dag 0)	OD (740 nm)	Protein (µg/ml)	Microcystin (µg/L)	NO <sub>3</sub> -N (µg/L)
0	Tox	10 mg/L	0,006	1,8	11,7	7237
		10 mg/L	0,005	1,7	10,8	2534
		500 mg/L	0,005	1,9	10	72800
		500 mg/L	0,005	1,9	9,6	80350
	Mutant	10 mg/L	0,003	1,6		2680
		10 mg/L	0,002	1,8		2395
		500 mg/L	0,002	1,7		71150
		500 mg/L	0,003	1,7		78500
2	Tox	10 mg/L	0,011	1,8	5	8177
		10 mg/L	0,009	1,9	4,8	3146
		500 mg/L	0,01	1,8	6,3	70000
		500 mg/L	0,01	1,7	4,8	78000
	Mutant	10 mg/L	0,013			2521
		10 mg/L	0,015			2168
		500 mg/L	0,013			71850
		500 mg/L	0,014			79250
4	Tox	10 mg/L	0,019	1,7	15,1	7594
		10 mg/L	0,023	1,9	11,5	2766
		500 mg/L	0,021	3,1	14,1	69550
		500 mg/L	0,025	1,9	13,6	79350
	Mutant	10 mg/L	0,025	2,1		2332
		10 mg/L	0,027	2,1		2047
		500 mg/L	0,025	2,1		74950
		500 mg/L	0,025	2,3		79800
6	Tox	10 mg/L	0,016	1,8	13,4	6656
		10 mg/L	0,023	2	20,3	3282
		500 mg/L	0,018	1,9	14,9	71700
		500 mg/L	0,034	2,4	30	77800
	Mutant	10 mg/L	0,025			2061
		10 mg/L	0,027			1871
		500 mg/L	0,025			71700
		500 mg/L	0,025			80700
8	Tox	10 mg/L	0,013			10521
		10 mg/L	0,019			2862
		500 mg/L	0,015			68350
		500 mg/L	0,035			83850
	Mutant	10 mg/L	0,023	2		1946
		10 mg/L	0,029	2,1		1799
		500 mg/L	0,025	2,3		70950
		500 mg/L	0,024	2,1		80700
12	Tox	10 mg/L	0,012			9530



		10 mg/L	0,018			4006
		500 mg/L	0,014			77150
		500 mg/L	0,036			84800
	Mutant	10 mg/L	0,039	2		1830
		10 mg/L	0,055	2,1		1537
		500 mg/L	0,053	2,6		73950
		500 mg/L	0,049	2,7		84650
14	Tox	10 mg/L	0,012			6985
		10 mg/L	0,018			4028
		500 mg/L	0,014			72500
		500 mg/L	0,039			82850
	Mutant	10 mg/L	0,084			1279
		10 mg/L	0,139			414
		500 mg/L	0,135			74950
		500 mg/L	0,121			82650
16	Tox	10 mg/L	0,015	2,2	15,9	6930
		10 mg/L	0,019	2	26,5	2890
		500 mg/L	0,016	2,5	22,6	69850
		500 mg/L	0,047	2,9	33,4	81550
	Mutant	10 mg/L	0,214	3,7		54
		10 mg/L	0,253	4		108
		500 mg/L	0,281	5,4		72950
		500 mg/L	0,299	6,8		81200
18	Tox	10 mg/L	0,025	1,9	33,3	7214
		10 mg/L	0,023	1,9	30,6	2612
		500 mg/L	0,023	1,9	28,6	74900
		500 mg/L	0,077	2,5	172,9	80400
	Mutant	10 mg/L	0,297	3,7		61
		10 mg/L	0,286	3,9		108
		500 mg/L	0,328	6,6		72050
		500 mg/L	0,428	10,4		71700
20	Tox	10 mg/L	0,061	2,4	112,7	6683
		10 mg/L	0,036	2,2	54,1	2653
		500 mg/L	0,041	2,3	63,8	68650
		500 mg/L	0,171	3,7	227,2	76200
	Mutant	10 mg/L	0,313	3,9		79
		10 mg/L	0,293	4,4		43
		500 mg/L	0,399	8,1		71250
		500 mg/L	0,515	12,4		69650
22	Tox	10 mg/L	0,209	3,3	44,3	3759
		10 mg/L	0,081	2,2	55,8	2086
		500 mg/L	0,106	2,9	54,3	65350
		500 mg/L	0,352	6,6	154,6	68100
	Mutant	10 mg/L	0,315	3,5		74
		10 mg/L	0,298	3,5		62
		500 mg/L	0,52	10,7		62550

		500 mg/L	0,629	14,2		65300
24	Tox	10 mg/L	0,267	3,7	153,7	1129
		10 mg/L	0,225	3,7	65,7	1427
		500 mg/L	0,274	5,2	419	47500
		500 mg/L	0,349	6,5	336,5	55700
	Mutant	10 mg/L	0,318	3,4		30
		10 mg/L	0,302	4,2		32
		500 mg/L	0,615	13,1		51300
		500 mg/L	0,629	21,7		49500
26	Tox	10 mg/L	0,312	3,8	114,7	2196
		10 mg/L	0,292	3	156,5	537
		500 mg/L	0,27	6,3	603,5	17650
		500 mg/L	0,281	5,8	534,1	39450
	Mutant	10 mg/L	0,317	3,3		74
		10 mg/L	0,299	3,5		135
		500 mg/L	0,675	15,1		48500
		500 mg/L	0,751	23,8		46950