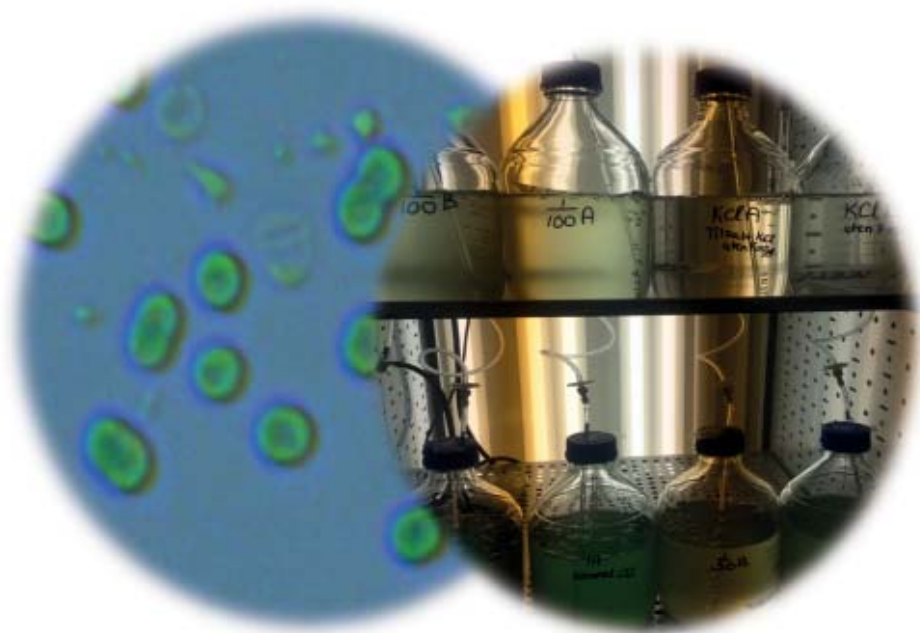


Mastergradsoppgave

Tine Sørensen

Vekst og toksininnhold hos
Microcystis aeruginosa i
batch kultur, som funksjon
av lysintensitet og fosfatmengder

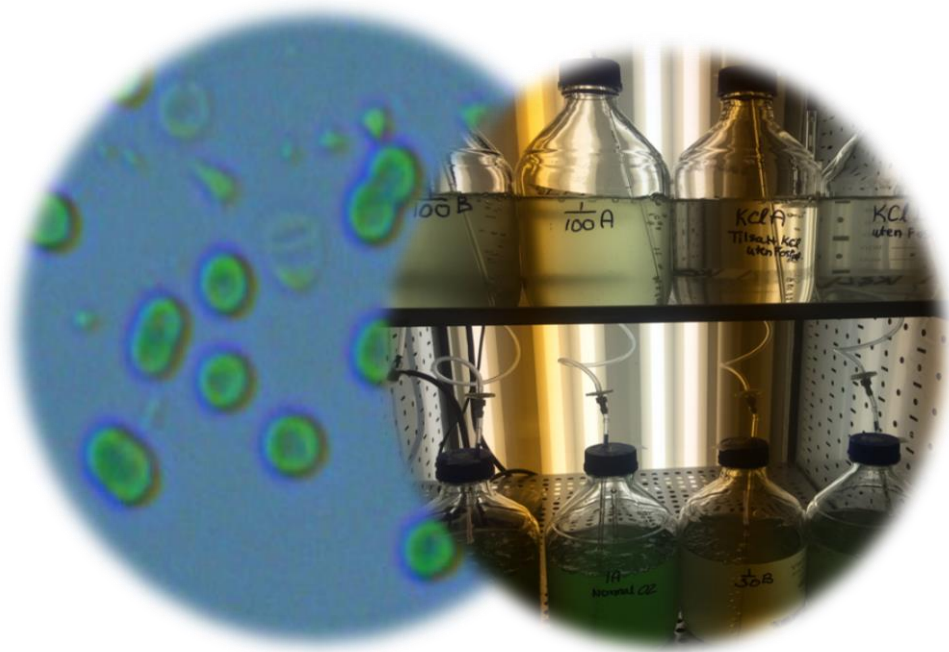


Høgskolen i Telemark

Fakultet for allmennvitenskapelige fag

Masteroppgave i Natur- Helse og Miljøvern

Vekst og toksininnhold hos *Microcystis aeruginosa* i batch kultur, som funksjon av lysintensitet og fosfatmengder



Tine Sørensen
2015

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

<http://www.hit.no>

Bilde på forside tatt av Tine Sørensen

© 2015 Tine Sørensen

Growth and toxin content of *Microcystis aeruginosa* in batch culture, as a function of light intensity and phosphate concentration

Tine Sørensen

Abstract

The growth and microcystin content of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 were investigated in batch cultures at different light intensities and phosphate concentrations. *M. aeruginosa* was cultured in O2 medium with different phosphate concentrations (4450 µg P/l, 89 µg P/l and 45 µg P/l) under respectively low ($9 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) and high ($101 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) intensity lighting. O2 medium without added phosphate was also tested. In addition an equivalent examination on a phosphate-starved start culture was conducted. The results show that high light intensity led to rapid growth. Increased phosphate concentration resulted in higher biomass. Only in experiments with phosphate-starved start cultures was a relationship between the growth rate and amount of phosphate seen. Increased light and increased phosphate concentration led to faster microcystin production and higher microcystin content. Phosphate-starved *M. aeruginosa* that was grown in a medium without any added phosphate showed poor growth and low microcystin production. Results from this study indicate that phosphate and light are important for growth and microcystin production by *M. aeruginosa*. From an environmental perspective, this can indicate that increased phosphorus pollution in the growth season will cause eutrophication with excessive growth of cyanobacteria and higher microcystin amounts. This can result that water being unfit for drinking and health hazards for recreational users.

Key words: Cyanobacteria · *Microcystis aeruginosa* · light · phosphorus · microcystin

Vekst og toksininnhold hos *Microcystis aeruginosa* i batch kultur, som funksjon av lysintensitet og fosfatmengder

Tine Sørensen

Sammendrag

Vekst og microcystininhold hos *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 ble undersøkt i batch kulturer ved ulik lysintensitet og fosfatmengder. *M. aeruginosa* ble dyrket i O2 medium, tilsatt ulike fosfatmengder (4450 µg P/l, 89 µg P/l og 45 µg P/l) ved henholdsvis lav ($9 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) og høy ($101 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) lysintensitet. O2 medium uten tilsatt fosfat ble også testet. Det ble i tillegg utført tilsvarende undersøkelser av en fosfatutsultet forkultur. Resultatene viste at økt lysintensitet førte til raskere vekst. Økt fosfatkonsentrasjon førte til høyere biomasse. Kun forsøk med fosfatutsultet forkultur viste sammenheng mellom veksthastighet og fosfatmengde. Økt lys og økt fosfatkonsentrasjon førte til raskere microcystinproduksjon og høyere microcystininhold. Fosfatutsultet *M. aeruginosa* som ble dyrket i medium uten tilsatt fosfat hadde dårligst vekst og produserte minst microcystin. Resultatene fra denne studien indikerer at fosfat og lys er viktig for både vekst og microcystinproduksjon hos *M. aeruginosa*. Sett fra et miljøperspektiv vil dette tyde på at økt fosfor- forurensning i produksjonssesongen vil føre til eutrofiering med økt vekst av cyanobakterier og høyere microcystinmengder. Dette kan resultere i at vannet blir uegnet som drikkevann og helsefarlig med tanke på rekreasjon.

Nøkkel ord: Cyanobakterier · *Microcystis aeruginosa* · lys · fosfor · microcystin

Forord

Denne masteroppgaven er en del av mastergraden ved instituttet for natur- helse- og miljøvern ved Høgskolen i Telemark. Oppgaven er skrevet i artikkelform.

For det første vil jeg takke Synne Kleiven og Hans Utkilen for at jeg fikk jobbe med dette tema som er av stor interesse. Dere begge fortjenter en stor takk for all veiledning, råd og hjelp som jeg har fått underveis under skriveprosessen og på lab.

Jeg vil også rette en stor takk til Karin. B. Li og Bjørn Steen for all hjelp på laben. En stor del av masteroppgaven foregikk på lab og dere har lært meg utrolig mye.

I tillegg vil jeg takke Ralph Stålberg som har hjulpet meg med grafer o.l i Excel og Andrew Jenkins som har hjulpet meg med abstract.

Til slutt vil jeg takke min familie for stor støtte og forståelse av at jeg har vært mye opptatt og lite til stedet. En siste takk til min samboer Thomas som også har støttet meg underveis i vanskelige perioder.

Skien, 8.5.2015

Tine Sørensen

Innledning

Cyanobakterier er fotosyntetiske prokaryoter som er kjent for å produsere en rekke toksiner (Gjølme et al. 2010). Disse toksinene har ført til flere forgiftninger av mennesker og dyr i store deler av verden (Kuiper-Goodman et al. 1999). Hepatotoksinene microcystin (MC) er de best studerte cyanotoksinene (Gjølme et al. 2010) som blant annet produseres av cyanobakterien *Microcystis aeruginosa* (Sivonen & Jones 1999; Gjølme et al. 2010). MC er sykliske heptapeptider som syntetiseres ikkeribbosomalt (Dittmann et al. 1997), og som frigjøres ved celledød (Gjølme et al. 2010). Toksinene er hemmere av fosfatase 1 og 2A som resulterer i celledeformering på grunn av hyperfosforylering (Gjølme et al. 2010; Chen et al. 2011). Avhengig av konsentrasjon og tid kan MC-LR (det mest toksiske microcystinet) bryte ned DNA (Rao & Bhattacharya 1996). International Agency for research on cancer (IARC) har klassifisert MC-LR som mulig kreftfremkallende (WHO 2010). Globalt er MC de mest forekommende cyanotoksinene i både ferskvann og brakkvann (Utkilen & Gjølme 2014) og per i dag er rundt 90 varianter påvist (Welker & Von Döhren 2006; Utkilen & Gjølme 2014). World Health Organization (WHO) har satt en grenseverdi for MC-LR på 1 µg/l, ved inntak av 2 liter vann per dag (WHO 1998). MC-LR er den varianten som foreløpig har nok toksikologiske data til å kunne bestemme en grenseverdi (Falconer et al. 1999). Andre land har senere utarbeidet nasjonale grenseverdier for andre cyanotoksiner (Chorus 2012; Farrer et al. 2015), men dette har ikke blitt gjort i Norge (Utkilen & Gjølme 2014).

Hvorfor cyanobakterier produserer toksiner er ennå et ubesvart spørsmål. Studier tyder på at det kan være en form for forsvarsmekanisme mot beitedyr. En økning av MC-produksjon er observert etter at *Microcystis* ble eksponert for *Daphnia* (Jang et al. 2007) og det er påvist at *Daphnia* foretrekker ikke- toksiske stammer som føde (Becker 2010). Flere studier peker på at miljømessige faktorer kan påvirke vekst og toksinproduksjon hos *Microcystis*. Studier som har sett på effekten av lys (Watanabe & Oishi 1985; Sivonen 1990; Utkilen & Gjølme 1992; Wiedner et al. 2003) har vist at lys har en påvirkning på vekst og toksininnhold. Toksininnholdet til *Microcystis* er høyest ved 40- 50 µE m⁻²s⁻¹, mens høyere lysintensitet fører til en nedgang (Utkilen & Gjølme 1992; Wiedner et al. 2003). En økning i veksthastigheten har også blitt observert ved lysintensiteter opp til 40- 50 µE m⁻²s⁻¹, men forble konstant ved høyere lysintensitet (Wiedner et al. 2003). Andre studier har funnet at høyt lys stimulerer genene for microcystinsyntetasen som øker produksjon av MC (Kaebernick et al. 2000;

Sevilla et al. 2012). Det hevdes også at økende produksjon av MC kan forklares av varierende stress som organismen opplever (Meissner et al. 2013).

Fosfor er et viktig næringsstoff for vekst av cyanobakterier (Šejnohová & Maršálek 2012). Men studier som har sett på effekten av fosfor knyttet til vekst og toksinproduksjon er motstridende. Veksthastigheten til *M. aeruginosa* øker under høye konsentrasjoner av fosfor og blir redusert ved fosformangel (Wang et al. 2010). Oh et al (2000) viste at økt fosfor førte til økt vekst og MC-produksjon hos *M. aeruginosa* i kjemostat og at det er en lineær sammenheng mellom vekst og MC-produksjon. Watanabe og Oishi (1985) observerte noe lavere toksininnhold i *Microcystis* dyrket i fosfatbegrensende medier, men fant ingen forskjell i vekst. Det er også vist at økt fosfor fører til en nedgang av MC-innhold (Kameyama et al. 2002). Davis et al (2009) viste at en økning av fosfor og temperatur førte til økt vekst av giftige *Microcystis* i forhold til ikke giftige stammer. Dette kan fremme veksten av giftige populasjoner ved eutrofiering og klimaendringer (Davis et al. 2009).

Både lys og fosfor er viktige energibærere for cellens metabolisme (Bickel et al. 2000; Madigan et al. 2012) og det er observert en direkte sammenheng mellom energitilstanden og MC-innhold hos *Microcystis aeruginosa* (Bickel et al. 2000). Som følge av dette vil hypotesen for mitt arbeid være at økt fosfat og lys vil føre til økt vekst og MC-innhold hos *M. aeruginosa*.

Hensikten med denne studien er å undersøke MC-innhold og vekst av *M. aeruginosa* ved ulike fosfatkonsentrasjoner, ved henholdsvis høy og lav lysintensitet. Dette gjøres for å øke forståelsen av hvilke faktorer som påvirker vekst og toksinproduksjon hos *M. aeruginosa*, og for å bidra til å forutsi oppblomstringer i naturen.

Material og metoder

Organisme og vekstbetingelser

Microcystis aeruginosa (PCC 7806) er en encellet kolonidannende cyanobakterie som ble brukt i denne studien.

M. aeruginosa ble dyrket i batch kultur i 2 l glassflasker med 1,8 l sterilt O₂ medium (Van Liere & Mur 1978) (vedlegg 1) Mediet ble autoklavert ved 120 °C i 20 min. 10 ml bakterier ble tilsatt per glassflaske fra en stasjonær forkultur (dyrket i O₂ medium ved 9 microeinstein per kvadratmeter per sekund ($\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$)). Bakteriekulturen på 10 ml som ble tilsatt i glassflaskene, er beregnet å tilføre en fosfor mengde på 29 μg /flaske i forsøk 1 og 2 og 0,4 μg /flaske i forsøk 3 (tabell 1). Forkulturen som ble tilsatt i forsøk 3 var på forhånd utsultet på fosfat. Det ble tilsatt tre ulike fosfatmengder (K₂HPO₄) i de ulike behandlingene i et eksperiment. I forsøk hvor fosfat ikke ble tilsatt i mediet, ble kalium i K₂HPO₄ erstattet med KCl (tabell 1). Hver flaske med lik behandling hadde en parallell.

Kulturene ble dyrket i et Termaks konstantskap ved 25 °C \pm 0,1 °C ved henholdsvis lav (9 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) og høy (101 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) lysintensitet. Lysstoffrør (philips TLD 36W/33) som gir hvitt lys ble brukt og lysintensiteten ble målt i lux med Hagner universal fotometer som deretter ble omregnet til μE (lux x 0,014) (Chambers 2006). Flaskene ble boblet med luft gjennom 1 ml glasspipette som passerte et filter (sterile 0,2 μm cellulose Acetate Membrane filter) og flaskenes plassering ble rullert annenhver dag (Fig.1). Samme stamme og lik mengde av *M. aeruginosa* ble brukt i alle tre eksperimentene. Forsøkene ble avsluttet i den stasjonære fasen.

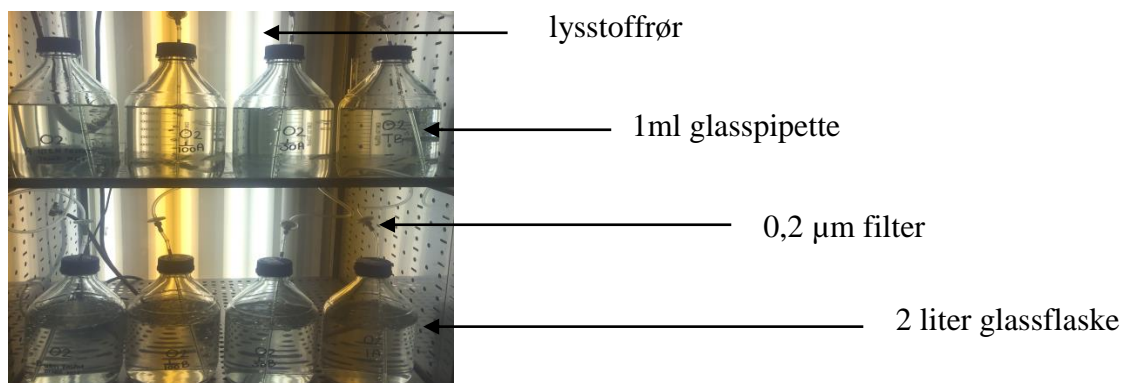


Fig. 1. Eksperimentoppsett i termaks konstantskap ved HiT. Flaskene som ble tilsatt O₂ medium med ulik fosfatmengde. Hver parallell med lik behandling. Gul farge på lysrør kan skyldes bildekvalitet. Foto: Tine sørensen

Tabell 1. Design av de tre ulike eksperimentene.

H= høy K₂HPO₄ konsentrasjon (4450 µg P/l, normalt medium), M= medium K₂HPO₄ konsentrasjon (88,9 µg P/l), L= lav K₂HPO₄ konsentrasjon (44,5 µg P/l) og U= uten tilsatt K₂HPO₄, men tilsatt 21,5 mg KCl/l som erstatning for K. Flaske U i forsøk 2 inneholdt 16 µg P/l fra tilsatt forkultur. Fosfat fra kjemikaliene brukt til å lage O2 mediet er ubetydelig.

	Forsøk 1	Forsøk 2	Forsøk 3
Antall flasker (2L)	6	8	8
Tilsetting av <i>M. aeruginosa</i>/ flaske (dag 0). Fra forkultur	10 ml med en beregnet fosformengde på 29 µg	10 ml med en beregnet fosformengde på 29 µg	10 ml fra flaske U fra forsøk 2. Med en beregnet fosformengde på 0,4 µg
Antall flasker tilsatt di-kaliumhydrogenfosfat (K₂HPO₄)	H = 2 M = 2 L = 2	H = 2 M = 2 L = 2	H = 2 M = 2 L = 2
Antall flasker tilsatt kaliumklorid (KCl) som erstatning for K₂HPO₄	Ingen	U = 2	U = 2
Teoretisk startverdi av fosfat (K₂HPO₄) i 1,8 l medium	H= 4466 µg P/l M= 105 µg P/l L= 61 µg P/l	H= 4466 µg P/l M= 105 µg P/l L= 61 µg P/l U= 16 µg P/l	H= 4450 µg P/l M= 89 µg P/l L= 44,7 µg P/l U= 0,2 µg P/l
Temperatur (°C)	25°C ± 0,1 °C	25°C ± 0,1 °C	25°C ± 0,1 °C
Lysintensitet (µE m⁻²s⁻¹)	9 µE m ⁻² s ⁻¹	101 µE m ⁻² s ⁻¹	101 µE m ⁻² s ⁻¹
Varighet (antall dager)	52 dager	22 dager	22 dager

Prøvetaking

Prøvetaking for måling av optisk tetthet (OD_{740nm}), pH, fosfat, protein, MC-LR og celledelling ble utført annenhver dag. Kun pH og optisk tetthet (OD_{740nm}) ble målt samme dag som prøvene ble tatt. pHmåling ble utført fra dag 42 i første forsøk, og fra dag 1 i forsøk 2 og 3. Sterile 25 ml pipetter ble brukt til å ta ut prøver fra flaskene til alle analysene. For å få nok mengde til pHmåling, ble pH målt først. Til fosfatanalysene ble 15 ml filtrert gjennom 0,45 μm cellulose nitratfilter (Sartorius Biolab Product) og 150 μl 4 M svovelsyre ble tilsatt. 1,5 ml prøve ble tatt ut for celledelling og tilsatt 15 μl glutaraldehyd (SIGMA G6257, Grade11 25 % aqueous solution). Prøvene for både fosfat og celledelling ble satt på kjølerom ved 3°C og fosfatprøvene ble analysert ved et senere tidspunkt. 2 ml ble pipettert ut i glassrør til både protein- og MCanalyser og frosset (-18 C°). Prøver for celledelling ble ikke analysert da apparatet (casy scharfe system reg.nr 5948) var ute av drift.

Analysemetoder

Optisk tetthet (OD) ble målt ved 740 nm ved hjelp av PerkinElmer UV/VIS Spectrometer Lambda 25 i 1 cm kvartskuvette (QS). pH ble målt med PHM210 standard pH meter (meterLab).

Fosfatanalysene ble utført i henhold til NS 4724 (1984). 7,5 ml prøve ble blandet med 0,3 ml askorbinsyre og 0,3 ml amoniummolybdat og målt etter 15 min ved hjelp av PerkinElmer UV/VIS Spectrometer Lambda 25. Absorbansen ble målt ved 880 nm. Fosfatkonsentrasjonen ble lest av i μg P/l og standarder på 5, 10, 25, 50, 100, 250 μg P/l ble anvendt. Fortynninger på 10 og 100 ble brukt for å ligge innenfor standardkurven.

Protein ble analysert ved Lowrys (1951) metode. Prøven ble målt i 1cm kvartskuvette (QS) ved 750 nm med PerkinElmer UV/VIS Spectrometer Lambda 25 og lest av i $\mu g/ml$. Standarder på 0, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 50 $\mu g/ml$ ble benyttet.

Microcystinprøvene ble tint og frosset to ganger før analyse. Analysemetoden som deretter ble brukt var i henhold til metoden som følger microcystin ELISA- kit fra Abraxis, Biosense laboratories 520011. Ved hjelp av ELISA Accu Reader ble resultatene lest av ved en bølgelengde på 450 nm. Fortynninger på 10, 100, 500 og 1000 ble anvendt for å ligge innenfor måleområdet til kittet på 0,10- 5,0 μg microcystin/l.

Behandling av data

I denne studien ble OD_{740nm} og protein brukt som mål på biomasse. Delingshastighet (v) og generasjonstid (g) ble beregnet ved formlene som er beskrevet av Schlegel (1986) på følgende måte: $v = \frac{n}{t} = \frac{\lg N - \lg N_0}{\lg 2(t-t_0)}$ (N er endring i biomasse/per tidsenhet), $g = \frac{t}{n} = \frac{1}{v}$ (tiden det tar for en fordobling av cellen). Delingshastigheten ble beregnet fra den eksponentielle vekstfasen og OD_{740nm} ble brukt som et mål på biomasse. Delingshastighet og veksthastighet antas å være ekvivalente etter tabell 6.4 fra Schlegel (1986). I denne studien ble begrepet veksthastighet benyttet. Formelen for delingshastighet (med unntak av log) ble også brukt for å regne ut endringer i MC ($\mu\text{g/l}$) per døgn. Toksininnhold i cellene ble uttrykt som forholdet mellom MC og proteinmengde ($\mu\text{g MC/mg protein}$), og totalt MC-innhold som MC $\mu\text{g/l}$. Alle resultatene ble beregnet ut ifra gjennomsnittsverdiene for parallellene (med lik behandling). MC-innhold, fosfatmengde og vekst (OD_{740nm}) ble deretter presentert i grafer utført i Excel.

Feilkilder

Ikke alle microcystin- og proteinprøver ble analysert på grunn av økonomiske og tidsmessige grunner. Microcystinprøver for første og siste dag ble analysert fra hver behandling i hvert eksperiment. Deretter ble prøver valgt ut punktvis fra den eksponentielle vekstfasen og på samme dager som protein hadde blitt analysert. Dette ble gjort for å beregne forholdet mellom MC og proteinmengde ($\mu\text{g MC/mg protein}$). Proteinprøvene som ble analysert i de ulike behandlingene var fra første dag og deretter punktvis fra eksponentiell vekst til stasjonærfase. pHmåling ble ikke startet før dag 42 i første forsøk fordi det ikke ble vurdert før den tid.

Resultater og diskusjon

Effektene av lys og fosfat på vekst hos M. aeruginosa

Tre ulike forsøk med *Microcystis aeruginosa* i batch kulturer ble sammenliknet. Kulturene vokser godt under lav ($9 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) og høy ($101 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) lysintensitet (Fig. 2a, b). Resultatene bekrefter hypotesen om at økt lys og fosfat har en positiv effekt på vekst av organismen. Høyt lys førte til økt veksthastighet/døgn (tabell 2). Ved lav lysintensitet var kortest generasjonstid på cirka 6,6 døgn, mens kortest generasjonstid under høyt lys var på cirka 1,2 døgn hos fosfatutsultet forkultur (tabell 3). Det er vist at veksthastigheten til *Microcystis* PCC 7806 øker opptil cirka 40 par ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), og blir konstant ved høyere lysintensitet (Wiedner et al. 2003). Hadde veksten til *M. aeruginosa* i denne studien blitt undersøkt ved $40 - 50 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ er det grunn til å anta at veksthastigheten ville vært lik veksthastigheten under høyt lys. Det er tydelig at økt fosfat fører til økt biomasse innenfor de ulike behandlingene (Fig. 2). Det er god sammenheng mellom veksthastighet og fosfatmengde hos fosfatutsultet forkultur (tabell 2), men ingen sammenheng i forsøk 1 og 2. En årsak til dette kan være at kulturene vokser på internlagring av fosfat. Kulturen uten tilsatt fosfat ved høy lysintensitet (Fig. 2b) innholdt en forurensing på $16 \mu\text{g P/l}$ fra tidligere medium som trolig er grunnen til vekst, selv om den hadde dårligst vekst i dette forsøket. Resultatene viser tydelig at fosfatutsultet forkultur tilsatt i medium uten fosfat vokser minimalt (Fig. 2c) med en veksthastighet på $0,096/\text{døgn}$ (tabell 2). Resultatene fra fosfatutsultet forkultur støtter studier som har vist at økt fosfor fører til økt vekst av *M. aeruginosa* (Oh et al. 2000; Wang et al. 2010) og at veksten er hemmet ved fosformangel (Wang et al. 2010).

Tabell 2. Veksthastighet (endring i log. $OD_{740\text{nm}}$ per døgn) hos *M. aeruginosa* og tilsatt fosfatmengder, ved lav ($9 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) og høy ($101 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) lysintensitet. H= høy K_2HPO_4 konsentrasjon ($140 \mu\text{mol/l}$), M= medium K_2HPO_4 konsentrasjon ($2,9 \mu\text{mol/l}$), L= lav K_2HPO_4 konsentrasjon ($1,4 \mu\text{mol/l}$) og U= uten tilsatt K_2HPO_4 .

O2 medium tilsatt fosfat (K_2PO_4) $\mu\text{mol/l}$	Veksthastighet/døgn		
	Forsøk 1 $9 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$	Forsøk 2 $101 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$	Forsøk 3 $101 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fosfatutsultet forkultur
U	-	0,63	0,096
L	0,13	0,69	0,54
M	0,135	0,68	0,65
H	0,15	0,66	0,83

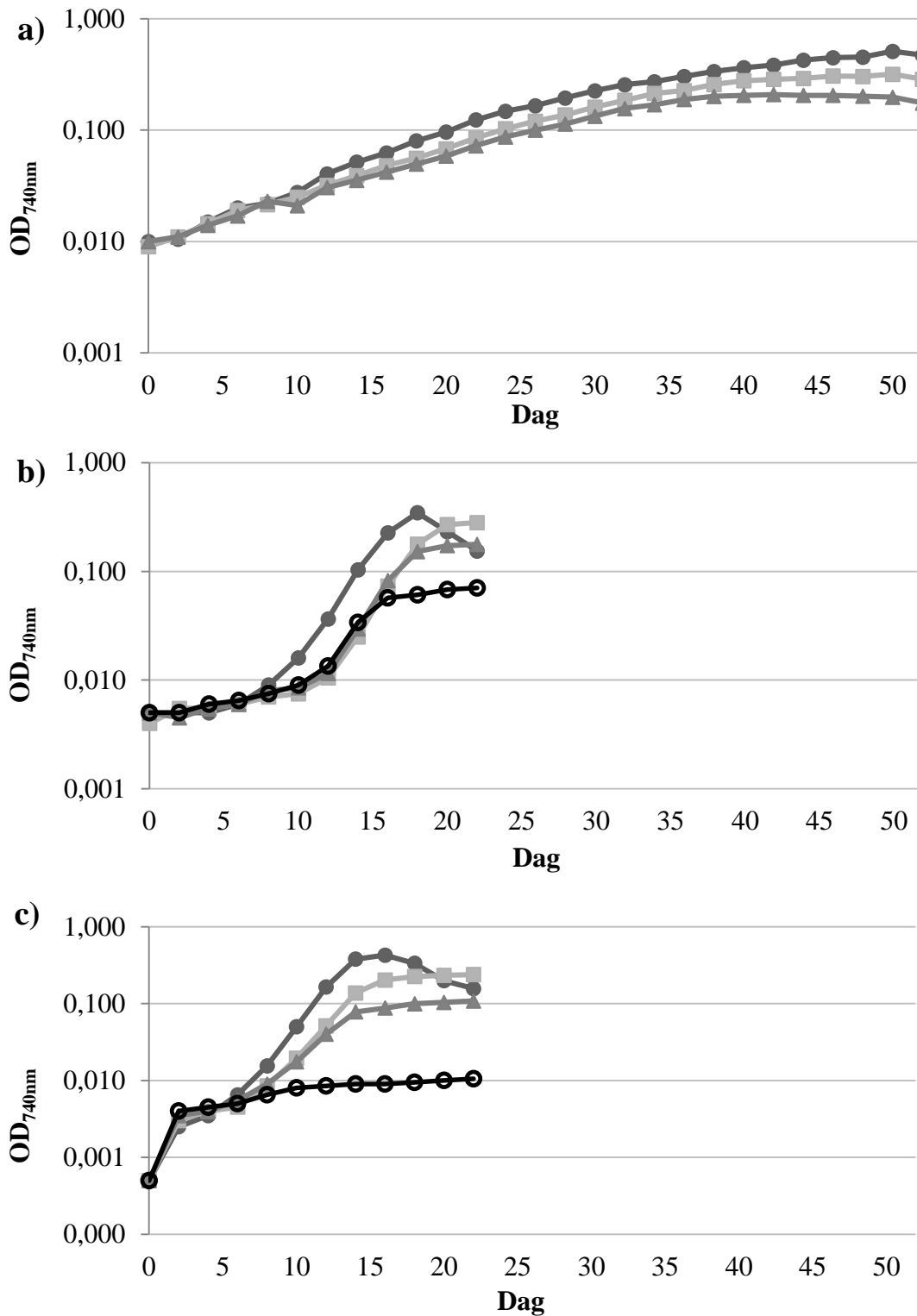


Fig. 2. Vekst (OD_{740nm} med logaritmisk skala) hos *M. aeruginosa* ved lav ($9 \mu E m^{-2} s^{-1}$) og høy ($101 \mu E m^{-2} s^{-1}$) lysintensitet over tid. a) Forsøk ved lav lysintensitet, b) forsøk ved høy lysintensitet og c) fosfatutsultet forkultur ved høy lysintensitet. ● = høy (H), ■ = medium (M) og ▲ = lav (L) fosfatmengde (K_2HPO_4). ○ = (U) er behandling uten tilsatt K_2HPO_4 .

Tabell 3. Generasjonstid for *M. aeruginosa* ved lav ($9 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) og høy ($101 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) lysintensitet tilsatt: høy (H), medium (M), lite (L) og uten (U) tilsatt fosfat

	Generasjonstid for medium H	Generasjonstid for medium M	Generasjonstid for medium L	Generasjonstid for medium U
Forsøk 1 ($9 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	6,6 døgn	7,4 døgn	7,7 døgn	-
Forsøk 2 ($101 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	1,5 døgn	1,5 døgn	1,4 døgn	1,6 døgn
Forsøk 3 ($101 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	1,2 døgn	1,5 døgn	1,9 døgn	10 døgn

Som det vises i figur 2b, c får *M. aeruginosa* som ble dyrket i medium tilsatt høy (H) fosfat under høy ($101 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) lysintensitet en nedgang i stasjonær fase. Nedgangen i biomassen kan skyldes at næringsalter i mediene ble brukt opp fordi opptaket var høyt da veksten økte. Under den stasjonære fasen fikk begge kulturene i medium H under høy ($101 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) lysintensitet en synlig nedgang av cellepigmenter, de ble gule. Det kan skyldes jernmangel (Fe), da det tidligere har blitt vist at jernbegrensning kan føre til en nedgang i klorofyll- a, fykobiliproteiner og vekst hos *Microcystis* (Xing et al. 2007). En annen grunn kan være at kulturene fikk for sterkt lys ettersom de også klumpet seg sammen på bunnen av flaskene. Det er kjent at *Microcystis* danner kolonier (Sommaruga et al. 2009) og regulerer oppdriften med gassvesikler (Ibelings et al. 1991a; Ibelings et al. 1991b) for å beskytte seg mot sterkt lys. Under høy lysintensitet kan lysering av cellene forekomme (Bhaya et al. 2000) som fører til en nedgang i biomassen, men ettersom medium med redusert fosfat ikke får lik nedgang er det trolig ikke lyset som er årsaken. Dessuten var fosfatinnholdet i mediet høyt, som tyder på at det ikke var mangel på fosfat (Fig. 3a). En høy pH-verdi på rundt 10 ble målt under den stasjonære fasen (vedlegg 5b, c) som kan være en annen grunn til nedgangen i biomassen. Karbon fra CO_2 er nødvendig for å produsere aminosyrer og for å danne sukker ved hjelp av fotosyntesen. Ved kraftig vekst kan CO_2 bli fjernet (Gjølme et al. 2010) og en reduksjon av CO_2 vil resultere i en pH-økning (Økland & Økland 2006).

Løst fosfat i mediet ble målt i de ulike behandlingene og resultatene viser en tydelig reduksjon ved vekstøkning (Fig. 3). Figur 3 er representative for forsøkene. Reduksjonen av fosfat i mediet indikerer at bakteriene tar opp fosfat når de vokser. Medium H under lav ($9 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) lysintensitet (forsøk 1) har en relativ, stabil fosfatmengde gjennom hele vekstfasen (vedlegg 2a). Fosfatinnholdet til Medium H under høy ($101 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) lysintensitet hos fosfatutsultet

forkultur (vedlegg 2h) har en kraftigere nedgang ved eksponentiell vekst. Når veksten avtar stiger fosfatinholdet (Fig. 3a). En nedgang i biomassen kan bety at cellene sprekker, som fører til at fosfat blir frigjort i mediet (Wang & Chen 2008). Kulturene med fosfatbegrensing går inn i stasjonær fase etter dag 14 i forbindelse med fosfatmangel i mediet (Fig. 3b).

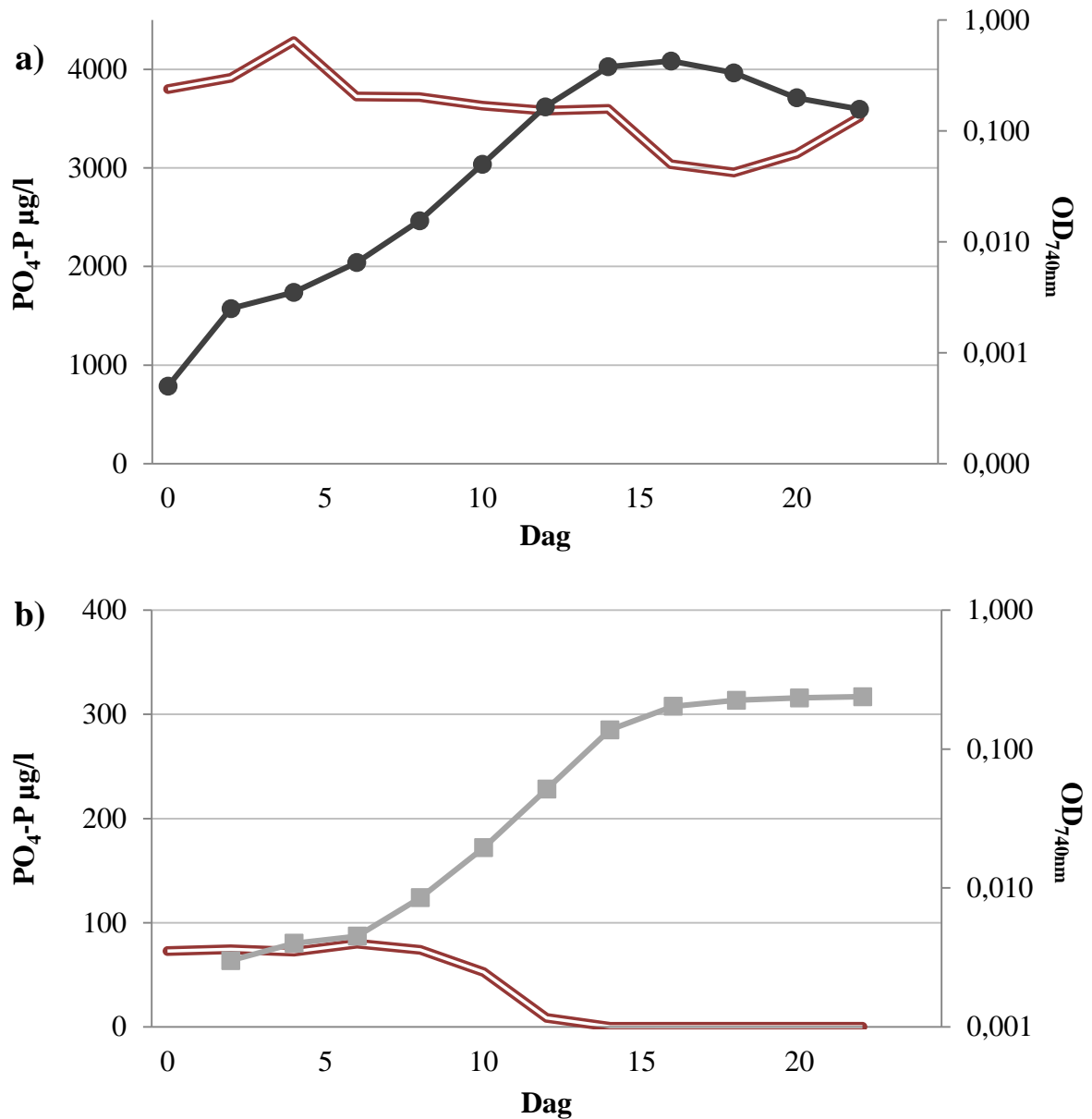


Fig. 3. Fosfatinnhold ($\text{PO}_4\text{-P}$) $\mu\text{g/l}$ og vekst ($\text{OD}_{740\text{nm}}$ med logaritmisk skala) av *M. aeruginosa* under høy ($101 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) lysintensitet. a) ● = $\text{OD}_{740\text{nm}}$ i medium tilsatt høy (H) fosfat, b) ■ = $\text{OD}_{740\text{nm}}$ i medium tilsatt medium (M) fosfat. — = Fosfatinnhold $\mu\text{g/l}$.

Effektene av lys og fosfat på MC-innhold

Både lys og fosfat er viktige energibærere (Bickel et al. 2000; Madigan et al. 2012), og det er vist en positiv sammenheng mellom energitilstanden og MC-innhold hos *M. aeruginosa* (Bickel et al. 2000). Resultatene fra mine eksperimenter viser at høyt lys og økt fosfat gir høyere totalt MC-innhold (i $\mu\text{g/l}$) enn forsøk under lavt lys (Fig. 4a, b). Under høy ($101 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) lysintensitet var MC-produksjonen raskere, og det totale MC-innholdet (i $\mu\text{g/l}$) ble høyere i medium som ikke var fosfatbegrenset (Fig. 4b). Høyeste konsentrasjon av total MC ble målt til $1698 \mu\text{g/l}$ under stasjonær fase ved høy ($101 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) lysintensitet (Fig. 4b), mens høyeste MC konsentrasjon ved lav ($9 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) lysintensitet var $1213 \mu\text{g/l}$ (Fig. 4a). Disse funnene kan støtte hypotesen om at høyt lys fører til økt MC-innhold og som kan bety at høyt lys stimulerer genene for MC-syntetase som øker MC-produksjon (Kaebernick et al. 2000; Sevilla et al. 2012). Det er også blitt observert at toksininholdet til *M. aeruginosa* øker i lysintervallet fra $7,53-30,1 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ i batch kultur (Watanabe & Oishi 1985), og rundt $40-50 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ i kontinuerlig kultur (Utkilen & Gjølme 1992; Wiedner et al. 2003). Laveste toksinkonsentrasjon hos cyanobakterier er vist å forekomme ved lavt lys ($2-20 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (Kaebernick & Neilan 2001). Laveste MC-innhold (i $\mu\text{g/l}$) i min studie ble målt ved høy ($101 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) lysintensitet i medium uten tilsatt fosfat (Fig. 4c).

Lignende funn har blitt vist i kjemostat- forsøk hvor økt fosfor stimulerte MC-produksjon hos *M. aeruginosa*, mens MC per tørrvekt økte under fosforbegrenset forhold (Oh et al. 2000). Watanabe og Oishi (1985) fant noe lavere MC-innhold i celler som hadde redusert P- tilgang (tilsatt 1/10 og 1/20 mindre fosfor i forhold til originalt nivå (50 mg P/l)). Motstridene funn er også vist da en økning av fosfat resulterte i en nedgang av MC-produksjon og MC-innhold hos *Microcystis viridies* NIES 102 i batch kultur (Kameyama et al. 2002). En annen studie av *M. aeruginosa* observerte en økning av *mcyD* transkripsjon og MC-LR under fosfatmangel (N/P 40:1) (Kuniyoshi et al. 2013). Ulike resultater for MC-innhold kan skyldes bruk av ulike dyrkningsmetoder, ulike cyanobakteriestammer, ulike former av stress, eller forskjellige metoder for å analysere og uttrykke toksininhold (Sevilla et al. 2012). Resultatene for MC-innhold i forhold til proteinmengde viser at medier med redusert fosfat har høyere MC-innhold/protein enn medium tilsatt høy (H) fosfat (vedlegg 4). Høyeste MC-innhold i forhold til protein ble beregnet for de to flaskene uten tilsatt fosfat (1223 og $900 \mu\text{g MC/mg protein}$) (vedlegg 4g, k). Ser man nøyer på disse resultatene så er det lavest vekst i disse behandlingene (Fig. 2b, c), samtidig som proteinene også er svært lave ($<0,1$ og $0,01 \mu\text{g/ml protein}$) (vedlegg 6b, c). En vil derfor få et høyt forholdstall.

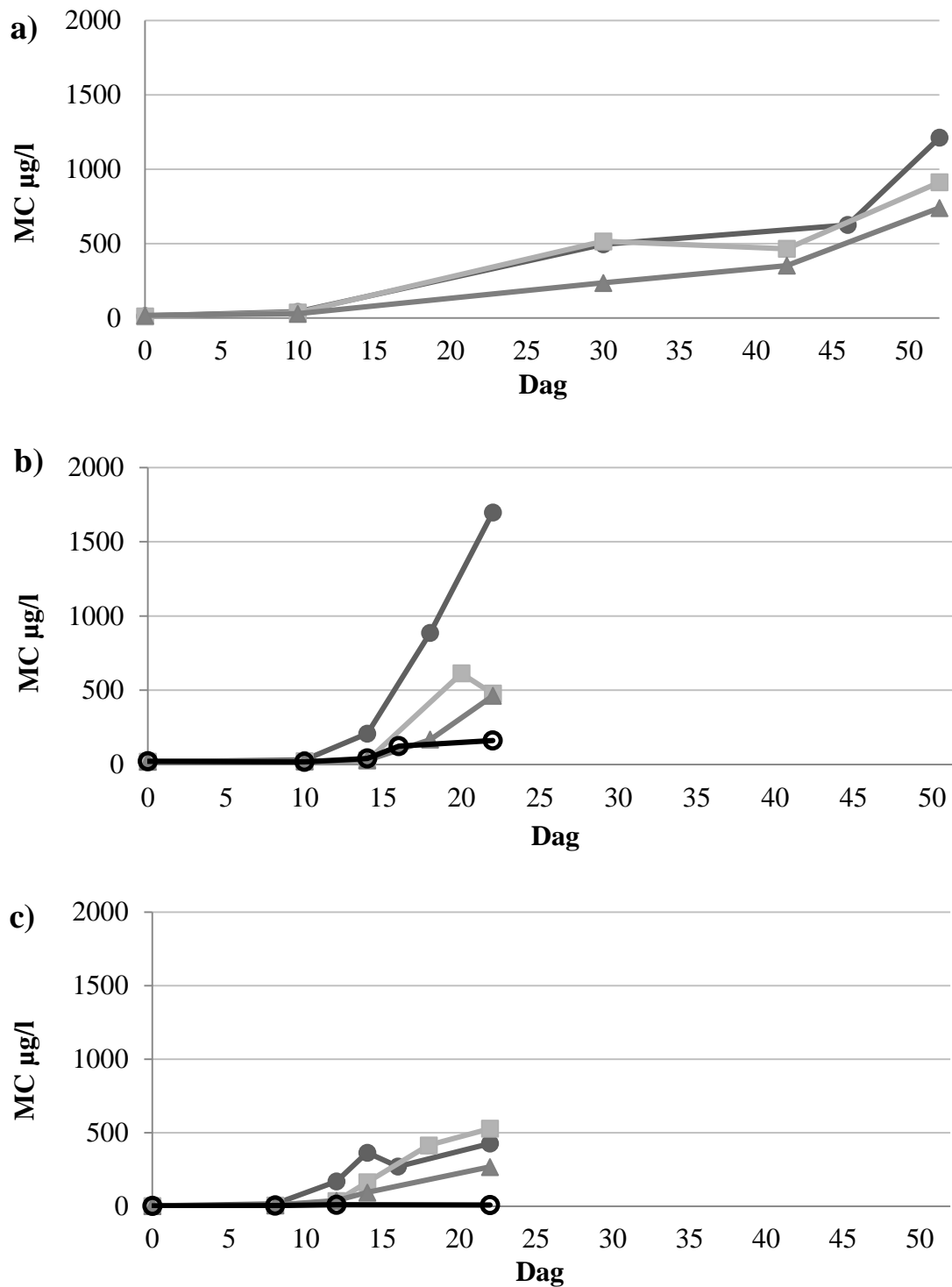


Fig. 4. Totalt MC (i µg/l) over tid i de ulike behandlingene ved henholdsvis a) lav ($9 \mu E m^{-2} s^{-1}$) lysintensitet, b) høy ($101 \mu E m^{-2} s^{-1}$) lysintensitet og c) fosfatutsultet forkultur ved høy ($101 \mu E m^{-2} s^{-1}$) lysintensitet. ● = MC i medium høy (H) fosfat, ■ = MC i medium (M) fosfat, ▲ = MC i medium lite (L) fosfat og ○ = MC i medium uten (U) tilsatt fosfat.

Vekst og MC-innhold hos *M. aeruginosa*

Resultatene for MC-innhold ($\mu\text{g MC/mg protein}$) og totalt MC-innhold (i $\mu\text{g/l}$) i forhold til vekst over tid er svært forskjellig (Fig. 5). Det har blitt påvist en direkte sammenheng mellom MC-innhold per tørrvekt og vekst hos *M. aeruginosa* i nitrogen (N) begrensa kjemostat (Long et al. 2001). Andre studier har vist at MC-innholdet i cellene var høyest under tidlig eksponentiell vekstfase uansett art (Watanabe et al. 1989; Song et al. 1998; Kameyama et al. 2002). De samme tendensene kan tydes i figur 5a, som indikerer en svak økning av MC-innhold ($\mu\text{g MC/mg protein}$) frem til dag 10. MC-innholdet er relativt stabilt frem til dag 30, men reduseres deretter. Totalt MC-innhold (MC i $\mu\text{g/l}$) er positivt korrelert med vekst hos *M. aeruginosa* (Fig 5b). Figur 5 er representative for forsøkene.

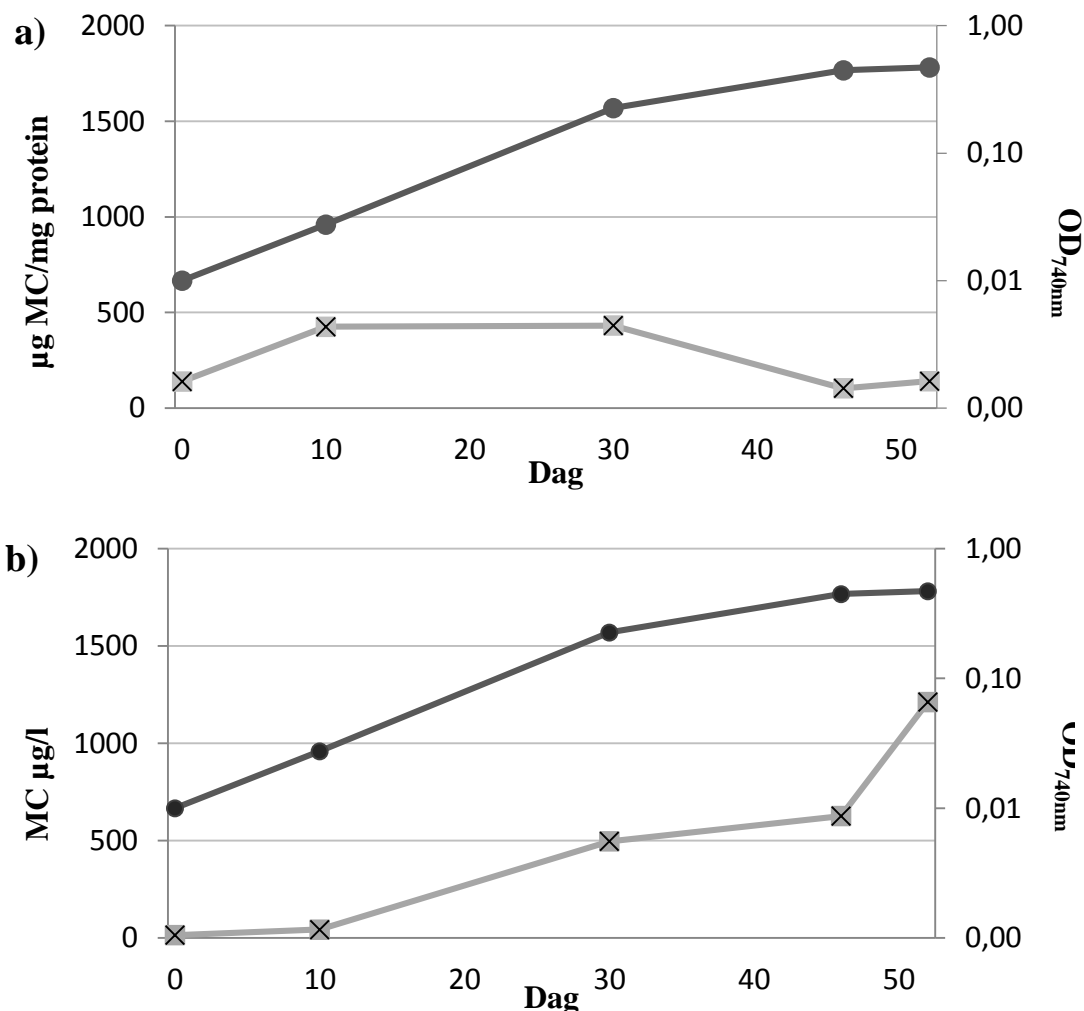


Fig. 5. MC-innhold i forhold til vekst (OD_{740nm} med logaritmisk skala) hos *M. aeruginosa* over tid, ved lav ($9 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) lysintensitet. a) $\mu\text{g MC/mg protein}$, b) MC $\mu\text{g/l}$. Symbol x = MC, ● = vekst (OD_{740nm}) i medium tilsatt H (høy) fosfat.

Oh et al (2000) viste en lineær sammenheng mellom vekst og MC-produksjon hos *M. aeruginosa* i en fosforbegrenset kjemostat. Resultatene fra min studie tyder på at det kan være et visst nivå for fosfat som har en effekt på veksthastighet og MC-produksjon/døgn (Fig. 6). Under lav ($9 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) lysintensitet øker toksinmengdene til en veksthastighet på 0,135, men etter det er ikke MC-produksjonen påvirket av veksthastigheten (Fig. 6a). Ved å sammenligne veksthastighet og MC-produksjon/døgn hos medier tilsatt H (høy) fosfat under lav ($9 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) og høy ($101 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) lysintensitet, tyder resultatene på at lyset er den mest avgjørende faktoren. Medium tilsatt H (høy) fosfat under høy ($101 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) lysintensitet har nesten dobbel så høy MC-produksjon enn medium H under lav ($9 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) lysintensitet (Fig. 6a, b). Det hevdes at økt MC-produksjon også kan forklares av stress som organismen opplever (Meissner et al. 2013). Det kan bety at lyset fungerer som en stressfaktor på *M. aeruginosa*, som kan forårsake den høye MC-produksjonen hos kulturene dyrket med høy (H) fosfat under høy ($101 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) lysintensitet (Fig. 6b).

Det kan se ut som at det er en sammenheng mellom veksthastighet og MC-produksjon hos fosfatutsultet forkultur (Fig. 6c), men ingen klar sammenheng i kulturene under lav ($9 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) og høy ($101 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) lysintensitet (Fig. 6a, b). Ingen klar sammenheng mellom veksthastighet og MC-produksjon hos kulturene (Fig. 6a, b) kan skyldes at kulturene vokser på internlagring av fosfat, da det trolig er årsaken til ingen sammenheng mellom fosfatmengde og veksthastighet i forsøk 1 og 2 (tabell 2).

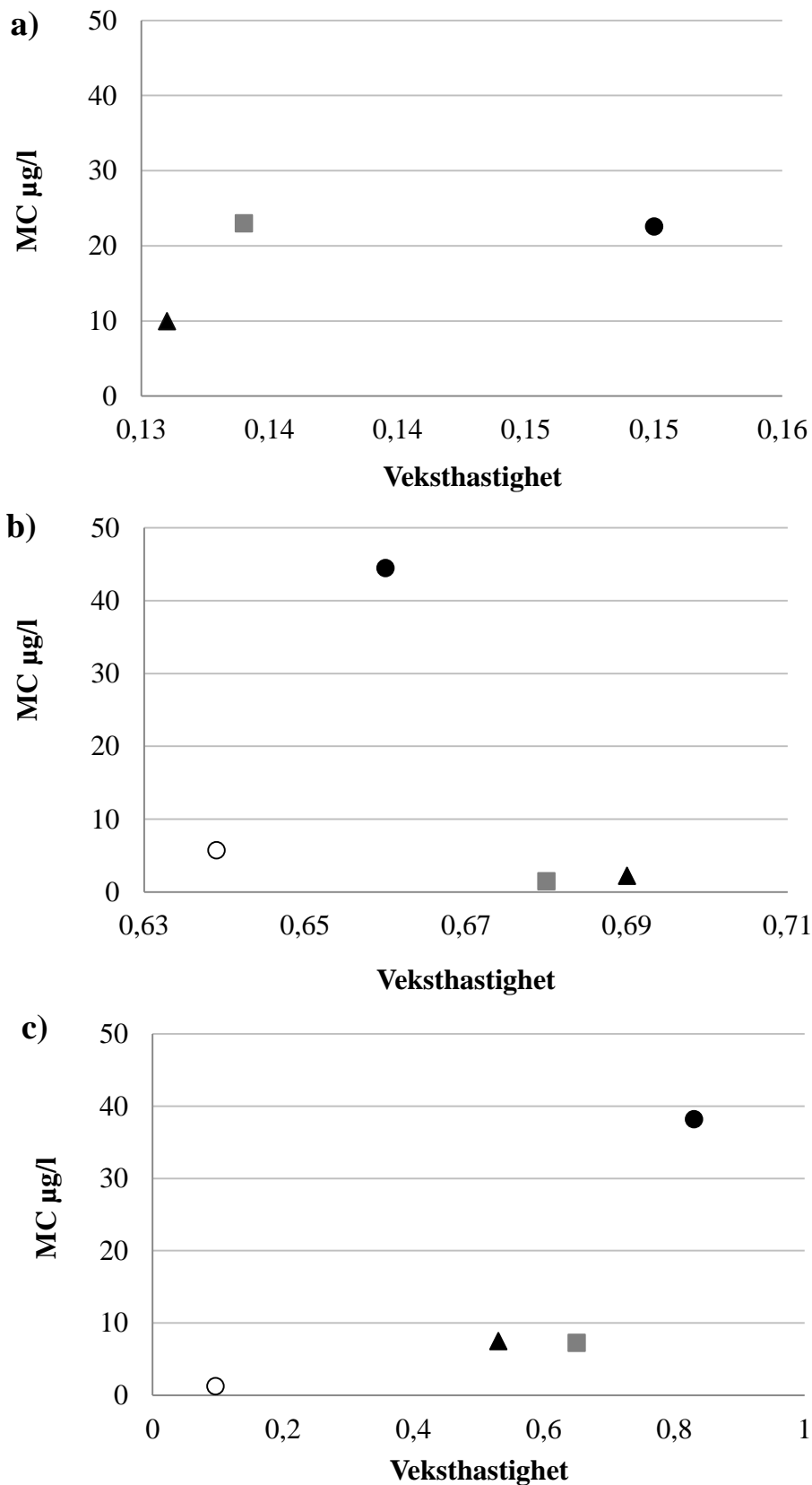


Fig. 6. Veksthastighet- og MC-produksjon per døgn hos *M. aeruginosa* ved henholdsvis a) lav ($9 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$), b) høy ($101 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) lysintensitet og c) fosfatutsultet forkultur ved høy ($101 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) lysintensitet. Medium: ● = H fosfat, ■ = M fosfat, ▲ = L fosfat og ○ = U fosfat.

Resultatene i et miljøperspektiv

I naturlige vannsystemer vil tilgangen på næringsstoffer være mer kontinuerlig sammenlignet med et lukket system som en batch kultur. I tillegg vil fosfatkonsentrasjonene være lavere og andre faktorer som for eksempel beiting, konkurranse og abiotiske forhold vil ha betydning (Šejnohová & Maršálek 2012). Bakterien som er brukt i denne studien har vært isolert i en lang periode og forventes å oppføre seg annerledes enn tilsvarende art i naturen. Isolerte mikroorganismer har en tendens til å miste miljøtilpasningsegenskaper ved dyrking under laboratoriske forhold (Jenkins & Utkilen pers. medd). Som følge av dette gir resultatene en indikasjon på hvordan lys og fosfat vil påvirke vekst og MC-innhold hos *M. aeruginosa*. Resultatene tyder på at vekst bestemmes av mengde fosfat i mediet, mens lys er avgjørende for hvor raskt prosessen går. Selv om høy ($101 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) lysintensitet fører til en raskere veksthastighet, resulterer det også i en dobbelt så kort vekstperiode hos *M. aeruginosa* (Fig. 2). Cyanobakterier synes å være svært tolerante ovenfor høy lysintensitet (Gjølme et al. 2010) og deres evne til å regulere sin egenvekt ved hjelp av gassvesikler vil kunne endre lystilgangen (Ibelings et al. 1991a; Ibelings et al. 1991b) om lyset blir for høyt i naturlige vannkilder. Til sammenligning kan overflaten i en innsjø nå en lysintensitet på 700- 1000 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Mur et al. 1999).

Resultatene viser at *M. aeruginosa* kan vokse selv med en liten fosfatmengde og det er vist at økning av fosfor og temperatur fører til økt vekst av giftige *Microcystis* (Davis et al. 2009). Klimaendringer og forurensing (eutrofiering) av vannkilder kan derfor ha betydning for utvikling av toksinproduserende cyanobakterier. Dette kan føre til store konsekvenser for drikkevannskvaliteten, badevann og rekreasjon i vannkilder og kan forårsake forgiftning av mennesker og dyr (Kuiper-Goodman et al. 1999; Metcalf & Codd 2012). Høy fosfatkonsentrasjon kan i tillegg gi en indirekte stimulans av cyanobakterier fordi fosfat fører til en økning av fytoplankton som gir lavere lystilgang og økt turbiditet. Dette er optimalt for vekst av cyanobakterier (Mur et al. 1999; Gjølme et al. 2010). Cyanobakterier har også et lavt energikrav som gir dem en fordel, i tillegg til høy affinitet for blant annet fosfor som kan gjøre dem konkurransedyktige (Mur et al. 1999). Under gunstige forhold kan cyanobakterier bli den dominante i vannsystemene (Chen et al. 2011). Oppblomstringer av cyanobakterier medfører også til mikrobiologisk nedbrytning som kan begrense livsnødvendig oksygen (O_2) fra fisk (Metcalf & Codd 2012). Enkelte cyanobakteriearter kan tilføre vannkilder lukt og smaksstoffer (geosmin og metylisoborneol) som gjør drikkevann og badevann uappetittlig. Dette er kostbart å forbedre (Gjølme et al. 2010). Nye modeller tyder også på at

cyanobakterienes opptak av fosfat, som senere frigjøres, kan medføre en endring av fosforets syklus og næringsinnholdet i en innsjø (Cottingham et al. 2015).

Konklusjon

Resultatene viser at lys og fosfat påvirker både vekst og MC-innhold hos *M. aeruginosa* i batch kultur. Det er god sammenheng mellom veksthastighet og lysintensitet. Høy lysintensitet fører til raskere veksthastighet og kortere generasjonstid hos *M. aeruginosa*. Økt fosfatkonsentrasjon fører til høyere biomasse og økt MC-innhold (i µg/l) i de ulike behandlingene. Dette tyder på at min hypotese ”økt fosfat og lys vil føre til økt vekst og MC-innhold” kan være riktig, men sammenhengen mellom fosfatmengde, veksthastighet og MC-produksjon er uklar. Kun veksthastigheten til fosfatutsultet forkultur øker tydelig med økt fosfatkonsentrasjon. Det kan også se ut som om det er en sammenheng mellom veksthastighet og MC-produksjon hos fosfatutsultet forkultur.

Sett fra et miljøperspektiv kan økt fosfor- forurensning i produksjonssesongen føre til økt cyanobakterier og høyere MC-mengder. Dette kan blant annet resultere i at vannet blir uegnet som drikkevann og helsefarlig med tanke på rekreasjon. Selv om resultatene fra denne studien tyder på at lys og fosfat er viktige faktorer for både vekst og toksinproduksjon, så kan andre faktorer også ha innvirkning. Mekanismene og faktorene som fremmer toksinproduksjon er fortsatt uklare (Chen et al. 2011; Gehringer & Wannicke 2014). Det er behov for mer forskning på hva som kan føre til økt oppblomstring og toksinproduksjon, for å kunne bidra til å forutsi oppblomstringer i naturen.

Videre kunne det vært interessant å gjennomført tilsvarende eksperimenter, men ved bruk av andre dyrkningsmetoder. Alternative dyrkningsmetoder kunne for eksempel vært kontinuerlig kultur eller innestengningsforsøk (sekk forsøk) og deretter sammenliknet resultatene mot denne studien.

Referanser

- Becker, S. (2010). Biotic factors in induced defence revisited: cell aggregate formation in the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 is triggered by spent *Daphnia* medium and disrupted cells. *Hydrobiologia*, 644 (1): 159-168.
- Bhaya, D., Schwarz, R. & Grossman, A. R. (2000). Molecular Responses to Environmental Stress. I: Whitton, B. A. & Potts, M. (red.) *The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space*, kap. 15. s. 397-442. Dordrecht: Kluwer Academic.
- Bickel, H., Lyck, S. & Utkilen, H. (2000). Energy state and toxin content-experiments on *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanophyta). *Phycologia*, 39 (3): 212-218.
- Chambers, E. G. (2006). Washington: Environmental Growth Chambers. Tilgjengelig fra: http://www.egc.com/useful_info_lighting.php (lest 14.11.14).
- Chen, H., Burke, J. M. & Prepas, E. E. (2011). *Cyanobacterial toxins in fresh waters*. Nriagu, J. O. (red.). Encyclopedia of environmental health, 1. s. 860-871. Amsterdam: Elsevier.
- Chorus, I. (2012). *Current approaches to cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries*, b. 63. Dessau- Roßlau: Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt). Tilgjengelig fra: <http://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/461/publikationen/4390.pdf> (lest 16.04.2015).
- Cottingham, K. L., Ewing, H. A., Greer, M. L., Carey, C. C. & Weathers, K. C. (2015). Cyanobacteria as biological drivers of lake nitrogen and phosphorus cycling. *Ecosphere*, 6 (1): 1-19.
- Davis, T. W., Berry, D. L., Boyer, G. L. & Gobler, C. J. (2009). The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms. *Harmful algae*, 8 (5): 715-725.
- Dittmann, E., Neilan, B. A., Erhard, M., Von Döhren, H. & Börner, T. (1997). Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Molecular microbiology*, 26 (4): 779-787.
- Falconer, I., Bartram, J., Chorus, I., Kuiper-Goodman, T., Utkilen, H., Burch, M. & Codd, G. A. (1999). Safe levels and safe practices. I: Chorus, I. & Bartram, J. (red.) *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring, and management*, kap. 5. s. 155-178. London and New York: WHO, E & FN Spon.
- Farrer, D., Counter, M., Hillwig, R. & Cude, C. (2015). Health-Based Cyanotoxin Guideline Values Allow for Cyanotoxin-Based Monitoring and Efficient Public Health Response to Cyanobacterial Blooms. *Toxins*, 7 (2): 457-477.
- Gehring, M. M. & Wannicke, N. (2014). Climate change and regulation of hepatotoxin production in Cyanobacteria. *FEMS microbiology ecology*, 88 (1): 1-25.
- Gjølme, N., Krogh, T. & Utkilen, H. (2010). Cyanobakterier (blågrønnalger) Oppblomstring og toksinproduksjon, 2010:4. Oslo: Nasjonalt folkehelseinstitutt.

- Ibelings, B. W., Mur, L. R., Kinsman, R. & Walsby, A. E. (1991a). Microcystis changes its buoyancy in response to the average irradiance in the surface mixed layer. *Archiv für Hydrobiologie*, 120 (4): 385-401.
- Ibelings, B. W., Mur, L. R. & Walsby, A. E. (1991b). Diurnal changes in buoyancy and vertical distribution in populations of Microcystis in two shallow lakes. *Journal of Plankton Research*, 13 (2): 419-436.
- Jang, M.-H., Jung, J.-M. & Takamura, N. (2007). Changes in microcystin production in cyanobacteria exposed to zooplankton at different population densities and infochemical concentrations. *Limnology and Oceanography*, 52 (4): 1454-1466.
- Kaebnick, M., Neilan, B. A., Börner, T. & Dittmann, E. (2000). Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (8): 3387-3392.
- Kaebnick, M. & Neilan, B. A. (2001). Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS microbiology ecology*, 35 (1): 1-9.
- Kameyama, K., Sugiura, N., Isoda, H., Inamori, Y. & Maekawa, T. (2002). Effect of nitrate and phosphate concentration on production of microcystins by *Microcystis viridis* NIES 102. *Aquatic ecosystem health & management*, 5 (4): 443-449.
- Kuiper-Goodman, T., Falconer, I. & Fitzgerald, J. (1999). Human health aspects. I: Chorus, I. & Bartram, J. (red.) *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring, and management*, kap. 4. s. 113-153. London and New York: WHO, E & FN Spon.
- Kuniyoshi, T. M., Sevilla, E., Bes, M. T., Fillat, M. F. & Peleato, M. L. (2013). Phosphate deficiency (N/P 40: 1) induces *mcyD* transcription and microcystin synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Plant Physiology and Biochemistry*, 65: 120-124.
- Long, B. M., Jones, G. J. & Orr, P. T. (2001). Cellular microcystin content in N-limited *Microcystis aeruginosa* can be predicted from growth rate. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (1): 278-283.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193 (1): 265-275.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., Clark, D. P. & Brock, T. D. (2012). *Brock biology of microorganisms*. 13th ed. utg. Boston, Mass: Pearson.
- Meissner, S., Fastner, J. & Dittmann, E. (2013). Microcystin production revisited: conjugate formation makes a major contribution. *Environmental microbiology*, 15 (6): 1810-1820.
- Metcalf, J. S. & Codd, G. A. (2012). Cyanotoxins. I: Whitton, B. A. (red.) *Ecology of Cyanobacteria II: their diversity in space and time*, kap. 24. s. 651-675. Dordrecht: Springer.
- Mur, L. R., Skulberg, O. M. & Utkilen, H. (1999). Cyanobacteria in the environment. I: Chorus, I. & Bartram, J. (red.) *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring, and management*, kap. 2. s. 15-40. London and New York: WHO, E & FN Spon.
- Norges Standardiseringsforbund. (1984). *Vannundersøkelse. Bestemmelse av fosfat*. 3 utg. NS 4724. Oslo: Norges Standardiseringsforbund.

- Oh, H.-M., Lee, S. J., Jang, M.-H. & Yoon, B.-D. (2000). Microcystin production by *Microcystis aeruginosa* in a phosphorus-limited chemostat. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (1): 176-179.
- Rao, P. & Bhattacharya, R. (1996). The cyanobacterial toxin microcystin-LR induced DNA damage in mouse liver in vivo. *Toxicology*, 114 (1): 29-36.
- Schlegel, H. G. (1986). *General microbiology*. 6 utg. Cambridge: Cambridge university press.
- Šejnohová, L. & Maršálek, B. (2012). Microcystis. I: Whitton, B. A. (red.) *Ecology of Cyanobacteria II: their diversity in space and time*, kap. 7. s. 195-228. Dordrecht: Springer.
- Sevilla, E., Martin-Luna, B., Bes, M. T., Fillat, M. F. & Peleato, M. L. (2012). An active photosynthetic electron transfer chain required for mcyD transcription and microcystin synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Ecotoxicology*, 21 (3): 811-819.
- Sivonen, K. (1990). Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 56 (9): 2658-2666.
- Sivonen, K. & Jones, G. (1999). Cyanobacterial toxins. I: Chorus, I. & Bartram, J. (red.) *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring, and management*, kap. 3. s. 41-112. London and New York: WHO, E & FN Spon.
- Sommaruga, R., Chen, Y. & Liu, Z. (2009). Multiple strategies of bloom-forming *Microcystis* to minimize damage by solar ultraviolet radiation in surface waters. *Microbial ecology*, 57 (4): 667-674.
- Song, L., Sano, T., Li, R., Watanabe, M. M., Liu, Y. & Kaya, K. (1998). Microcystin production of *Microcystis viridis* (cyanobacteria) under different culture conditions. *Phycological research*, 46 (s2): 19-23.
- Utkilen, H. & Gjølme, N. (1992). Toxin production by *Microcystis aeruginosa* as a function of light in continuous cultures and its ecological significance. *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (4): 1321-1325.
- Utkilen, H. & Gjølme, N. (2014). Kan cyanobakterietoksiner i drikkevann føre til sykdommer som Alzheimer og ALS? *VANN*, 49 (3): 319- 326.
- Van Liere, L. & Mur, L. R. (1978). Light limited cultures of the blue-green algae *Oscillatoria agardhii*. *Mitteilung Internationale Vereinigung fuer Theoretische unde Amgewandte Limnologie*, 21: 158-167.
- Wang, Y. & Chen, F. (2008). Decomposition and phosphorus release from four different size fractions of *Microcystis* spp. taken from Lake Taihu, China. *Journal of Environmental Sciences*, 20 (7): 891-896.
- Wang, Z., Li, D., Li, G. & Liu, Y. (2010). Mechanism of photosynthetic response in *Microcystis aeruginosa* PCC7806 to low inorganic phosphorus. *Harmful algae*, 9 (6): 613-619.
- Watanabe, M., Harada, K.-I., Matsuura, K., Watanabe, M. & Suzuki, M. (1989). Heptapeptide toxin production during the batch culture of two *Microcystis* species (Cyanobacteria). *Journal of Applied Phycology*, 1 (2): 161-165.

- Watanabe, M. F. & Oishi, S. (1985). Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 49 (5): 1342-1344.
- Welker, M. & Von Döhren, H. (2006). Cyanobacterial peptides – Nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 30 (4): 530-563.
- WHO. (1998). *Guidelines for Drinking-water Quality: Health Criteria and Other Supporting Information*. 2 utg., b. 2. Geneva: Addendum World Health Organization Tilgjengelig fra: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/2edaddvol2a.pdf (lest 13.04.2015).
- WHO. (2010). Ingested nitrate and nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, 94. Tilgjengelig fra: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol94/mono94.pdf> (lest 10.04.2015).
- Wiedner, C., Visser, P. M., Fastner, J., Metcalf, J. S., Codd, G. A. & Mur, L. R. (2003). Effects of light on the microcystin content of *Microcystis* strain PCC 7806. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (3): 1475-1481.
- Xing, W., Huang, W.-m., Li, D.-h. & Liu, Y.-d. (2007). Effects of iron on growth, pigment content, photosystem II efficiency, and siderophores production of *Microcystis aeruginosa* and *Microcystis wesenbergii*. *Current microbiology*, 55 (2): 94-98.
- Økland, J. & Økland, K. A. (2006). *Vann og vassdrag 3. Kjemi, fysikk og miljø*. 2 utg. Stabekk: Vett & viten.

Vedlegg

Vedlegg 1. O₂ medium (Van Liere and Mur 1978) med ulike fosfat konsentrasjoner (K₂HPO₄), (H, M, L og U) som er brukt i eksperimentene med *M. aeruginosa*.

Vedlegg 2. Løst fosfatinnhold (PO₄-P µg/l) og vekst (OD_{740nm} med logaritmisk skala) av *M. aeruginosa* i de ulike behandlingene. a), b) og c): forsøk 1 under lav lysintensitet (9 µE m⁻²s⁻¹). d), e), f) og g): forsøk 2 under høy lysintensitet (101 µE m⁻²s⁻¹). h), i), j) og k): forsøk 3 fosfatutsultet forkultur under høy lysintensitet (101 µE m⁻²s⁻¹). Vekst i medium tilsatt: ● = H fosfat, ■ = M fosfat, ▲ = L fosfat og ○ = U fosfat. — = fosfatinnhold (µg/l).

Vedlegg 3. Vekst (OD_{740nm} med logaritmisk skala) og totalt MC-innhold (i µg/l) hos *M. aeruginosa* i de ulike behandlingene. a), b) og c): forsøk 1 under lav lysintensitet (9 µE m⁻²s⁻¹). d), e), f) og g): forsøk 2 under høy lysintensitet (101 µE m⁻²s⁻¹). h), i), j) og k): forsøk 3 fosfatutsultet forkultur under høy lysintensitet (101 µE m⁻²s⁻¹). Vekst i medium tilsatt: ● = H fosfat, ■ = M fosfat, ▲ = L fosfat og ○ = U fosfat. x = totalt MC-innhold (MC i µg/l).

Vedlegg 4. Vekst (OD_{740nm} med logaritmisk skala) og MC-innhold (µg MC/mg protein) hos *M. aeruginosa* i de ulike behandlingene. a), b) og c): forsøk 1 under lav lysintensitet (9 µE m⁻²s⁻¹). d), e), f) og g): forsøk 2 under høy lysintensitet (101 µE m⁻²s⁻¹). h), i), j) og k): forsøk 3 fosfatutsultet forkultur under høy lysintensitet (101 µE m⁻²s⁻¹). Vekst i medium tilsatt: ● = H fosfat, ■ = M fosfat, ▲ = L fosfat og ○ = U fosfat. x = MC-innhold (µg MC/mg protein)

Vedlegg 5. pH- utvikling over tid i de ulike behandlingene hos *M. aeruginosa*. a) under lav lysintensitet (9 µE m⁻²s⁻¹), b) under høy lysintensitet (101 µE m⁻²s⁻¹) og c) fosfatutsultet forkultur under høy lysintensitet (101 µE m⁻²s⁻¹). Medium tilsatt: ● = H fosfat, ■ = M fosfat, ▲ = L fosfat og ○ = U fosfat.

Vedlegg 6. Utvikling av protein (µg/ml) over tid hos *M. aeruginosa* i de ulike behandlingene. a) under lav lysintensitet (9 µE m⁻²s⁻¹), b) under høy lysintensitet (101 µE m⁻²s⁻¹). c) fosfatutsultet forkultur under høy lysintensitet (101 µE m⁻²s⁻¹). Medium tilsatt: ● = H fosfat, ■ = M fosfat, ▲ = L fosfat og ○ = U fosfat.

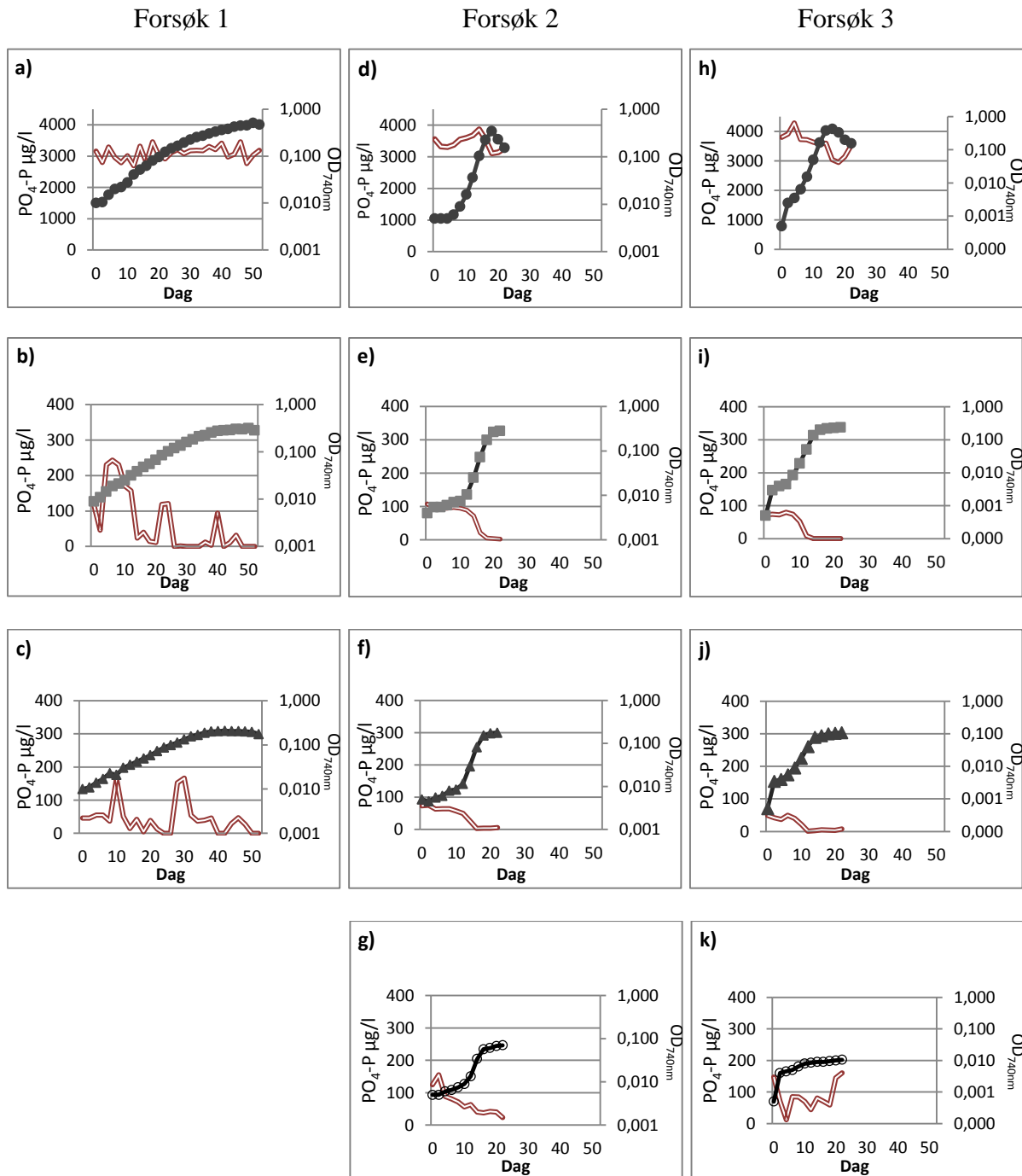
Vedlegg 7. Rådata fra forsøk 1, forsøk 2 og forsøk 3. H-AB, M-AB, L-AB og U-AB er parallellene med lik behandling innenfor forsøkene.

Vedlegg 1. O2 medium (Van Liere and Mur 1978) med ulike fosfat konsentrasjoner (K_2HPO_4), (H, M, L og U) som er brukt i eksperimentene med *M. aeruginosa*.

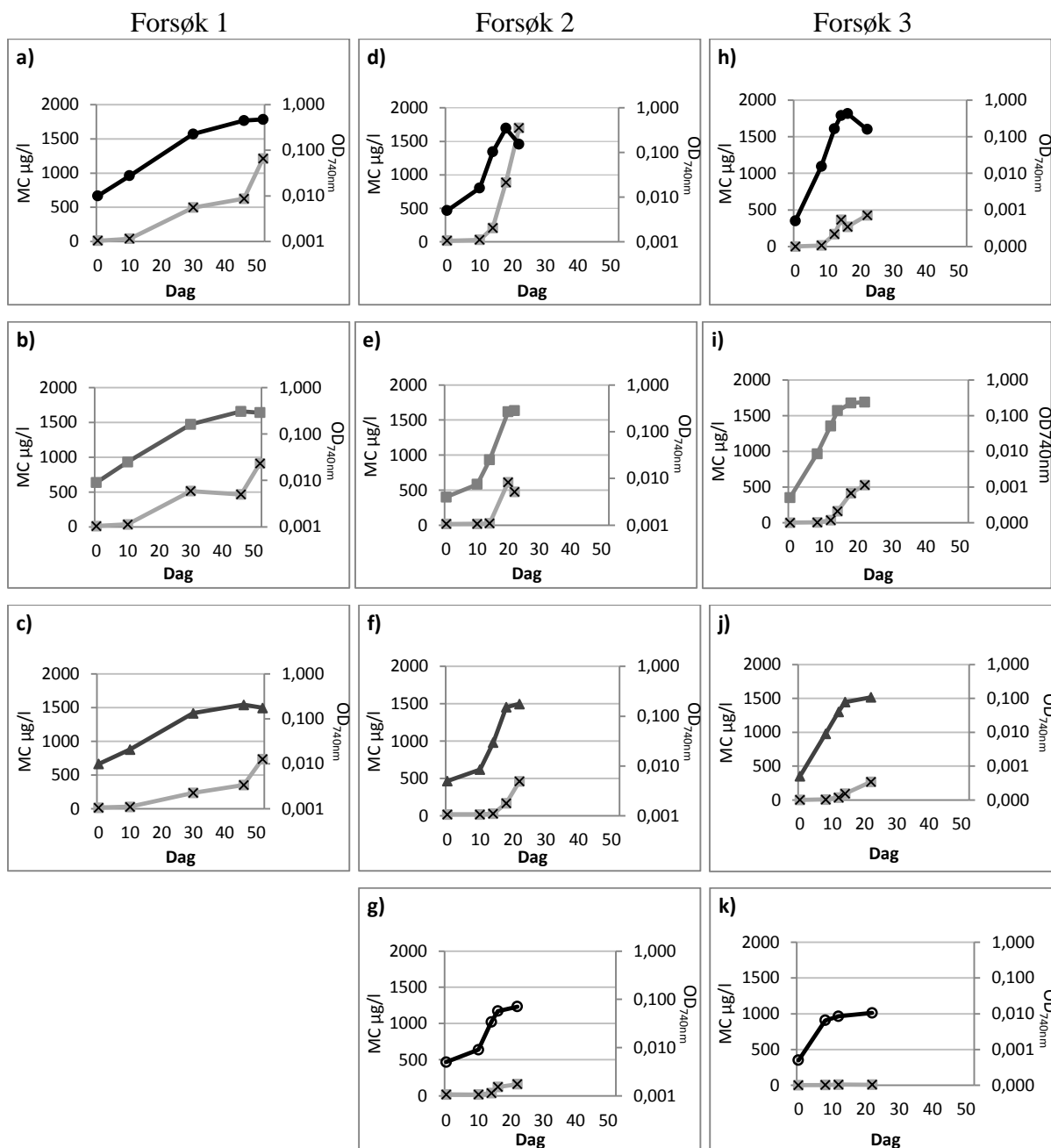
O2 medium	(normalt O2)			
Makroelementer	Medium H	Medium M	Medium L	Medium U
NaNO ₃	500 mg/l	500 mg/l	500 mg/l	500 mg/l
K ₂ HPO ₄	25 mg/l	0,50 mg/l	0,25 mg/l	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	50 mg/l	50 mg/l	50 mg/l	50 mg/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	13 mg/l	13 mg/l	13 mg/l	13 mg/l
*KCl	-	-	-	21,5 mg/l
Fe- løsnings	10 ml/l tilsatt medium etter autoklaving			
NaHCO ₃ - løsnings	5 ml/l tilsatt medium etter autoklaving			
Mikroelementløsnings	1 ml/l tilsatt medium før autoklaving			

*KCl er kun tilsatt i medium uten tilsatt fosfat, inngår ikke i normalt O2 medium.

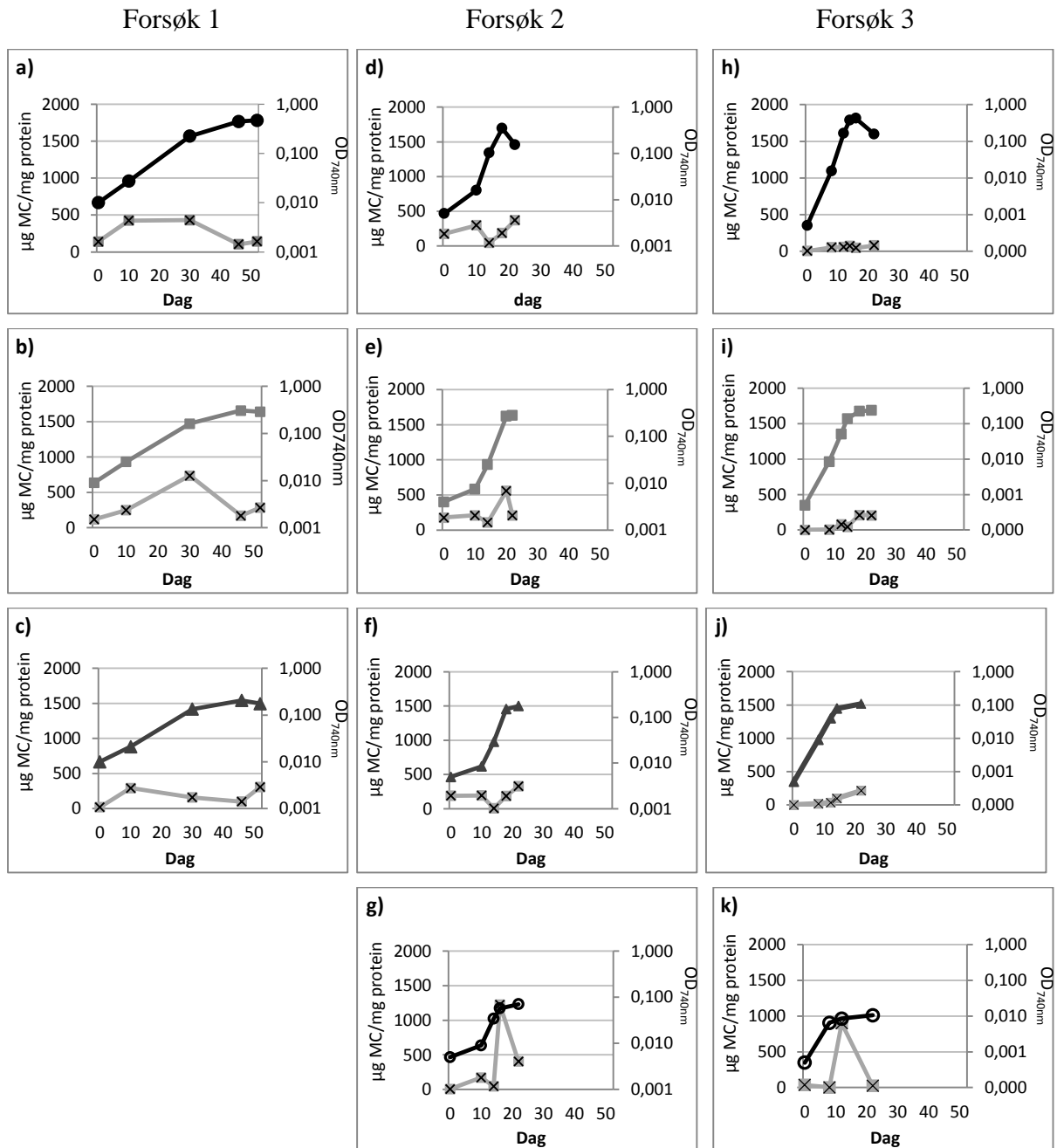
Vedlegg 2. Løst fosfatinnhold ($\text{PO}_4\text{-P}$ $\mu\text{g/l}$) og vekst ($\text{OD}_{740\text{nm}}$ med logaritmisk skala) av *M. aeruginosa* i de ulike behandlingene. a), b) og c): forsøk 1 under lav lysintensitet ($9 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$). d), e), f) og g): forsøk 2 under høy lysintensitet ($101 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$). h), i), j) og k): forsøk 3 fosfatutsultet forkultur under høy lysintensitet ($101 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Vekst i medium tilsatt: ● = H fosfat, ■ = M fosfat, ▲ = L fosfat og ○ = U fosfat. — = fosfatinnhold ($\mu\text{g/l}$).



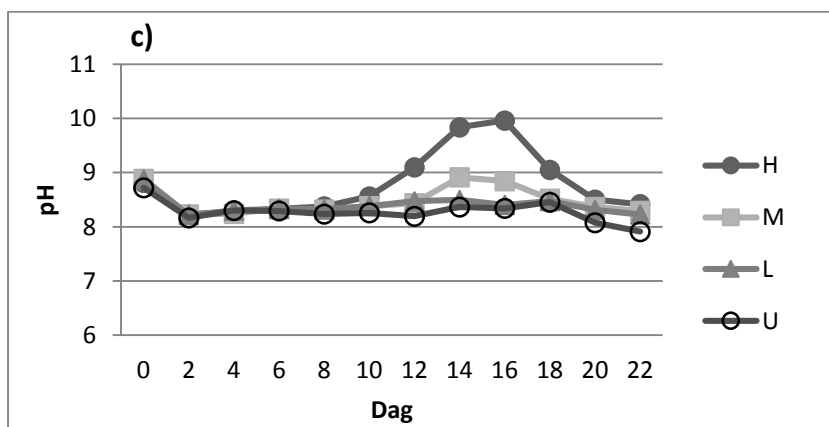
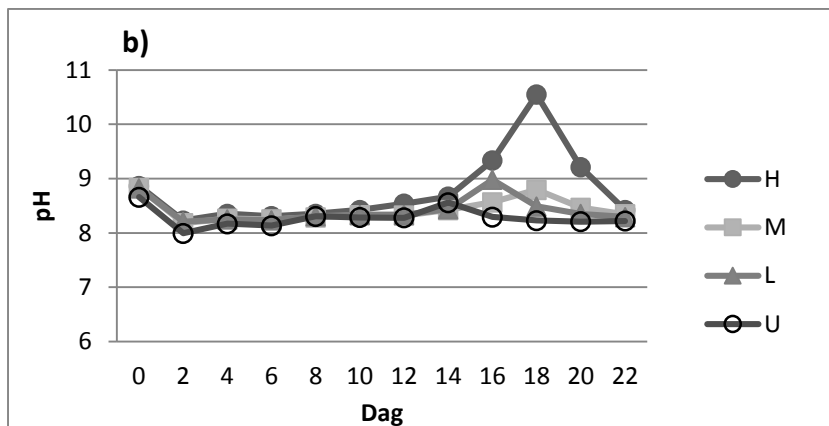
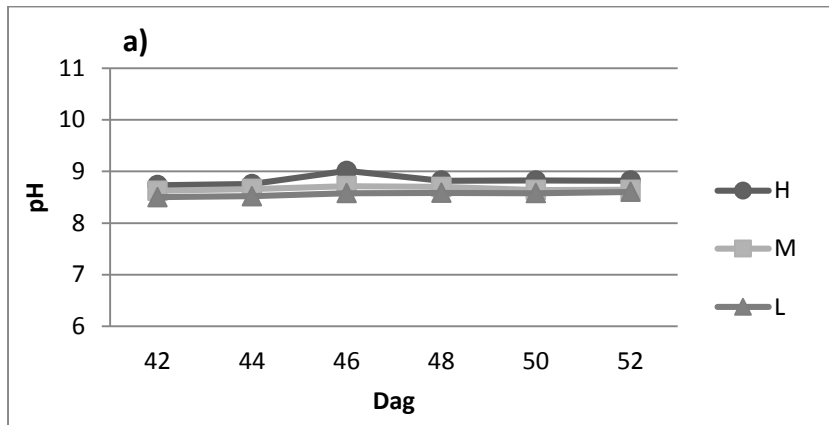
Vedlegg 3. Vekst (OD_{740nm} med logaritmisk skala) og totalt MC-innhold (i $\mu\text{g/l}$) hos *M. aeruginosa* i de ulike behandlingene. a), b) og c): forsøk 1 under lav lysintensitet ($9 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$). d), e), f) og g): forsøk 2 under høy lysintensitet ($101 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$). h), i), j) og k): forsøk 3 fosfatutsultet forkultur under høy lysintensitet ($101 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Vekst i medium tilsatt: ● = H fosfat, ■ = M fosfat, ▲ = L fosfat og ○ = U fosfat. x = totalt MC-innhold (MC i $\mu\text{g/l}$).



Vedlegg 4. Vekst (OD_{740nm} med logaritmisk skala) og MC-innhold ($\mu\text{g MC/mg protein}$) hos *M. aeruginosa* i de ulike behandlingene. a), b) og c): forsøk 1 under lav lysintensitet ($9 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$). d), e), f) og g): forsøk 2 under høy lysintensitet ($101 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$). h), i), j) og k): forsøk 3 fosfatutsultet forkultur under høy lysintensitet ($101 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Vekst i medium tilsatt: ● = H fosfat, ■ = M fosfat, ▲ = L fosfat og ○ = U fosfat. x = MC-innhold ($\mu\text{g MC/mg protein}$)



Vedlegg 5. pH- utvikling over tid i de ulike behandlingene hos *M. aeruginosa*. a) under lav lysintensitet ($9 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$), b) under høy lysintensitet ($101 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) og c) fosfatutsultet forkultur under høy lysintensitet ($101 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Medium tilsatt: ● = H fosfat, ■ = M fosfat, ▲ = L fosfat og ○ = U fosfat.

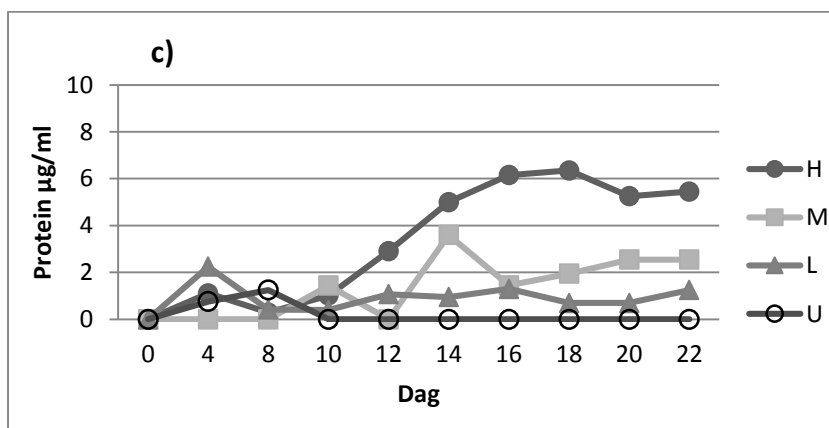
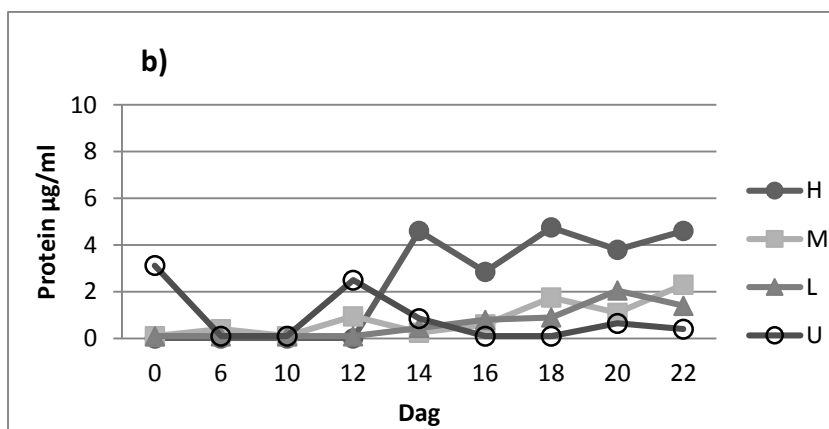
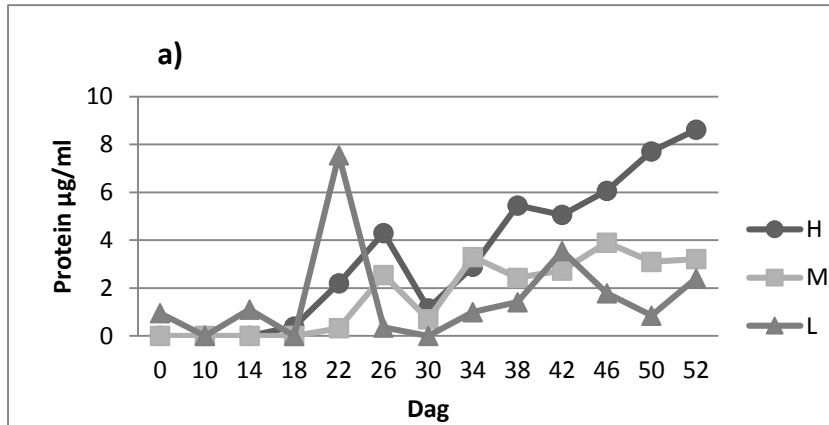


Vedlegg 6. Utvikling av protein ($\mu\text{g/ml}$) over tid hos *M. aeruginosa* i de ulike behandlingene.

a) under lav lysintensitet ($9 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$), b) under høy lysintensitet ($101 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

c) fosfatutsultet forkultur under høy lysintensitet ($101 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Medium tilsatt: ● = H fosfat,

■ = M fosfat, ▲ = L fosfat og ○ = U fosfat.



Vedlegg 7. Rådata fra forsøk 1

Forsøk 1	dato	dag	OD (740 nm)	*Gj.snitt av paralleller	pH	Protein (µg/ml)	*Gj.snitt av paralleller	Microcystin (µg/l)	*Gj.snitt av paralleller	PO ₄ -P (µg/l)	*Gj.snitt av paralleller
H-A	07.05.14	0	0,007	0,0100		<0,1	<0,1	9	14	3102	3158
H-B			0,013			<0,1		19		3214	
M-A			0,008	0,0090		<0,1	<0,1	9	12	163	114
M-B			0,010			<0,1		14		66	
L-A			0,012	0,0100		1,8	0,95	22	18	47	46,5
L-B			0,008			0,1		13		46	
H-A	09.05.14	2	0,010	0,0105						2793	2801
H-B			0,011							2808	
M-A			0,011	0,0110						26	46
M-B			0,011							65	
L-A			0,011	0,0110						46	46
L-B			0,011							46	
H-A	11.05.14	4	0,015	0,0150						4001	3295
H-B			0,015							2589	
M-A			0,014	0,0145						398	230
M-B			0,015							63	
L-A			0,014	0,0140						44	40
L-B			0,014							35	
H-A	13.05.14	6	0,019	0,0200						3103	2960
H-B			0,021							2817	
M-A			0,019	0,0190						252	243
M-B			0,019							234	
L-A			0,016	0,0170						71	55
L-B			0,018							39	
H-A	15.05.14	8	0,021	0,0220						2670	2797
H-B			0,023							2924	
M-A			0,022	0,0215						405	231
M-B			0,021							56	
L-A			0,021	0,0230						37	37
L-B			0,025							37	
H-A	17.05.14	10	0,026	0,0275		<0,1	<0,1	44	42,5	3084	3012
H-B			0,029			<0,1		41		2939	
M-A			0,025	0,0250		0,2	<0,15	35	37,5	273	170
M-B			0,025			<0,1		40		67	
L-A			0,021	0,0210		<0,1	<0,1	29	29,5	244	165,5
L-B			0,021			<0,1		30		87	
H-A	19.05.14	12	0,038	0,0405						3046	2699
H-B			0,043							2352	
M-A			0,031	0,0320						270	157,5
M-B			0,033							45	
L-A			0,030	0,0305						39	50,5
L-B			0,031							62	
H-A	21.05.14	14	0,048	0,0515		<0,1	<0,55			3380	3316,5
H-B			0,055			1				3253	
M-A			0,038	0,0390		3	<1,55			23	24
M-B			0,040			<0,1				25	
L-A			0,036	0,0355		0,21	1,10			21	14,5
L-B			0,035			2				8	
H-A	23.05.14	16	0,060	0,0625						2808	2799,5
H-B			0,065							2791	
M-A			0,047	0,0480						38	40
M-B			0,049							42	
L-A			0,043	0,0420						31	42
L-B			0,041							53	

Rådata fra forsøk 1 fortsetter

Forsøk 1	dato	dag	OD (740 nm)	*Gj.snitt av paralleller	pH	Protein (µg/ml)	*Gj.snitt av paralleller	Microcystin (µg/l)	*Gj.snitt av paralleller	PO ₄ -P (µg/l)	*Gj.snitt av paralleller
H-A	25.05.14	18	0,076	0,0800		0,1	0,4			3492	3454,5
H-B			0,084			0,7				3417	
M-A			0,054	0,0560		<0,1	<0,1			19	15
M-B			0,058			<0,1				11	
L-A			0,049	0,0495		<0,1	<0,39			5	5
L-B			0,050			0,69				5	
H-A	27.05.14	20	0,090	0,0960						3207	3016
H-B			0,102							2825	
M-A			0,064	0,0680						13	11,5
M-B			0,072							10	
L-A			0,057	0,0585						11	39
L-B			0,060							67	
H-A	29.05.14	22	0,116	0,1240		0,1	2,2			2948	2915
H-B			0,131			4,3				2882	
M-A			0,080	0,0850		0,5	0,32			237	118,5
M-B			0,090			0,15				0	
L-A			0,070	0,0725		13,4	7,55			0	13
L-B			0,075			1,7				26	
H-A	31.05.14	24	0,139	0,1480						3024	3120
H-B			0,157							3216	
M-A			0,099	0,1030						239	120,5
M-B			0,107							2	
L-A			0,085	0,0870						1	0,5
L-B			0,089							0	
H-A	02.06.14	26	0,159	0,1660		3,5	4,3			3230	3215
H-B			0,172			5,1				3200	
M-A			0,116	0,1210		1,2	2,55			0	0
M-B			0,125			3,9				0	
L-A			0,096	0,1000		0,02	0,36			0	0
L-B			0,104			0,7				0	
H-A	04.06.14	28	0,185	0,1950						2797	3080
H-B			0,204							3363	
M-A			0,132	0,1370						0	0,5
M-B			0,142							1	
L-A			0,108	0,1140						294	152,5
L-B			0,119							11	
H-A	06.06.14	30	0,209	0,2260		0,5	1,15	489	496	3196	3174,5
H-B			0,242			1,8		503			
M-A			0,154	0,1610		0,7	0,7	394	515,5	0	0
M-B			0,168			0,7		637			
L-A			0,127	0,1340		1	<0,55	245	236,5	286	166,5
L-B			0,140			<0,1		228			
H-A	08.06.14	32	0,239	0,2560						3153	3190,5
H-B			0,273							3228	
M-A			0,178	0,1850						0	0
M-B			0,192							0	
L-A			0,144	0,1570						13	54,5
L-B			0,169							96	
H-A	10.06.14	34	0,248	0,2730		2	2,9			3168	3177,5
H-B			0,297			3,8				3187	
M-A			0,197	0,2140		1,2	3,3			0	0
M-B			0,230			5,4				0	
L-A			0,167	0,1690		0,2	1			0	37
L-B			0,171			1,8				74	

Rådata fra forsøk 1 fortsetter

Forsøk 1	dato	dag	OD (740 nm)	*Gj.snitt av paralleller	pH	Protein (µg/ml)	*Gj.snitt av paralleller	Microcystin (µg/l)	*Gj.snitt av paralleller	PO ₄ -P (µg/l)	*Gj.snitt av paralleller
H-A	12.06.14	36	0,291	0,3030						3280	3310
H-B			0,315							3340	
M-A			0,211	0,2270						9	12,5
M-B			0,242							16	
L-A			0,184	0,1890						26	39,5
L-B			0,193							53	
H-A	14.06.14	38	0,313	0,3360		5,29	5,45			3380	3214
H-B			0,359			5,62				3048	
M-A			0,244	0,2580		3,02	2,43			1	3,5
M-B			0,271			1,84				6	
L-A			0,193	0,2010		1,9	1,41			0	46
L-B			0,209			0,93				92	
H-A	16.06.14	40	0,340	0,3630						3651	3414
H-B			0,386							3177	
M-A			0,265	0,2780						177	94
M-B			0,291							11	
L-A			0,198	0,2050						0	0
L-B			0,212							0	
H-A	18.06.14	42	0,355	0,3840	8,7	4,87	5,05			3062	2979
H-B			0,412			8,7		5,24			
M-A			0,261	0,2860	8,6	2,8	2,74	395	465,5	0	0
M-B			0,311			8,6		2,68		536	
L-A			0,207	0,2090	8,5	3,9	3,55	356	353	0	0
L-B			0,210			8,4		3,2		350	
H-A	20.06.14	44	0,393	0,4250	8,7					3123	3060
H-B			0,457			8,7				2997	
M-A			0,279	0,2920	8,6					19	11
M-B			0,304			8,6				3	
L-A			0,204	0,2050	8,5					15	29,5
L-B			0,206			8,5				44	
H-A	22.06.14	46	0,417	0,4470	8,9	5,79	6,07	512	626	3231	3455
H-B			0,477			9		6,35		740	
M-A			0,286	0,3060	8,6	3,9	3,9			38,27	31
M-B			0,326			8,7		3,9			
L-A			0,202	0,2060	8,6	0,96	1,78			14	47
L-B			0,209			8,5		2,61			
H-A	24.06.14	48	0,421	0,4530	8,7					2598	2763,5
H-B			0,485			8,9				2929	
M-A			0,287	0,3040	8,6					0	0
M-B			0,320			8,7				0	
L-A			0,200	0,2020	8,5					0	27
L-B			0,204			8,6				54	
H-A	26.06.14	50	0,488	0,5100	8,7	6,88	7,71			3056	3030,5
H-B			0,532			8,8		8,55			
M-A			0,301	0,3180	8,5	3,42	3,1			0	0
M-B			0,335			8,7		2,78			
L-A			0,206	0,1980	8,5	0,94	0,85			0	0
L-B			0,190			8,5		0,77			
H-A	28.06.14	52	0,462	0,4710	8,7	8,25	8,61	975	1212,5	3298	3190,5
H-B			0,479			8,9		8,98		1450	
M-A			0,268	0,2870	8,6	2,96	3,21	770	912,5	0	0
M-B			0,305			8,6		3,46		1055	
L-A			0,173	0,1760	8,5	2,26	2,4	698	740	0	0
L-B			0,178			8,6		2,54		782	

*Gjennomsnittsverdi av parallellene med lik behandling, som er brukt i denne studien.

Rådata fra forsøk 2

Forsøk 2	dato	dag	OD (740 nm)	*Gj.snitt av paralleller	pH	Protein (µg/ml)	*Gj.snitt av paralleller	Microcystin (µg/l)	*Gj.snitt av paralleller	PO ₄ -P (µg/l)	*Gj.snitt av paralleller
H-A	02.07.14	0	0,006	0,0050	8,8	<0,1	<0,1	18	18	3939	3554
H-B			0,004		8,8	<0,1		18		3169	
M-A			0,004	0,0040	8,8	<0,1	<0,1	18	18	104	108
M-B			0,004		8,8	<0,1		18		112	
L-A			0,005	0,0050	8,8	<0,1	<0,1	20	19	65	73
L-B			0,005		8,8	<0,1		18		81	
U- A			0,005	0,0050	8,7	<0,1	<3,12	22	20,5	79	124,5
U- B			0,005		8,5	6,14		19		170	
H-A	04.07.14	2	0,006	0,0050	8,2					3370	3322
H-B			0,004		8,2				3274		
M-A			0,006	0,0055	8,1					95	96
M-B			0,005		8,1				97		
L-A			0,005	0,0045	8,2					69	74,5
L-B			0,004		8,2				80		
U- A			0,006	0,0050	8,1					60	156
U- B			0,004		7,8				252		
H-A	06.07.14	4	0,006	0,0050	8,3					3433	3307,5
H-B			0,004		8,3				3182		
M-A			0,006	0,0055	8,2					94	95
M-B			0,005		8,2				96		
L-A			0,005	0,0055	8,2					63	63,5
L-B			0,006		8,2				64		
U- A			0,006	0,0060	8,2					34	88,5
U- B			0,006		8,1				143		
H-A	08.07.14	6	0,007	0,0060	8,3	<0,1	<0,1			3403	3372,5
H-B			0,005		8,3	<0,1				3342	
M-A			0,006	0,0060	8,2	<0,1	<0,4			95	94,5
M-B			0,006		8,2	0,7				94	
L-A			0,006	0,0060	8,2	<0,1	<0,1			61	64
L-B			0,006		8,2	<0,1				67	
U- A			0,007	0,0065	8,2	<0,1	<0,1			34	81
U- B			0,006		8	<0,1				128	
H-A	10.07.14	8	0,010	0,0090	8,3					3691	3542
H-B			0,008		8,3				3393		
M-A			0,006	0,0070	8,3					96	97
M-B			0,008		8,2				98		
L-A			0,008	0,0080	8,3					64	64,5
L-B			0,008		8,3				65		
U- A			0,008	0,0075	8,3					33	71,5
U- B			0,007		8,2				110		
H-A	12.07.14	10	0,018	0,0160	8,4	<0,1	<0,1	39	29,5	3748	3594
H-B			0,014		8,4	<0,1		20		3440	
M-A			0,007	0,0075	8,3	<0,1	<0,1	28	21,5	94	94,5
M-B			0,008		8,2	<0,1		15		95	
L-A			0,008	0,0085	8,3	<0,1	<0,1	25	19,5	59	57
L-B			0,009		8,3	<0,1		14		55	
U- A			0,009	0,0090	8,2	<0,1	<0,1	15	17,5	21	56,5
U- B			0,009		8,2	<0,1		20		92	
H-A	14.07.14	12	0,043	0,0365	8,5	<0,1	<0,1			3815	3679
H-B			0,030		8,4	<0,1				3543	
M-A			0,010	0,0105	8,2	<0,1	<0,95			91	88,5
M-B			0,011		8,3	1,8				86	
L-A			0,012	0,0115	8,3	<0,1	<0,1			51	49,5
L-B			0,011		8,3	<0,1				48	
U- A			0,014	0,0135	8,3	4,9	<2,5			17	63,5
U- B			0,013		8,2	<0,1				110	

Rådata fra forsøk 2 fortsetter

Forsøk 2	dato	dag	OD (740 nm)	*Gj.snitt av paralleller	pH	Protein (µg/ml)	*Gj.snitt av paralleller	Microcystin (µg/l)	*Gj.snitt av paralleller	PO ₄ -P (µg/l)	*Gj.snitt av paralleller
H-A	16.07.14	14	0,124	0,1030	8,7	5,4	4,6	240	208	4177	3860,5
H-B			0,082		8,5	3,8		176		3544	
M-A			0,020	0,0250	8,3	0,1	0,25	19	27,5	81	72
M-B			0,030		8,5	0,4		36		63	
L-A			0,029	0,0295	8,5	0,8	<0,45	29	28,5	23	27
L-B			0,030		8,3	<0,1		28		31	
U- A			0,039	0,0340	8,5	<0,1	0,85	39	40	9	40
U- B			0,029		8,5	1,6		41		71	
H-A	18.07.14	16	0,253	0,2260	9,8	4,3	2,85			3433	3552,5
H-B			0,199		8,8	1,4				3672	
M-A			0,051	0,0730	8,5	<0,1	<0,6			36	20,5
M-B			0,095		8,6	1,1				5	
L-A			0,087	0,0820	9,5	<0,1	<0,8			2	3
L-B			0,077		8,4	1,5				4	
U- A			0,062	0,0570	8,3	<0,1	<0,1	139	122,5	3	38
U- B			0,052		8,2	<0,1		106		73	
H-A	20.07.14	18	0,330	0,3470	10,6	5,5	4,75	917	886,5	3054	3101,5
H-B			0,363		10,5	4		856		3149	
M-A			0,130	0,1780	8,9	1,8	1,75			4	5,5
M-B			0,226		8,6	1,7				7	
L-A			0,167	0,1520	8,4	<0,1	<0,9	198	167,5	5	4
L-B			0,137		8,5	1,7		137		3	
U- A			0,061	0,0610	8,2	<0,1	<0,1			10	42
U- B			0,061		8,2	<0,1				74	
H-A	22.07.14	20	0,179	0,2320	8,3	1,2	3,8			3250	3136,5
H-B			0,284		10,7	6,4				3023	
M-A			0,272	0,2690	8,4	0,9	1,1	455	613,5	4	4
M-B			0,266		8,4	1,3		772		4	
L-A			0,182	0,1730	8,2	0,7	2,05			4	4
L-B			0,163		8,4	3,4				4	
U- A			0,072	0,0680	8,2	<0,1	<0,65			17	40,5
U- B			0,064		8,1	1,2				64	
H-A	24.07.14	22	0,137	0,1540	8,4	6,7	4,6	1375	1697,5	3344	3257,5
H-B			0,171		8,4	2,5		2020		3171	
M-A			0,291	0,2820	8,3	1,9	2,3	338	477,5	3	2,5
M-B			0,272		8,3	2,7		617		2	
L-A			0,183	0,1770	8,3	2,2	1,4	328	462	3	5,5
L-B			0,171		8,2	0,6		596		8	
U- A			0,074	0,0705	8,2	0,4	0,4	171	161	6	23,5
U- B			0,067		8,2	0,4		151		41	

*Gjennomsnittsverdi av parallellene med lik behandling, som er brukt i denne studien.

Rådata fra forsøk 3

Forsøk 3	dato	dag	OD (740 nm)	*Gj.snitt av paralleller	pH	Protein (µg/ml)	*Gj.snitt av paralleller	Microcystin (µg/l)	*Gj.snitt av paralleller	PO ₄ -P (µg/l)	*Gj.snitt av paralleller
H-A	24.07.14	0	0,000	0,0005	8,8	1,62	<0,81	1,36	1,115	3962	3800,5
H-B			0,001		8,8	<0,01		0,87		3639	
M-A			0,000	0,0005	8,8	0,9	<0,45	0,86	0,795	80	72,75
M-B			0,001		8,8	<0,01		0,73		65,5	
L-A			0,000	0,0005	8,8	1,77	<0,89	0,86	0,84	40,4	49,4
L-B			0,001		8,8	<0,01		0,82		58,4	
U- A			0,000	0,0005	8,7	<0,01	<0,03	1,49	1,21	45,9	147,95
U- B			0,001		8,6	0,059		0,93		250	

Rådata fra forsøk 3 fortsetter

Forsøk 3	dato	dag	OD (740 nm)	*Gj.snitt av paralleller	pH	Protein (µg/ml)	*Gj.snitt av paralleller	Microcystin (µg/l)	*Gj.snitt av paralleller	PO ₄ -P (µg/l)	*Gj.snitt av paralleller
H-A	26.07.14	2	0,003	0,0025	8,2					4234	3915
H-B			0,002		8,2					3596	
M-A			0,003	0,0030	8,2					84	74,5
M-B			0,003		8,2					65	
L-A			0,004	0,0035	8,2					35	42
L-B			0,003		8,2					49	
U- A			0,004	0,0040	8,1					46	70,5
U- B			0,004		8,1					95	
H-A	28.07.14	4	0,004	0,0035	8,2	0,04	1,105			4958	4285
H-B			0,003		8,2	2,17				3612	
M-A			0,004	0,0040	8,2	<0,01	<0,01			81	72,5
M-B			0,004		8,2	<0,01				64	
L-A			0,004	0,0040	8,3	0,01	1,13			31	37
L-B			0,004		8,3	2,25				43	
U- A			0,005	0,0045	8,2	0,03	0,76			15	12,5
U- B			0,004		8,3	1,49				10	
H-A	30.07.14	6	0,007	0,0065	8,3					3852	3724,5
H-B			0,006		8,3					3597	
M-A			0,004	0,0045	8,3					92	80
M-B			0,005		8,3					68	
L-A			0,006	0,0055	8,3					44	49,5
L-B			0,005		8,3					55	
U- A			0,005	0,0050	8,2					50	85,5
U- B			0,005		8,3					121	
H-A	01.08.14	8	0,016	0,0155	8,3	0,5	0,285	13	15	3907	3718,5
H-B			0,015		8,3	0,07		17		3530	
M-A			0,007	0,0085	8,3	<0,01	<0,89	3	6	87	74
M-B			0,010		8,3	1,78		7		61	
L-A			0,010	0,0090	8,3	0,43	0,42	11	7,5	30	40,5
L-B			0,008		8,3	0,41		4		51	
U- A			0,008	0,0065	8,2	0,02	1,25	4	3,5	29	84,5
U- B			0,005		8,2	2,48		3		140	
H-A	03.08.14	10	0,053	0,0500	8,5	1,01	1,015			3797	3633
H-B			0,047		8,5	1,02				3469	
M-A			0,016	0,0195	8,3	1,08	1,44			68	52,5
M-B			0,023		8,3	1,8				37	
L-A			0,020	0,0175	8,3	0,54	0,4			19	22,5
L-B			0,015		8,3	0,26				26	
U- A			0,010	0,0080	8,2	<0,01	<0,01			26	70
U- B			0,006		8,2	<0,01				114	
H-A	05.08.14	12	0,164	0,1650	9,2	3,39	2,91	95	168,5	3616	3582
H-B			0,165		8,9	2,43		242		3548	
M-A			0,047	0,0515	8,4	<0,01	<0,43	27	34,5	17	8,5
M-B			0,056		8,4	0,86		42		0	
L-A			0,049	0,0400	8,4	0,22	1,07	38	37,5	0	0,5
L-B			0,031		8,4	1,92		37		1	
U- A			0,010	0,0085	8,2	<0,01	<0,01	14	9	11	44,5
U- B			0,007		8,1	<0,01		4		78	
H-A	07.08.14	14	0,402	0,3780	10,1	5,1	5	165	364,5	3378	3598,5
H-B			0,354		9,5	4,9		564		3819	
M-A			0,136	0,1380	9,1	2,3	3,6	230	162,5	0	0
M-B			0,139		8,7	4,9		95		0	
L-A			0,082	0,0780	8,4	0,3	0,95	121	93	0	3
L-B			0,074		8,5	1,6		65		6	
U- A			0,011	0,0090	8,3	<0,01	<0,01			29	81
U- B			0,007		8,3	<0,01				133	

Rådata fra forsøk 3 fortsetter

Forsøk 3	dato	dag	OD (740 nm)	*Gj.snitt av paralleller	pH	Protein (µg/ml)	*Gj.snitt av paralleller	Microcystin (µg/l)	*Gj.snitt av paralleller	PO ₄ -P (µg/l)	*Gj.snitt av paralleller
H-A	09.08.14	16	0,383	0,4260	9,9	6,6	6,15	290	270	3246	3039
H-B			0,469		10	5,7		250		2832	
M-A			0,245	0,2030	9,2	1,8	1,45			0	0
M-B			0,161		8,4	1,1			0		
L-A			0,090	0,0875	8,3	1,7	1,3			4	5,5
L-B			0,085		8,4	0,9			7		
U- A			0,011	0,0090	8,3	<0,01	<0,01			29	70,5
U- B			0,007		8,3	<0,01			112		
H-A	11.08.14	18	0,242	0,3340	8,5	6	6,35			3233	2952,5
H-B			0,426		9,5	6,7			2672		
M-A			0,275	0,2250	8,5	2,3	1,95	290	414	0	0
M-B			0,174		8,5	1,6		538		0	
L-A			0,098	0,0995	8,4	0,5	0,7			2	4,5
L-B			0,101		8,4	0,9			7		
U- A			0,012	0,0095	8,4	<0,01	<0,01			20	59
U- B			0,007		8,4	<0,01			98		
H-A	13.08.14	20	0,165	0,1990	8,5	4,2	5,25			3355	3142
H-B			0,232		8,4	6,3			2929		
M-A			0,279	0,2340	8,3	2,8	2,55			0	0
M-B			0,188		8,3	2,3			0		
L-A			0,105	0,1040	8,3	0,3	0,7			4	4
L-B			0,103		8,3	1,1			4		
U- A			0,012	0,0100	8,2	<0,01	<0,01			25	144,5
U- B			0,008		7,9	<0,01			264		
H-A	15.08.14	22	0,148	0,1570	8,4	4,9	5,45	432	426,5	3762	3515
H-B			0,166		8,3	6		421		3268	
M-A			0,280	0,2390	8,3	3	2,55	575	527,5	0	0
M-B			0,197		8,2	2,1		480		0	
L-A			0,110	0,1080	8,2	1	1,25	253	267	6	8
L-B			0,106		8,1	1,5		281		10	
U- A			0,013	0,0105	8,1	0,6	<0,305	11	7,5	84	160,5
U- B			0,008		7,7	<0,01		4		237	

*Gjennomsnittsverdi av parallellene med lik behandling, som er brukt i denne studien.