

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



Forord

Denne masteroppgaven inngår i en 5-årig mastergradsstudie ved UMB på Ås, innen kjemi og bioteknologi, retning uorganisk miljøkjemi.

Bakgrunnen for valget av denne oppgaven er en interesse av svevestøv og partikler som oppstod allerede på høsten 2010 etter å ha hatt kurset MINA200 (Forurensning og miljø). Etter et besøk på NILU på våren 2011, med foredrag om vulkanaske holdt av Kjetil Tørseth, bestemte jeg meg for å forsøkte å skrive om noe relatert til nettopp dette (vulkanaske).

Planleggingen har foregått fra sommeren 2011, og arbeidet ble startet så smått i oktober. Da fikk jeg tilsendt aske fra vulkanen Grimsvötn på Island, som Adam Durant fra NILU hadde vært og tatt prøver av/hentet. I januar ble den sekvensielle ekstraksjonen utført, samt analyser av de ulike fraksjonene av materiale på ICP-OES. Dekomponering av ulike størrelsesfraksjoner av asken ble også foretatt, for å undersøke totalinnholdet av næringsstoffer. Analysene av disse prøvene ble også foretatt på ICP-OES. Til sist ble alger dyrket i algerør på SKP (senter for klimaregulert planteforskning). Forsøkene ble utført ved bruk av både konstante og varierende parametere.

Jeg vil først og fremst få takke NILU(Norsk institutt for luftforskning), og min bi-veileder Kjetil Tørseth, og Adam Durant for at de muliggjorde hele prosjektet ved å skaffe asken.

Jeg må sende en stor takk til Solfrid Lohne for all hjelp med analyse på ICP-OES, samt tolkning og utregning av resultatene. Karl Andreas Jensen har også vært svært behjelpelig når det gjelder både praktiske og teoretiske spørsmål. Jeg vil også takke SKP (Senter for klimaregulert planteforskning) for plass og utstyr til å dyrke alger, samt god opplæring av Silje Roksti som jobber som laboratorieteknikker på "alge-labben". Jeg ønsker også å sende en stor takk til Trygve Almøy, for hjelp til statistiske analyser.

Sist men ikke minst sender jeg en stor takk til min hovedveileder Elin Gjengedal, for mange gode råd og utallige timer med veiledning!

Kristin Seilskjær Frydendal

Ås, 29. mai 2012

Sammendrag

Hensikten med denne oppgaven var å finne ut om vulkanaske i kontakt med sjøvann kan frigjøre næringsstoffer, som er biotilgjengelige og kan føre til en algeoppblomstring i havet. Dette er av interesse på grunn av algenes opptak og mulige lagring av karbon i havet.

På vulkanaske (<2 mm) fra Grimsvötn på Island ble det utført en operasjonelt definert metode på 6 trinn kalt sekvensiell ekstraksjon for å undersøke biotilgjengeligheten av ulike grunnstoff. Dekomponering av siktede askefraksjoner (0-63, 63-90, 90-212, 212-600, 600-1000 og 1000- 2000 μm), ble foretatt for å undersøke om de ulike fraksjonene inneholdt ulike mengder næringsstoffer. Dekomponeringen for totalbestemmelse ble foretatt ved bruk av salpetersyre, 250⁰C og mikrobølgeteknikken på Milestone Ultraclave®, og den kvantitative bestemmelsen av grunnstoffene (Co, Cu, Fe, Mn, Si, Zn og P) som kan virke begrensende på algevekst i havet, ble utført på Perkin Elmer Optima 5300 DV. En CHN-analyse ble også utført for å finne ut om asken inneholdt noe nitrogen, som også kan virke begrensende på vekst. For videre å undersøke struktur og gjennomsnittlig innhold av næringsstoffer på overflaten til asken ble SEM benyttet.

Grønnalgen *Tetraselmis suecica* ble benyttet i *in vitro* dyrkningsforsøk, hvor ulike mengder aske (0,8, 1,6 og 8,0 g) av ulike fraksjoner (<63 μm og <2 mm) ble tilsatt direkte i algerør (330 ml), eller var i kort kontakt med saltvannet, som ble benyttet videre i forsøket.

Lysintensiteten, temperatur og CO₂ tilgang ble holdt tilnærmet konstant gjennom hele forsøket (henholdsvis 200 $\mu\text{mol fotoner m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 23 °C og 1 %) og veksten ble målt som celledtall, turbiditet og tørrvekt.

Det ble totalt sett løst ut mest Fe>Si>Mn>P>Zn>Cu> Co for den sekvensielle ekstraksjonen, rekkefølgen holder seg tilnærmet lik både for dekomponering med HNO₃ og HF. Andelen som er reversibelt bundet og mulig biotilgjengelig er liten (4 % Mn, 4 % Si, 9 % Zn, 11 % P, 0,2 % Fe, 8 % Cu, and 3 % Co). Den minste størrelsesfraksjonen inneholdt en noe høyere konsentrasjon enn resten. Asken ble vist å ikke inneholde nitrogen. Analysen i SEM viste at selv om morfologi og størrelse er ulik, så er overflatekomposisjonen tilnærmet homogen.

Dyrkningsforsøk gav varierende resultater, grunnet stor usikkerhet i målemetodene på grunn av asketilsetningen. En tilsetning av aske vil både påvirke målinger av turbiditet og tørrvekt, samt til dels celledtelling, da en nøyaktig telling vanskeliggjøres ytterligere av asken. Men det ble vist en signifikant forskjell i vekst i forhold til tid, for prøver i forhold til blank, i et av forsøkene. Noe som tyder på at asketilsetning til alger kan frigjøre tilstrekkelig med

biotilgjengelige næringsstoffer for å skape en algeoppblomstring, og dermed føre til et opptak av CO₂. (Hvor stort et slikt opptak kan være, og om det vil ha en effekt på det globale klimaet ble ikke undersøkt her.)

Abstract

The purpose of this study was to determine if volcanic ash in contact with sea water can release nutrients, which are bioavailable and can lead to algal blooms in the sea. This is of interest because of algal uptake and potential storage of carbon in the ocean.

In the present work the potential fertilizing capacity of volcanic ash collected from the Grimsvötn, Iceland, eruption in May 2011, is examined. The ash was sifted through different sieves (0-63, 63-90, 90-212, 212-600, and 600-1000 μm), decomposed in nitric acid at 250 $^{\circ}\text{C}$ using an Milestone Ultraclave® (microwave-technique), and analysed on ICP-OES (Perkin Elmer Optima 5300 DV) to check if there were differences in elemental composition between the fractions. The size-fraction analysis showed that the one containing the most nutrients totally, was the smaller portion $<63 \mu\text{m}$.

To further investigate the structure and the average concentration of nutrients on the surface of the ash, SEM was used, and the analysis showed surface composition was uniform with respect to nutrients, but not with respect to morphology. Analysis on CHN showed no evidence of nitrogen on the ash.

Different conditions (pH, salinity, and redox-conditions) affect speciation and remobilisation of trace elements. Thus in order to estimate the speciation of particulate trace metals most likely limiting algae growth in marine habitats (Co, Cu, Fe, Mn, Si, P, and Zn), tephra with particle size $<2 \text{ mm}$ was subjected to a six steps sequential chemical extraction procedure. The order of magnitude of each element that is reversible bound was rather small (approximately 4% Mn, 4% Si, 9% Zn, 10% P, 0.2 % Fe, 8 % Cu, and 3% Co), compared with the irreversibly bound portions. This however does not necessarily mean that the nutrient released does not create any effect with respect to algal growth. This is examined during an algae cultivation experiment.

Green-algae (*Tetraselmis suecica*) were grown “in vitro” in the laboratory in saltwater added f/2 medium, at 23 $^{\circ}\text{C}$ and a light intensity of 200 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$. An experimental set up is in progress where cell growth is measured in 330 mL tubes filled with algae containing seawater added different amounts of ash (0,8 g, 1,6 g, and 8 g per tube) at different size fractions ($<63 \mu\text{m}$ and $<2\text{mm}$). Cell growth is measured in terms of dry weight, cell count, and turbidity. The culture experiments gave varying results, due to uncertainty in the measurement of alga growth. However, it was shown a significant difference in growth in

relation to time, for samples compared to the blank, in one of the experiments. Suggesting that the ash added to the algae can release sufficient bioavailable nutrients to create an algae bloom, thereby leading to an uptake of CO₂.

Ordliste

Blankprøver i algeforsøk- vil si de prøver som er tilsatt en tilsvarende mengde alger som de andre prøvene, og ellers bare saltvann eller medie, avhengig av hva dyrkningsmediet generelt i forsøket består av.

FTU står for Formazine Turbidity Unit, og er en enhet som benyttes i turbiditetsmålinger av aske

ICP-OES står for induktivt koblet plasma optisk emisjonspektroskopi

Indirekte tilsetning av aske i algeforsøk- Det som menes med indirekte tilsetning, er at asken blir blandet med saltvannet, som deretter får stå å sedimentere i ca 30 minutter, før vannet blir helt av og benyttet videre i dyrkningsforsøket. (Teorien/tanken bak dette er at næringsstoffer som sitter adsorbent til overflaten skal få tid til å løse seg ut i vannet, og på den måten kunne gi en forskjell i algevekst når ordinært sjøvann og dette sjøvannet blir benyttet til å gro samme mengde alger i.)

In vitro- betyr på/ved laboratorieforsøk eller i prøverør

IPCC er forkortelsen for *Intergovernmental Panel on Climate Change*, som er det offisielle navnet på FNs klimapanel (IPCC 2012).

Klimaskeptikere- er kritiske røster som ikke er enige i det IPCC har kommet frem til (*CICERO* 2012).

SEM er en forkortelse for skanning elektron mikroskop, dette kan benyttes for å forstørre og undersøke diverse prøver med hensyn på topografi og overflatekomposisjon av grunnstoff.

Tefra er et mer generelt uttrykk for fragmentert materiale med vulkansk opprinnelse, og det deles videre inn i aske, lapilli (lavastykker), og blokker eller bomber. Det som skiller disse er størrelse, og aske er mindre enn 2 mm (Duggen et al. 2010).

Innholdsfortegnelse

Forord.....	i
Sammendrag.....	ii
Ordliste.....	vi
Innholdsfortegnelse.....	vii
1. Innledning.....	1
2. Teori.....	3
2.1 Klima.....	3
2.1.1 Klimagasser.....	4
2.1.2 Karbonlagring.....	5
2.1.3 Påvirkning på havet.....	6
2.2 Næringskrav for algeoppblomstring.....	7
2.3 Algedyrking i batch-kultur.....	7
2.4 Måling av vekstparametere.....	8
2.4.1 Tørrvekt.....	9
2.4.2 Celletelling.....	9
2.4.3 Turbiditet.....	10
2.5 <i>Tetraselmis suecica</i>	10
2.5.1 Alge i opprinnelig plan.....	10
2.6 Algeoppblomstring som følge av tilsetning av vulkanaske.....	11
2.7 Scanning Electron Microscope (SEM) og <i>sputter coater</i>	13
2.8 CHN - analyse av total karbon og total nitrogen.....	14
2.9 Sekvensiell ekstraksjon.....	15
2.10 Dekomponering.....	16
2.10.1 Prøveopparbeiding.....	16
2.10.2 Dekomponering med Ultraclave®.....	16
2.10.3 Microbølgeteknikken.....	18
2.11 ICP-OES.....	18
2.11.1 Interferenser.....	18
2.12 Statistikk.....	19
2.12.1 Enkle substitusjonsmetoder.....	19
2.12.2 Boxplot.....	19

2.12.3 Regresjonsanalyse	20
3.0 Eksperimentelt.....	20
3.1 Forbehandling av aske.....	20
3.1.1 Sikting av aske.....	21
3.2 Sekvensiell ekstraksjon	21
3.2.1 Forbehandling av sjøvann.....	21
3.2.2 Måling av pH.....	21
3.2.3 Sekvensiellekstraksjons-prosedyre.....	21
3.2.4 Måling på ICP-OES.....	23
3.3 Analyse av ulike askefraksjoner.....	24
3.3.1 Dekomponering	24
3.3.2 Preparering av standarder	25
3.3.3 Måling på ICP-OES.....	25
3.4 Knusing av prøver og CHN-analyse.....	26
3.5 Scanning Electron Microscope (SEM) og <i>sputter coater</i>	26
3.6 Algeforsøk.....	26
3.6.1 Forbredelser.....	26
3.6.2 Oppstart	27
3.6.3 Forsøk 1	29
3.6.4 Forsøk 2.....	30
3.6.5 Forsøk 3.....	30
3.6.6 Forsøk 4.....	30
3.6.7 Generelt for alle forsøkene	31
3.6.8 Tørrvekt.....	32
3.6.9 Turbiditet.....	33
3.6.10 Celletelling	33
3.6.11 Salinitet.....	35
3.7 Statistikk.....	35
4.0 Resultat og diskusjon.....	35
4.1 Sekvensiell ekstraksjon	35
4.1.1 Presisjon, nøyaktighet, deteksjon- og kvantifikasjons-grenser.....	35
4.1.2 Sektordiagram	36
4.1.3 Måling av pH.....	39
4.2 Analyse av de ulike størrelsesfraksjonene av aske på ICP-OES	39

4.2.1 Valg av syre til dekomponering	39
4.2.2 Nøyaktighet, presisjon, deteksjon og kvantifikasjon i metoden	39
4.2.3 SRM 2709a San Joaquin Soil som referansemateriale for dekomponering med HNO ₃	42
4.2.4 Resultater for dekomponering med HNO ₃ , fremstilt i sektor- og søylediagram	43
4.2.5 Resultater for dekomponering med HF og HNO ₃ , fremstilt i sektordiagram.....	45
4.3 Algedyrking.....	46
4.3.1 Forsøk 1- Innledende forsøk.....	47
4.3.2 Forsøk 2.....	51
4.3.3 Forsøk 3.....	55
4.3.4 Forsøk 4.....	58
4.4 SEM.....	61
4.4.1 Topografi (SEI-modus)	61
4.4.2 Distribusjon av grunnstoff i atomprosent (BEI-modus)	64
4.4.3 Diskusjon av resultater fra SEM.....	66
4.5 Resultat CHN-analysen	66
4.6 Sammenlikninger med andre studier i litteraturen	66
4.7 Forslag til videre arbeid	67
5. Konklusjon	68
6. Referanser.....	71
Vedlegg 1 – Sekvensiell ekstraksjon.....	1
Vedlegg 2 – Analyse av størrelsesfraksjoner av aske.....	3
Vedlegg 3 – Salinitet og pH gjennom forsøk 1-4.....	4
Vedlegg 4 – Oversiktstabell algeforsøk 1-4	5
Vedlegg 5 –Innvekt av aske forsøk 1-4.....	6
Vedlegg 6- Regresjonsanalysen av celletellinger for forsøk 1.	7
Vedlegg 7- Regresjonsanalysen fortatt på rådata av celletellinger i forsøk 2	8
Vedlegg 8 - Regresjonsanalysen fra forsøk 3.....	9
Vedlegg 9 - Regresjonsanalysen fortatt på rådata av celletellinger i forsøk 4	10
Vedlegg 10 – Celletelling forsøk 1.....	11
Vedlegg 11- Utrekning av forskjell i tørrvekt og FTU fra start til slutt i F 1-4.....	12

1. Innledning

Den kjente fysikeren og matematikeren Jean Baptiste Fourier, oppdaget allerede tidlig på 1800-tallet at jordas atmosfære kan holde på varme. Og han var den som først tok i bruk uttrykket drivhuseffekt for å forklare dette. Men det var John Tyndall som beviste at visse gasser kunne holde tilbake noe av den infrarøde strålingen (Weart 2003). I løpet av de siste århundrene, etter den industrielle revolusjonen, har det blitt mer og mer fokus på akkumuleringen av drivhusgasser i atmosfæren, og den mulige globale oppvarmingen som kan ha oppstått som en følge av dette (Falkowski et al. 1998; vanLoon & Duffy 2005a). Forskerne har enda ikke kommet til en enighet om klimaendringene som er observert, skyldes menneskelige påvirkninger eller ikke. De såkalte klimaskeptikere, kritiserer blant annet IPCC for å ha lagt for lite vekt på endringer i solaktiviteten og den kosmiske strålingen. De påpeker også at en på grunnlag av datainnsamlinger fra korte perioder må utvise forsiktighet ved å trekke konklusjoner om menneskeskapte klimaendringer (*CICERO* 2012). Drivhusgassene som karbondioksid (CO₂) og metan (CH₄) er mye omtalt i klimadebatten, og for å hemme den globale oppvarmingen, har karbonlagring blitt foreslått som et alternativ (Lackner 2003; United Nations 1998).

Primærproduksjonen i havet, kan overføre atmosfærisk CO₂ til organisk karbon som kan lagres i havet, men er ofte begrenset av tilgangen på næringsstoffer (Falkowski et al. 1998). I hav med HNLC (high-nutrient-low-chlorophyll), det vil si i hav med mye makronæringsstoffer som nitrat og fosfat, er det mikronæringsstoffene, som jern, som virker begrensende på produksjonen (Duggen et al. 2010).

Vulkanaske er kjent for å gjødsle jord, men potensialet til å gjødsle havet er lite undersøkt. Men det har blitt foreslått at vulkanaske kan slippe ut micro-næringsstoffer, ved kontakt med havet (Duggen et al. 2010). Det faktum at asken kan forflyttes over store avstander under utbrudd, kan føre til at selv vulkaner, som ligger langt fra havet, kan overføre aske og eventuelle (adsorberte) næringsstoffer dit (Durant et al. 2011).

Primærproduksjon (ved hjelp av alger) skjer i den lysrike sonen som stekker seg omtrent 100 meter ned i havet, og basert på Stokes lov så vil oppholdstiden for de ulike partikkelstørrelsene (2mm til <50 µm) variere fra et par minutter til et par dager (Duggen et al. 2007). Fordi mobiliseringshastigheten er raskest de første minuttene, har ulike gjennomstrømningsforsøk blitt utført med oppholdstid fra 15 minutter (Duggen et al. 2007) til

45 minutter og lenger (Duggen et al. 2010; Frogner et al. 2001; Jones & Gislason 2008). Det har også blitt utført forsøk med alger og sjøvann med lavt innhold av jern, men overskudd av andre vitaminer og næringsstoffer (Duggen et al. 2007). Her var konklusjonen at vulkanaske endret næringsbudsjettet i havoverflaten, og kan spille en rolle når det gjelder gassutveksling, og det globale klimaet.

Effekten av tilsetningen av jern har blitt undersøkt i forhold til lagringen av CO₂, men effekten er usikker og debattert i litteraturen (Duggen et al. 2010; Hamme et al. 2010; Jones & Gislason 2008). Målet med oppgaven var derfor å undersøke om en tilsetning av vulkanaske til en marin algekultur vil kunne føre til en algeoppblomstring (og derfor mulig lagring av karbon), og på den måten undersøke den potensielle fertiliseringseffekten til asken.

Dette skulle undersøkes ved batchforsøk *in vitro*, hvor konsentrasjonen og størrelsesfraksjonen av asken varierte. Lysstyrken og temperatur skulle holdes konstant, og CO₂ konsentrasjonen skulle ligge på cirka 1 %. Prøven av vulkanasken ble tatt omtrent 20 km fra vulkanen Grimsvötn på Island, i mai 2011. Tidsbegrensninger med hensyn på forsøket, førte til at en kvalifisert gjetning ut fra tilgjengelig litteratur ble foretatt, i forhold til hvor mye aske som ble tilsatt.

Opprinnelig skulle diatoméen *Phaeodactylum tricornutum* blitt benyttet, fordi diatoméer står for omtrent 20 % av den globale karbonfikseringen (Kroth et al. 2008). I tillegg har en høy C:Fe ratio også blitt observert i diatomé-planteplankton, i regioner hvor tilgangen på jern er begrenset (Watson 1997). Men på grunn av problemer hos leverandøren, kom ikke algen tids nok og grønnalgen *Tetraselmis suecica* ble valgt i stedet. Dette er en robust alge som vokser raskt.

pH, salinitet og redoks-forhold påvirker spesiering og remobilisering av sporstoffer, så for å estimere spesieringen av (de eventuelle) næringsstoffene i asken ble den utsatt for en sekvensiell ekstraksjon. Dette ble utført før dyrkningsforsøket *in vitro*, for å vurdere potensialet for remobilisering og biotilgjengelighet av næringsstoffer (Standring 2002; Tessier et al. 1979), som marine alger trenger for å reprodusere (fosfor (P), nitrogen (N), silisium (Si), jern (Fe), sink (Zn), kobber (Cu), mangan (Mn) og kobolt (Co)) (Hecky & Kilham 1988). Metoden består av 6 operasjonelt definerte trinn, hvor reagenser med økende reaktivitet benyttes, for å oppnå en fordeling mellom de ulike geokjemiske fasene. En utfordring med metoden er representative prøveuttak. Ved å studere prøven i SEM er det mulig å finne ut om materialet har en homogen struktur, samt om den prosentvise fordelingen (atomprosent) av

grunnstoffer på overflaten av partiklene er forskjellig. Konsentrasjonen av nitrogen skulle også bestemmes, men dette måtte gjøres på CHN.

De ulike størrelsesfraksjonene av asken skulle også dekomponeres for å undersøke om det var noe forskjell på nærings sammensetningen fra små til store askepartikler (<63 μm - <2 mm). Analysene av nærings sammensetningen fra både den sekvensielle ekstraksjonen, og dekomponering av størrelsesfraksjonene skulle utføres ved hjelp av ICP-OES.

Hypotesen som skal testes blir derfor om vulkanaske kan frigi nok biotilgjengelige næringsstoffer til at en primærproduksjon av alger kan oppstå.

2. Teori

2.1 Klima

I løpet av de siste 250 år har industrialiseringen og det økte forbruket og forbrenningen av fossilt brennstoff ført til et stadig økende utslipp av klimagasser. Klimagassene, eller de såkalte drivhusgassene som karbondioksid (CO_2), metan (CH_4), ozon (O_3), dinitrogenoksid (N_2O) og klorfluorkarbon (KFK) gassene bidrar alle til økt drivhuseffekt, og ifølge flere forskere dermed også en økt gjennomsnittstemperatur på jorda (Doyle 2011; Fuglestad & Murvoll 2009; vanLoon & Duffy 2005b). I en rapport vises det til at overflatetemperaturen til jorda i gjennomsnitt har økt med 0,3-0,6 $^\circ\text{C}$ siden sent på 1800-tallet og frem til 1995 (Fuglestad & Murvoll 2009).

Det finnes også de som er skeptiske til klimaendringene, og at de skyldes menneskelig påvirkning. Argumenter som at det har blitt lagt for lite vekt på at solaktiviteten, som endres avhengig av intensiteten til solen, og jordens bane i forhold til solen (Beer et al. 2000), samt endringen i den kosmiske strålingen som følge av dette har blitt lagt frem (CICERO 2012). Sammen med andre geofysiske faktorer som indre variasjon i klimasystemet, og drivhusgasser, peker dette mot at solen spiller en rolle når det gjelder global oppvarming (Beer et al. 2000), og klimaskeptikerne mener at denne rollen har blitt underestimert av FNs klimapanel, IPCC (CICERO 2012).

En kombinasjon av endret bruk av land (Fuglestad & Murvoll 2009), samt temperaturforandringer kan føre til at den naturlige lagringen av CO_2 både på land og i vann endres, og dermed ikke klarer og "fjerne" alle de tilførte klimagassene. Det er derfor sagt at en vil få en økt oppvarmingseffekt. Det har blant annet blitt vist at isbreer har trukket seg

tilbake i de senere år (Dow & Downing 2011). Selv om dette er et faktum, så er det ikke alle som mener at tilbaketrekkingen av isbreene skyldes den økte oppvarmingen alene. Isbreer har gjennom tidene vekslet mellom å vokse seg store, og trekke seg tilbake. Ifølge Nesje (2002), så kan dette skyldes økt nedbør noen vintere (milde og våte vintere), som har ført til at isbreer har økt i masse, i forhold til perioder med lite nedbør, hvor massetap kan skje (som for eksempel i alpene).

2.1.1 Klimagasser

Grunnen til at en hører mye mer snakk om karbondioksid enn metan, eller noen av de andre drivhusgassene, er fordi den (CO_2) er tilstede i en høyere konsentrasjon enn disse (tabell 2.1), og den vil derfor gi en høyere total-oppvarming (strålingspådriv) (Fuglestvedt & Murvoll 2009). Strålingspådriv er differansen mellom andelen stråling fra sola som treffer jorda, i forhold til hvor mye som blir reflektert fra jorda tilbake til verdensrommet (CICERO 2010). Men de øvrige klimagassene (både metan, dinitrogenoksid og klorfluorkarboner) har et mye høyere globalt oppvarmingspotensiale (GWP) enn karbondioksid (tabell 2.1) (Fuglestvedt & Murvoll 2009; vanLoon & Duffy 2005b). GWP beregnes som oftest ut ifra en hundreårsperiode, og beskriver langsiktige effekter eller bidrag av hver enkelt drivhusgass sammenliknet med CO_2 (Fuglestvedt & Murvoll 2009; vanLoon & Duffy 2005b).

Et lite utslipp av metan kan med andre ord ha en større effekt på klimaet enn et stort utslipp av CO_2 . De viktigste kildene til utslipp av metan globalt er husdyrhold, rismarker, søppelfyllinger, produksjon og transport av naturgass samt utvinning av kull (Henriksen & Kanestrøm 2000).

Tabell 2.1: Tabellen viser en oversikt over ulike drivhusgassers konsentrasjon og bidrag til den globale oppvarmingen, samt oppholdstid til de ulike gassene i atmosfæren og Globalt oppvarmingspotensiale (GWP).

Modifisert etter (vanLoon & Duffy 2005b).

Gass	Kjemisk formel	Konsentrasjon i troposfæren*	Strålingspådriv (W/m^2)	Global oppvarming potensiale	Oppholdstid (år)
Karbondioksid	CO_2	378 ppmv	1,46	1	50-200
Metan	CH_4	1,78 ppmv	0,48	23	12
Dinitrogenoksid	N_2O	0,32 ppmv	0,18	296	115

Svovelheksanfluorid	SF ₆	4,8 pptv	0,002	22200	3200
Karbon tetraklorid	CCl ₄	94 pptv		1800	35
Triklorfluormetan(KFK-11)	CCl ₃ F	257 pptv		4600	45
Diklordifluormetan(KFK-12)	CCl ₂ F ₂	544 pptv		10600	102
Ozon	O ₃	0,034 pptv	0,35		

*ppmv står for antall gassmolekyler per million (10^6) luftmolekyler

*pptv står for antall gassmolekyler per tusen milliarder (10^{12}) luftmolekyler

konsentrasjonen av de tre første gassene oppgitt i tabell 2.1, før den industrielle revolusjonen (1750) var på henholdsvis 280 ppmv, 700 ppbv og 275 ppmv, og KFK-gassene eksisterte ikke enda (Fuglestvedt & Murvoll 2009).

Endringer i klima kan påvirke økosystem, landbruk og samfunn både økonomisk og med hensyn på menneskeliv. Mer ekstremvær har blitt observert, som hetebølger og flom, og dette fører til tap av menneskeliv og verdier for samfunet. Noen av de verste konsekvensene av klimaendringene er mange enige om at kan unngås, dersom en finner måter å redusere utslipp på, men dette går så sakte at det vil være nødvendig å begynne å se oss om etter andre alternativer som foreksempel karbonlagring (Dow & Downing 2011; Lackner 2002; Lackner 2003; Taylor & Barrett 2009).

2.1.2 Karbonlagring

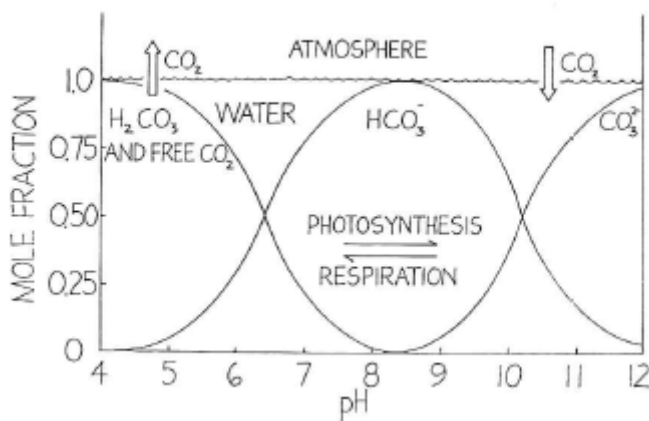
Karbonlagring beskrives som en metode som benyttes for å isolere karbondioksid fra atmosfæren (Taylor & Barrett 2009). Det finnes flere ulike metoder for karbonlagring, blant annet lagres karbon i trær som vokser, og for å hindre økte utslipp har det blitt foreslått å verne de nåværende områdene dekket av skog, samt og etablere nye områder (Fuglestvedt & Murvoll 2009; Henriksen & Kanestrøm 2000).

Det har også blitt foreslått å bruke havet som lagringsplass, da det er dekket 73 % av jordens overflate (vanLoon & Duffy 2005c), og i dypet er vannet umettet med CO₂ (Lackner 2002). Men på grunn av havets naturlige sirkulasjon, er dette en situasjon som blir uholdbar, da lagringstiden er sagt å være på noen århundrer.

I visse områder av havene, som for eksempel i polområdene er det blitt påvist ubrukte næringsstoffer som nitrater og sulfarter. Her kan en tilsetning av jern (via for eksempel vulkanaske eller atmosfærisk støv) (Henriksen & Kanestrøm 2000), som virker begrensende på primærproduksjonen i 20 % av havet (Hamme et al. 2010), stimulere vekst av planteplankton, slik at en større andel CO₂ kan lagres (Henriksen & Kanestrøm 2000). En slik ekstra primærproduksjon kan ha betydning for karbonbudsjettet, og det er vist at total produksjon av organisk karbon ved hjelp av planteplankton i havet ligger på 45 gigatonn per år, og ca 1/3 av dette transporteres og lagres i havet i opptil flere tiår (Falkowski et al. 1998).

2.1.3 Påvirkning på havet

Siden tiden før 1750 (før industrien) og frem til 1990, har pH-en i havoverflaten minket med cirka 0,1 i visse områder, som følge av den økte konsentrasjonen av karbondioksid (CO₂) i atmosfæren (Dow & Downing 2011). Karbondioksidet vil kunne løse seg i havet og danne blant annet karbonsyre (likning 1.0) (Økland & Økland 2006). Figur 2.1 illustrere også hvordan fotosyntese og respirasjon virket på likevkten, som forøvrig er pH avhengig



Figur 2.1: Figuren viser hvilken effekt både fotosyntese og respirasjon har på ioneformer av uorganisk karbon, samt påvirkning på pH (Richmond 1986).

Sjøvann inneholder i tillegg borsyre, men tilstedeværelsen av denne bidrar ikke markant til bufferkapasiteten. Sjøvann har minimums bufferkapasitet ved pH 8 (Stumm & Morgan 1996). For mer utfyllende informasjon, og likevektsdiagram for sjøvann, se Stumm og Morgan et al. (1996).

Forsuring av havet, sammen med den økte oppvarmingen, truer eksistensen av korallrev og små organismer på bunnen av næringskjeden, og som en konsekvens hele økosystem (Dow & Downing 2011).

2.2 Næringskrav for algeoppblomstring

En algeoppblomstring krever tilgang på næringsstoffer, lys og karbondioksid (CO₂), og vil kunne overføre uorganisk karbon (CO₂) fra atmosfæren til havet (Hamme et al. 2010). Ulik tilgang på næring i de forskjellige havområdene, gjør at begrensende vekstfaktor for alger vil være forskjellig fra sted til sted. For å produsere biomasse/reprodusere krever algene relativt fastsatte porsjoner av grunnstoffene hydrogen (H), karbon (C), oksygen (O), nitrogen (N), fosfor (P), silisium (Si), jern (Fe), sink (Zn), kobber (Cu), mangan (Mn), molybden (Mo), magnesium (Mg), kalium (K), natrium (Na), kalsium (Ca), svovel (S), bor (B) og kobolt (Co), men ikke alle alger krever silisium. I sjøen finnes de fleste av disse stoffene i overskudd (tabell 2.2), bortsett fra P, N, Si, Fe, Zn, Cu, Mn og Co, som kan virke begrensende på produksjonen. Dette er sett ut ifra krav fra gjennomsnittlige algepopulasjoner i gjennomsnittlig sjøvann (Hecky & Kilham 1988). Både C, N, P, O, og S er nødvendig for vekst av alle alger, fordi de er til stede i hovedbestanddelene i cellene, som proteiner, lipider, nukleinsyrer og karbohydrater (Healey 1973).

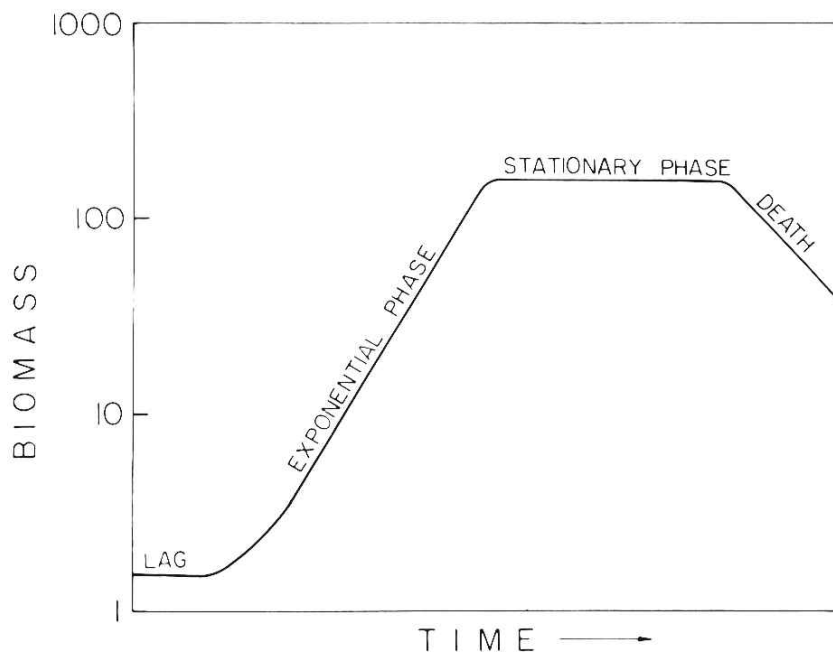
Tabell 2.2: tabellen viser en oversikt over stoffer til stede i saltvann med en salinitet på 35 promille. 97 % av alt saltvann har en salinitet på mellom 33 og 37 ‰ (Stumm & Morgan 1996).

Constituent	Seawater at $S = 35\text{‰}$ (g kg ⁻¹) ^a
Na ⁺	10.77
Mg ²⁺	1.29
Ca ²⁺	0.4121
K ⁺	0.399
Sr ²⁺	0.0079
Cl ⁻	19.354
SO ₄ ²⁻	2.712
HCO ₃ ^{-c}	0.1424
Br ⁻	0.0673
F ⁻	0.0013
B	0.0045
	$\Sigma = 35$

2.3 Algedyrking i batch-kultur

Den mest vanlige metoden benyttet for dyrking av alger, er dyrking i en batch-kultur (Richmond 1986). En batch-kultur består typisk av et lukket system med en begrenset

næringstilgang, og veksten av alger går igjennom flere faser, som vist i figur 2.2. Først når kulturen har kommet i gang med veksten vil den fortsette så lenge det er tilstrekkelig med næring og lys tilgjengelig, dette kalles lag-fasen. Etter hvert kan kulturen bli så tett at algene vil begynne å absorbere lys, og dermed hindre lysgjennomgangen. Dette sammen med den minkende næringstilgangen og en økende opphopning av giftig avfall, reduserer vekstraten. Til slutt begynner cellene å dø, som følge av dette, og de kan slippe ut organiske veksthemmende materialer i mediet (Becker 1994). Veksten av algene er også temperaturavhengig, og vil øke opp til optimal temperatur er oppnådd, denne temperaturen varierer mellom ulike alger. De fleste alger vokser godt ved romtemperatur, mellom 15-20 °C. Mediets pH, hvor algene blir dyrket spiller også inn på veksten, fordi pH påvirker flere biologiske prosesser, så vel som å påvirke løseligheten til ulike metall-komplekser. Høy salinitet kan hemme celledeling, og føre til tap av fotosyntetisk aktivitet, i tillegg kan det føre til endringer i den osmotiske reguleringen, som igjen kan være energikrevende (Richmond 1986). Salinitet (og pH) kan også være med å påvirke løseligheten til grunnstoffene bundet til asken, som forklart under i teorien for sekvensiell ekstraksjon.



Figur 2.2: Figuren viser en kurve over et typisk batch forsøk, med lag-fase, eksponentiell vekst, stasjonær fase og til sist celledød (Richmond 1986).

2.4 Måling av vekstparametere

Det finnes ulike måter og måle vekst på i en algekultur. I populasjoner av encellede organismer, kan masse bestemmes ved hjelp av vekten av cellene (tørr eller våtvekt) per

volumenhet, eller antallet individuelle celler per volumenhet. Turbiditet kan også brukes som et estimat på konsentrasjonen av alger i en kultur, og fordelene med denne målemetoden er at den ikke er destruktiv (Becker 1994). En representativ prøvetaking er svært viktig, så det er viktig at kulturen er homogen når prøvene blir tatt, samt at de tas raskt og effektivt, før algene synker (Richmond 1986).

Både turbiditet og tørrvekt gir en kvantitativ måling av biomasse, og bør etterfølges av celledelling. Algene bør også studeres i mikroskopet for å se etter morfologiske forandringer, og eventuelt ugress/microorg som kan ødelegge forsøket (Richmond).

2.4.1 Tørrvekt

Tørrvektmålinger er en av de mest direkte måtene å estimere biomasse på (Becker 1994; Richmond 1986), og involverer prøvetaking, filtrering, tørking og veiing. Algene påføres et filter som separerer algene fra mediet, og for saltvannsalger bør det benyttes en buffer eller en fortynnet løsning av medium for å vaske bort salter, for at ikke cellene skal sprekke.

Tetraselmis suecica tåler å bli vasket med milliq vann (Roksti 2012), så derfor ble milliq-vann benyttet til dette formålet.

Deretter må filterne tørkes, og tørketemperaturen ligger vanligvis på mellom 70 og 110 °C. Etter tørkingen, før filterne skal veies, oppbevares de i en eksikator for at ikke fuktighet skal absorberes og endre vekten.

Problemet med tørrvektmålinger er at de ikke skiller mellom alge-biomasse og eventuell annen masse, som mineraler eller silt. I tillegg finnes det alger så små at de ikke holdes tilbake av i filteret. Derfor kreves andre metoder i tillegg for å bestemme biomasseproduksjon (Richmond 1986).

2.4.2 Celledelling

Lysmikroskop og ulike modeller av hemacytometre (tellekammere), kan benyttes for å telle celler. Tellekammernes utforming gjør at en rute tilsvarer et volum (telling av et bestemt antall ruter, tilsvarer telling i et bestemt volum), ulikt fra tellekammer til tellekammer. For telling av alger bør hemacytometeret vaskes og tørkes mellom hver gang det brukes (applikasjon), og cellene bør få tid til å "sette seg". Reproduserbarhet er det største problemet i metoden, og derfor er prøvetaking, fortynning og fylling av kammeret viktig. Fordi prøvekommeret ofte rommer så lite som 1 µl (ca en dråpe), så sier det seg selv at dersom ikke

denne dråpen er representativ for kulturen, og dersom ikke prøvetakingen har vært bra, så vil resultatene bli svært avvikende (Becker 1994; Richmond 1986).

2.4.3 Turbiditet

Turbiditet gir et mål på konsentrasjonen eller tettheten (økningen i biomasse) av alt suspendert stoff i løsningen (silt, slam, leir-mineraler, mikroorganismer og organiske og uorganiske stoffer), men benyttes her for å estimere økningen i biomasse av alger i en løsning. Målingen påvirkes av størrelse og form på algene, samt om det er partikler til stede i løsningen som kan spre lyset. Det er vanlig å benytte spektrofotometere eller kolorimetre til dette formålet. (Richmond, 1986). I dette forsøket ble et spektrofotometer benyttet. Prinsippet bak målemetoden er at en stråle med infrarødt (IR) lys sendes igjennom en kyvette, som inneholder prøven som skal måles. (For å holde interferenser som skyldes fargede prøver på et minimum, så er lyset som benyttes "high emission IR LEP" med en bølgelengde på 890 nm.) En sensor plassert 90 grader på lysretningen, detekterer lysmengden som spres, grunnet uløselige partikler i prøven, og en mikroprosessor omgjør disse signalene til verdier i FTU (Formazine Turbidity Unit). For å oppnå best mulige/presise resultater er det viktig at toppen på kyvetten festes i samme posisjon for hver avlesning. I tillegg bør en unngå luftbobler og smuss på glasset, samt hurtigutfellende partikler i løsningen (HANNA instruments 1998).

2.5 *Tetraselmis suecica*

Tetraselmis suecica er en grønnalge (*Chlorophyceae*) som lever i havet, og den har blitt mye brukt som fôr innenfor akvakultur (Thomas et al. 1984). For at en alge skal egne seg som fôr må den ha en god næringssammensetning, i tillegg til at den er avhengig av å formere seg hurtig, være stabil og medgjørelig i en kultur med hensyn på temperatur, lys og næringsinnhold, samt næringssammensetningen i algen må være god. Dette er også fordelaktige egenskaper med hensyn på dyrkningsforsøk. Det er et kjent faktum at algen *T. suecica* er tolerant ovenfor ulike saltkonsentrasjoner, og optimal vekst ligger på mellom 25-35 ‰ salinitet (Fabregas et al. 1984). Dette gjør at *T. suecica* er en robust og stabil algetype, som egner seg godt til bruk i batch-forøk.

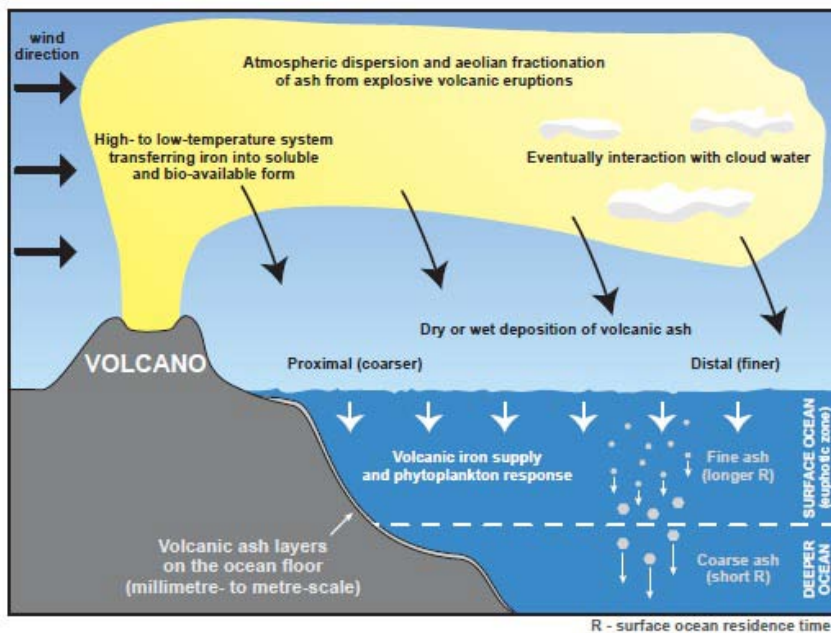
2.5.1 Alge i opprinnelig plan

Phaeodactylum tricornutum er en type alge som hører til gruppen diatomé eller kiselalger. Diatoméer er eukaryote encellede alger som har sitt naturlige habitat i akvatiske miljø, og som også finnes der i store mengder (Kroth et al. 2008). Diatoméer har generelt den hurtigste produksjonen av biomasse (reproduksjonsrate) av marine fytoplankton (som dinoflagellater

og coccolitophores) (Brand & Guillard 1981). Opptil 20 % av karbonfikseringen globalt, kan skyldes biomassen som produseres av diatoméer (Kroth et al. 2008).

2.6 Algeoppblomstring som følge av tilsetning av vulkanaske

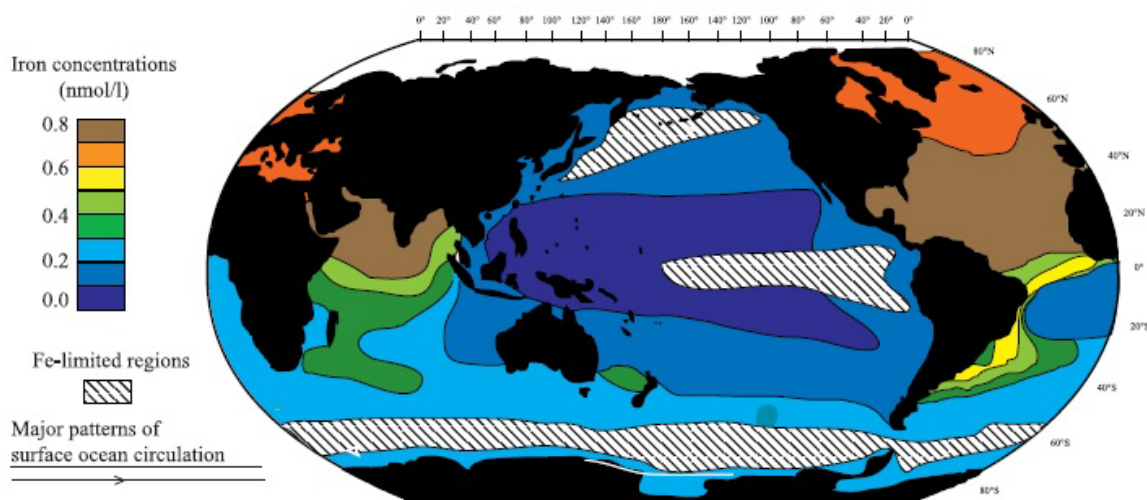
Flere studier viser til at vulkanaske (tefra <2 mm) kan føre til store algeoppblomstringer av planteplakton i havet, og at det ofte er jern som er den begrensende faktoren (Duggen et al. 2010; Hamme et al. 2010). En vulkan som har et utbrudd kan transportere aske med varierende størrelse flere kilometer opp i atmosfæren (Duggen et al. 2010). Noen av partiklene vil da kunne danne atmosfæriske aerosoler (suspensjon av partikler i gass som forblir svevende i luften). Partiklene i en aerosol kan variere i størrelse fra 1 nm opp til 100 μm . Tiden som partiklene holder seg flytende i luften på avhenger av størrelse, tetthet og luftstrømmer. De største partiklene vil ligge igjen nærmest vulkanen, mens mindre partikler vil kunne transporteres over større avstander. Partikler større enn 10 μm i diameter vil avsettes på grunn av tyngdekraften, mens partikler mindre enn 10 μm krever andre mekanismer for utfelling. De kan foreksempel vaskes ut med regnvann, og svært små partikler vil kunne koagulere og danne større partikler og dermed felle ut. Derfor vil partikler med en størrelse mellom 0,01-1 μm kunne holde seg svevende over lengre tidsperioder, og kan bli transportert over større områder (vanLoon & Duffy 2005a), og dermed havne i havet (figur 2.3).



Figur 2.3 Figuren viser en fremstilling over de ulike parameterne som påvirker askens oppholdstid i aerosolen, og i havet, samt mulige effekter av nedfall i havet (Duggen et al. 2010).

Aske aerosoler kan som nevnt holdes svevende over lengre tidsperioder, avhengig av størrelse og en rekke andre variabler. Partiklene kan da adsorbere micronæringsstoffer og salter (reaktive forbindelser fra den vulkanske gassfasen) fra aerosolen til overflaten sin. Disse reaksjonene i askesøylen/askeskyen kan på denne måten endre nærings-sammensetningen på overflaten til asken. Det har blitt vist at interaksjonen mellom de vulkanske gassene og tefra, i vulkanutbrudds-søylen er på et maksimumsnivå, ved temperaturer mellom 300 - 700 °C. Ved høyere temperaurer, i kjernen av vulkanutbruddskolonnen, dannes saltpartikler (fluorider og sulfater av alkalimetallene og Ca), og ved lavere temperaturer (<338 °) dannes aerosoler med blant annet (kondensert) svovelsyre. Disse holdes suspendert lenger enn tefraen, og blir delvis separert fra nedfallet. (Oskarsson 1980). Små partikler har blitt vist å gi et høyere utslipp av løselige partikler, da de har en bedre "scavanger" effect, fordi overflaten er så stor i forhold til massen (Oskarsson 1980; Rose Jr 1977). Men scavangingeffekten er liten nær vulkanen, der aerosolen ikke er dannet, i forhold til ved mellomdistanser, der konsentrasjonen av aerosoler øker. Langt fra vulkanen, der aerosolen er fortynnet vil scavanging effekten igjen være mindre. (Rose Jr 1977).

Ved kontakt med vann vil disse saltene kunne løses opp og dermed føre til en økt næringstilførsel (Delmelle et al. 2007). Særlig i områder hvor det er mangel på jern, men overskudd av N og P, kan nedfall av aske, med adsorberte næringsstoffer (Fe) ha en stor betydning for algeoppblomstring (Duggen et al. 2010; Hamme et al. 2010). Figur 2.4 viser havområder som har en begrenset tilgang på jern, og dermed hvor veksten av planteplankton kan være begrenset av jern.



Figur 2.4: Figuren viser en oversikt over havområder med høy og lav tilgang på jern (Olgun et al. 2011).

Dersom asken ikke har vært flyvende lenge, kan samhandlingen med skyene (the volcanic plume) ha vært svært kort. Dette vil si at lite eller ingen næringsstoffer har blitt adsorbent til overflaten gjennom kontakt med syrer og vannløselige metaller tilstede i aerosloen (Frogner et al. 2001). Noe som igjen kan føre til at lite næringsstoffer er tilgjengelige/løselige fra asken i vanlige utvaskings-forsøk.

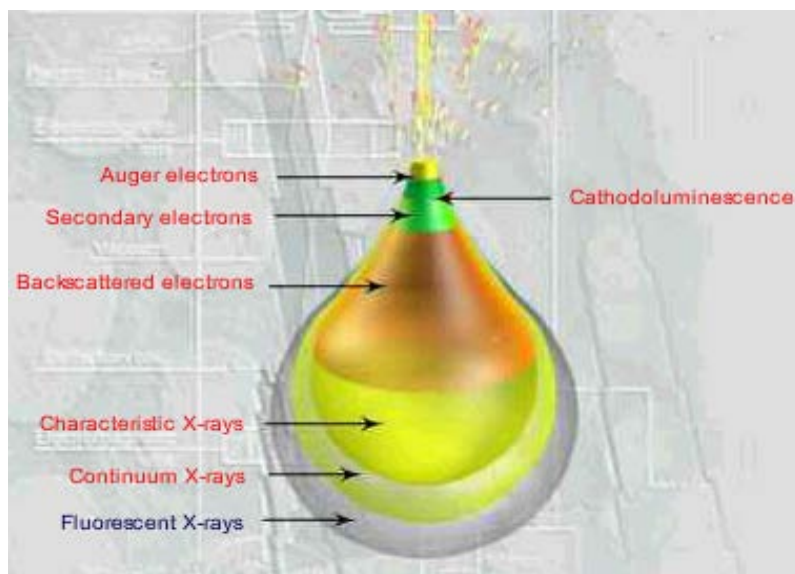
Når asken kommer i kontakt med vannet, blir mesteparten av de løselige grunnstoffene løst ut etter kort tid, gjerne innen 45 minutter (Duggen et al. 2010) eller 1 time (Frogner et al. 2001). Mobiliseringsraten er høyest i de første 5-15 minuttene, og det vil si at eventuelle næringsstoffer vil bli frigjort i den lysrike sonen øverst i havet, hvor algene lever (Duggen et al. 2007; Duggen et al. 2010).

Det er viktig at asken som benyttes i forsøk er uberørt, det vil si at den ikke har blitt utsatt for fuktighet, fordi ved kontakt med vann vil næringsstoffene løses ut (som forklart ovenfor). Aske som har blitt oppbevart over tidsperioder på mer enn et par år (aldrende aske) har blitt vist å løse ut minkende mengder mobiliserbart grunnstoff (Jones & Gislason 2008; Olgun et al. 2011).

2.7 Scanning Electron Microscope (SEM) og sputter coater

Sputter coateren sprayer på et tynt lag med en blanding av gull og palladium på prøven (substatet) som har en stor diameter, og på den måten sikres en jevn tykkelse av coatingen på 5-7 mm. Hensikten med coatingen er å forsterke signalene (Quorum Technologies Ltd.). (Coatingen ble kun benyttet for topografi-analysen i secondary electron imaging (SEI) modus).

I SEM sveipes en fokusert stråle av elektroner over overflaten på prøven i et rutemønster. Dette kan blant annet produsere sekundære elektroner, tilbakespredte elektroner, karakteristisk røntgenstråling, Auger elektroner og bremsestråling. De sekundære elektronene kommer fra et spesifikt emisjonsvolum, som er nærmere overflaten i prøven, enn der de tilbakespredte elektronene og røntgenstrålingen kommer fra, se figur 2.5. Derfor viser SEI modus, topografien til prøven, backscattered electron imaging (BEI) modus benyttes for å lokalisere ulike faser, mens røntgenstrålingen gir et større reaksjonsvolum, som kjemisk informasjon kan bestemmes utifra (Goldstein 2003).



Figur 2.5: Figuren viser spesifikke emisjonsvolum fra ulike strålingstyper, som kan oppstå når en elektronstråle sveipes over en overflate på en prøve.

2.8 CHN - analyse av total karbon og total nitrogen

Dumas metode (beskrevet i (Jung et al. 2003)) ble benyttet for bestemmelse av total nitrogen, og tørr forbrenning (dry combustion) for total karbon (Tiessen & Moir 1993).

Finknust materiale veies opp, og utsettes for en så høy temperatur (1050 °C) at det oppnås en fullstendig forbrenning med oksidasjon av C til CO₂. Konsentrasjonen av karbondioksid måles ved hjelp av en IR-celle (Infrarødt lys).

Karbondioksid må gjennomgå en endring i dipol-moment når den roterer eller vibrerer, for å absorbere IR-stråling. Karbondioksid har en deformeringsvibrasjon, som medfører endring av bindingsvinkelen (det finnes også strekkvibrasjon). IR-spektroskopi utnytter det faktum at molekyl vibrerer, og at et slikt molekyl (CO₂) vil kunne absorbere stråling med samme frekvens som vibrasjonen (Skoog et al. 2007a). IR-cellen består av en glødetråd, en ”chopper” hvor IR-stråling fra glødetråden blir ført inn i prøven, et prøvekammer med gass som skal måles, og et bølglengdefilter på den andre siden, samt en detektor som registrer hvor mye lys som har passert gjennom kammeret (Dahl 2012). Beer lamberts lov, Absorbans (A) = ϵcl , hvor ϵ er absorpsjonsevne (molar absorbtivitet), c er konsentrasjon og l står for lengde på lysveien, benyttes for å regne ut konsentrasjonen (Skoog et al. 2007b).

Prinsippet for målingen av total nitrogen er tilsvarende, men NO_x forbindelsene vil bli redusert ved hjelp av kobber til N₂, som måles av en TC-celle (termisk konduktivitet) (Jung et al. 2003; Tiessen & Moir 1993). I TC-cellen blir referansegassen (He) og prøvegassen ført inn

parallellt, med påsatt konstant spenning. På grunn av at ulike gasser har forskjellig varmeledningsevne, kan forskjellen mellom referansegass og prøve (med referansegass) måles (Dahl 2012).

2.9 Sekvensiell ekstraksjon

Den tidligere bruken av totalkonsentrasjon for å fastslå potensielle effekter av forurensning fra foreksempel jord eller sediment forutsetter at alle specier av et gitt metall har samme grad av giftighet eller påvirkning på miljøet. Men denne forutsetningen stemmer ikke. Bruken av sekvensiell ekstraksjon har gjort det mulig å oppnå informasjon om biotilgjengelighet, mobilisering og transport av sporstoffer, samt de ulike specienes tilgjengelighet (Filgueiras et al. 2002; Tessier et al. 1979).

For å finne ut hvilke næringsstoffer som er tilstede i asken, og som er potensielt biotilgjengelig for algene, kan denne metoden benyttes. En sekvensiell ekstraksjon er en operasjonelt definert metode som baserer seg på prinsippet om at ulike sporstoff er ulikt fordelt mellom de forskjellige geokjemiske fasene til stede i jord og sedimenter, og i dette tilfellet aske. Næringsstoffene kan blant annet være fordelt mellom organisk materiale, jern og mangan oksider, og sulfider og karbonater. I tillegg kan ulike bindingsmekanismer (ionebytte, adsorpsjon og utfelling) holde igjen metallionene på overflaten (til aksen) (Filgueiras et al. 2002). Ved bruk av ulike reagenser, kan metaller bundet til ulike fraksjoner av asken (som organisk materiale, metalloksider og leirmineraler) ekstraheres selektivt. På den måten kan en oppnå et skille mellom ulike bindingsformer av de aktuelle grunnstoffene (Tessier et al. 1979). Reaktiviteten på reagensene som benyttes i de ulike ekstraksjonstrinnene øker med hvert trinn, samtidig som mobiliteten til stoffene som løses ut minker (Filgueiras et al. 2002). Bindingsstyrken er derfor omvendt proporsjonal med mobilitet i naturmiljøet.

Miljømessige endringer, som blant annet endringer i redokstilstand, salinitet, pH og temperatur, kan påvirke speciering og remobilisering av de ulike grunnstoffene (Standring 2002). Den utbyttbare delen tilsvarer de metallene som er mest tilgjengelig for opptak i planter, og en endring i ionestyrke vil kunne føre til frigjøring av disse. En senkning av pH, vil kunne gjøre at metaller bundet til karbonater blir gjort mobile, og en økning i enten reduserende eller oksiderende forhold, vil kunne mobilisere metallfraksjonen bundet til jern- og manganoksider, og organisk materiale. Metallene bundet til restfraksjonen, kan kun mobiliseres ved hjelp av forvitring (Filgueiras et al. 2002). Fraksjonene som kan undersøkes er vannløselig, reversibelt bundet med og uten assosiasjon med karbonat, lett reduserbart

materiale som oksider av Mn eller Fe og oksiderbare komponenter (Oughton & Lind 2011). De tre første fraksjonene er regnet som reversibelt bundet, mens fraksjon 4-6 regnes som irreversibelt bundet (Standring 2002).

2.10 Dekomponering

2.10.1 Prøveopparbeiding

Dekomponering av prøver foretas fordi de fleste teknikker, som ICP-OES, ikke kan måle på faste prøver. Derfor må de prøvene som eventuelt består av fast stoff, løses opp i væske, for at en løsning med ioner skal oppnås. Et homogent uttak av prøve er viktig, fordi resultatene aldri blir noe bedre enn prøvetakingen, og paralleller av en og samme prøve (minst 3) kan si noe om homogeniteten til prøven, samt presisjon fra prøvetaking til analyse. Selve prøvetakingen, oppbevaringen og behandlingen av prøven har derfor stor betydning. Det er viktig å jobbe rent og i så få operasjoner som mulig.

Det er viktig med renhet av utstyr, og at kjemikaliene som blir brukt ikke inneholder forurensninger, og derfor tas blankprøver med. Blankprøver er prøver uten analytt som har gjennomgått samme analysetrinn som resten av prøvene. Teflonrørene som benyttes har blitt vasket i syrebad med 8M HNO₃, slik at eventuelle ionerester holder seg på ioneform, og ikke fester seg til innsiden av veggene i beholderen. Rørene skylles også i ionebyttet vann og tørkes i egne tørkeskap for å hindre forurensninger. Blankprøver tas med for å kontrollere om det har blitt gjort noen tilfeldige eller systematiske feil i analysen. Dersom kun ett teflonrør er forurenset, er dette en tilfeldig feil, som kan skyldes at ett rør ikke har blitt tilstrekkelig rengjort. Forurensninger i kjemikaliene vil gi en systematisk feil, og denne kan korrigeres for (Jensen 2011).

2.10.2 Dekomponering med Ultraclave®

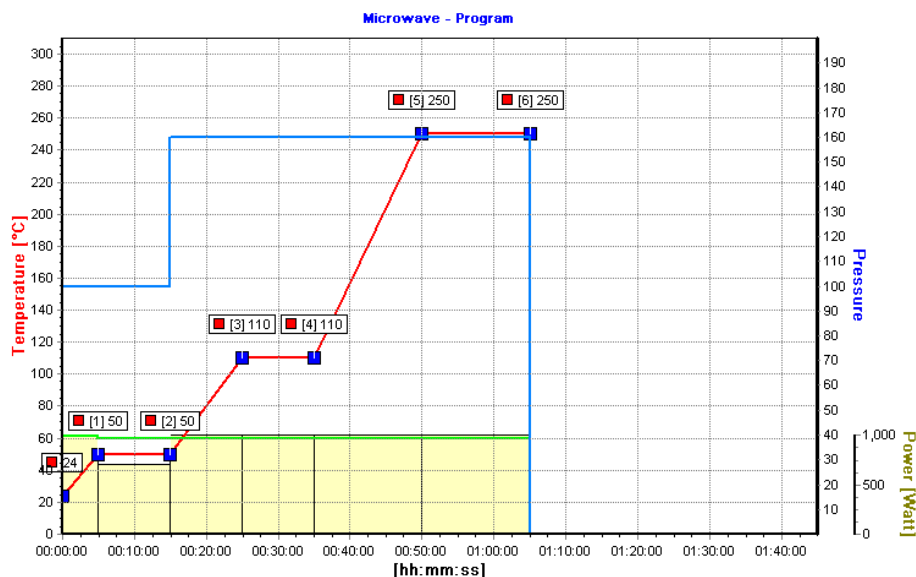
Prøvene varmes opp i en sterk syre, valg av syre avhenger av om prøven er organisk eller ikke. Organiske prøver må oksideres, så det blir ofte brukt salpetersyre (HNO₃), som er sterkt oksiderende ved høye temperaturer. En annen fordel med denne syren er at den gir få interferenser. Til prøvene tilsettes også hydrogenperoksid (H₂O₂) for å oksidere de nitrøse gassene til nitrat, for å unngå interferenser (Jensen 2011).

En annen syre som også kan brukes til dekomponering er den vandige formen av hydrogenfluorid (HF) (Flussyre). Dette er en svak syre, men den er likevel sterkt etsende (den kan etse gjennom glass) (Kirkpatrick et al. 1995). Flussyre benyttes fordi den kan løse opp

silikater, og dermed eventuelle grunnstoff som sitter i strukturen. Derfor kan dekomponering ved bruk av HF gi høyere utbytte, enn kun dekomponering ved hjelp av HNO_3 . Borsyre kan benyttes for å nøytralisere HF, slik at en unngår slitasje på glassutstyr (Harris 2010; Jensen 2012).

I ultraklaven (Milestone ultraclave) er det en load som består av vann, svovelsyre (H_2SO_4) og hydrogenperoksid (H_2O_2). Prøverørene plasseres i loaden, loaden varmes opp av mikrobølger, og alle prøvene vil dermed oppnå samme temperatur. Temperaturøkningene styres av et dataprogram og følger figur 2.6. Trykket blir satt til 50 bar ved hjelp av nitrogengass (N_2), for at verken loaden eller prøvene skal begynne å koke selv om temperaturen er over kokepunktet. Lik temperatur og trykk i alle prøvene, gir god presisjon. Svovelsyre (H_2SO_4) tilsettes for å hindre vannet i å miste sin polare egenskap når temperaturen økes til over 100°C (vanddamp), og for å øke konsentrasjoner av ioner i løsningen. H_2O_2 blir tilsatt for å oksidere de nitrøse gassene, NO_x (som er NO eller NO_2) til nitrat (NO_3^-). NO_x øker trykket i beholderen, og i tillegg korroderer gassene instrumentet. En temperatursensor i ultraclaven overvåker at temperaturen i loaden stemmer med den i programmet som er valgt (Jensen 2011).

Det er temperaturen som gjør at prøvene dekomponeres, men trykket som gjør at temperaturen kan bli så høy.



Figur 2.6: Den røde linjen i figuren viser temperatur i loaden over tid, den blå angir trykk, og den grønne gir effekt (W). Disse parameterne styres av et forhåndsprogrammert dataprogram.

2.10.3 Microbølgeteknikken

Mikrobølger er langbølgede elektromagnetiske stråler, som får vannmolekyler til å bevege på seg og varmer opp loaden som prøvene står i. Et magnetfelt som veksler på å avgi positiv og negativ ladning, fører til at vannmolekylene roterer for å orientere seg etter ladningen, dette kalles dipolrotasjon. Vannmolekylene har også ionisk migrasjon. Dipolrotasjon og den ioniske migrasjonen skaper friksjon og varme. Dette prinsippet gjelder også for andre polare molekyler (Jensen 2011).

2.11 ICP-OES

Løsningen introduseres som en aerosol til det induktivt koblede plasmaet (ICP) ved hjelp av et forstøvningskammer. Aerosolen transporteres deretter inn i senter av plasma, ved hjelp av en forstøvergass. Der skjer fordampning, atomisering, ionisering og eksitering av grunnstoffene (Boss & Freedon 1997). Et eksitert atom eller ion, har fått tilført ekstra energi, og er derfor ustabil. Dette fører til at energien vil bli sendt ut i form av lys eller et foton når atomet går tilbake til grunntilstand (de-eksiteres). Dette fotonet vil ha en karakteristisk bølgelengde for nettopp dette grunnstoffet, fordi energien i lyset tilsvarer energioverganger i orbitalene, og disse er forskjellige fra grunnstoff til grunnstoff (Lohne 2011) (Boss & Freedon 1997).

Perkin Elmer Optima 5300 DV kan måle lys emittert fra grunnstoff fra en prøve i plasma både radielt og aksielt, ved hjelp av noe som kalles et dual view system (DV). Lysintensiteten til en standard med kjent konsentrasjon blir sammenliknet med intensiteten til lyset fra prøven, og på den måten kan konsentrasjonen i prøven anslås. En aksiell avlesning vil gi en høyere intensitet, og derfor lavere deteksjonsgrenser (opp til 10 ganger lavere enn en radiell måling), men fordi lysveien til avlesningen går gjennom den kalde delen av plasma kan dette føre til en del interferenser. Eksempler er selvabsorpsjon og polyatomiske forbindelser. For å forhindre dette blåser trykkluft bort den kalde delen av plasma, slik at kun den varmere delen leses av. En radiell avlesning vil måle intensiteten i den varme delen av plasma, der plasma er mer stabilt og renere, og det vil gi det lengste lineære området. Men avlesning radielt vil ha en lavere sensitivitet enn en aksiell avlesning, som nevnt ovenfor (Lohne 2011)

2.11.1 Interferenser

Det finnes flere typer interferenser i ICP-OES, men spektralinterferenser er helt klart den viktigste bidragsyteren, og det finnes flere teknikker for å foreta korreksjoner etter hvor komplisert interferensen er. Spektralinterferenser skyldes delvis eller direkte overlapping av

andre grunnstoffs linjer med analyttens spektrallinje. Dette kan gi en forhøyet konsentrasjon av analytt. Den vanligste løsningen på slike problemer er å velge en annen bølgelengde eller spektrallinje uten interferenser å måle på. I denne metoden har både ettpunkts,- og topunkts-bakgrunnskorreksjon, samt Multicomponent spectral fitting (MSF) blitt foretatt, der ikke dette er mulig (Lohne 2011).

2.12 Statistikk

2.12.1 Enkle substitusjonsmetoder

Enkle substitusjonsmetoder, er vanlig praksis å benytte i miljøvitenskaplige studier/miljøkjemi, hvor ”mindre enn”-verdier substitueres med en fraksjon av den rapporterte grensen. I vannkjemi er det mest vanlig å bruke halvparten av den respektive verdien, altså LOD/2 eller LOQ/2. Det er omdiskutert hvor bra denne metoden egentlig er, dersom dataene skal benyttes i statistiske analyser. Innsetting av verdier i datasett, som opprinnelig ikke er til stede, vil hindre reproducerbare data, samt det vil føre til at estimatene av blant annet standardavvik endres (Helsel 1990; Helsel 2006). Dersom dataene kun blir benyttet for å konstruere figurer, bør ikke dette ha noen stor betydning, og det vil uansett føre til større feil dersom verdier under kvantifikasjonsgrensen ble ekskludert eller satt lik null. Alternative metoder, som MLE, survival og reliability analysis, kan også benyttes i studier av miljøet/miljøvitenskap (Helsel 1990).

2.12.2 Boxplot

Et boksplokk viser distribusjonen av data på en annerledes, og muligens mer oversiktlig måte enn søylediagram med feilfelt kan få til. Den viser om dataene ligger høyt og lavt i forhold til medianen (Q_2). Mellomrommet mellom kvartilene i boksene kan være med å indikere grad av spredning av data, samt skjevheter i dataene. I tillegg detekteres uteliggere, og markeres med en stjerne *. Den øvre linjen i boksen angir en verdi 75% av dataene er lavere enn eller lik, og kalles også for tredje kvartil (Q_3). Den nedre linjen kalles for første kvartil (Q_1), og 25 % av dataene er mindre eller lik denne verdien. Nedre ”whisker” som stikker ut fra boksen er angitt som en og en halv ganger kvartilavstanden (interquartile range) IQR ($IQR = Q_3 - Q_1$) av det lavere kvartil. Det vil si $Q_1 - 1,5 (Q_3 - Q_1)$. Øvre ”whisker” som strekker seg opp fra det øvre kvartil/toppen av boksen strekker seg helt til 1,5 ganger kvartilavstanden, fra det øvre kvartilet (Q_3), det vil si $Q_3 + 1,5 (Q_3 - Q_1)$ (Minitab 15 2012).

2.12.3 Regresjonsanalyse

En regresjonsanalyse benyttes for å undersøke sammenhengen mellom flere variabler. En ser ikke bare på om det er en sammenheng mellom variablene (som ved en korrelasjonsanalyse), men hvilken sammenheng det er mellom dem. En ønsker å finne den beste (estimerte) linjen til dataene. Det skilles mellom lineær og ”ikke-lineær” regresjon. En lineær regresjon er en rettlinjett sammenheng mellom to variabler.

$$Y_i = \beta_0 + \beta X_i + e_i$$

β_0 er en konstant som sier noe om hvor skjæringspunktet med x-aksen er, mens β er stigningstallet som beskriver gjennomsnittlig forandring av Y, når x endres. Feilledet, e_i , eller residualen er en tilfeldig (stokastisk) variabel, som forstyrrer den lineære sammenhengen.

I ikke-lineær regresjon, så kan funksjonen som data modelleres etter være for eksempel eksponentiell eller logaritmisk (Løvås 2004).

Multipel lineær regresjon

Dersom det finnes flere forklaringsvariabler i et forsøk/en gitt situasjon, så kan multipel lineær regresjon benyttes. En forklaringsvariabel forårsaker endringer i responsvariabelen, og responsvariabelen måler utfallet av en studie. Likningen fra lineær regresjon blir bare utvidet til å inneholde flere beta-er, som skal estimeres ut fra datasettet, samt flere X-er som står for forklaringsvariablene vist under.

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_i + \beta_2 X_i + \beta_3 X_i + e_i.$$

Slik regresjon som dette kan også være ikke-lineær (som foreksempel polynomisk regresjon) (Løvås 2004).

3.0 Eksperimentelt

3.1 Forbehandling av aske

Asken fra Grimsvotn ble samlet inn den 30. mai 2011, ca en uke etter utbruddet, av Adam Durant fra NILU. Koordinatene for innsamlingen var N64 22.603' W017 41.201', og dette var på isbreen, ca 20 km fra selve vulkanen. Temperaturen var under frysepunktet, og asken ble ikke utsatt for noe nedbør før den ble pakket inn i gjennomsiktige plastposer. Asken ble samlet fra isbreen, og det var fuktig, så det ble derfor spredd ut på store trebrett dekket med gråpapir, med den blanke siden opp. Deretter ble asken satt til tørking i tørkeskap (CTC

Wasacator, Nimo verken AB, Sverige) på 60 °C i 48 timer. Deretter ble den tørre asken siktet gjennom en Test siev retsch (5657 Haan, W. Germany) med vidde 2,00 mm og firkanta hull (diameter > 2,00 mm målt diagonalt), for å sikre homogenitet i materialet.

3.1.1 Sikting av aske

Asken ble siktet gjennom sikter med vidder på henholdsvis 1000, 600, 212, 90 og 63 µm. Det ble laget et tårn av siktene som ble plassert på en automatisk ristemaskin (Retsch). Siktene ble før bruk rensed ved hjelp av trykkluft og ultralydbad (Haver og Boecher, Haver USC 200T) i 15 minutter, for å fjerne rester av gammelt materiale. De ulike fraksjonene av asken ble overført til rene plastbeholdere, ved hjelp av en trakt.

3.2 Sekvensiell ekstraksjon

3.2.1 Forbehandling av sjøvann

Sjøvann ble hentet i Drøbak i en ren 10 liters plastdunk. Vannet ble pumpet opp fra 60 meters dyp ved hjelp av en pumpe fra Drøbak Aquarie. Deretter ble sjøvannet filtrert gjennom et 0.45 µm membran-filter (Millipore) ved hjelp av en sugokolbe, en vannstrålepumpe og en filteroppsats, og overført til en ny ren (syrevasket) 10 liters dunk.

3.2.2 Måling av pH

Før den sekvensielle ekstraksjonen ble pH i asken bestemt ved oppslemming i milliQ-vann. 10 ml siktet aske (<2 mm) ble målt opp i 5 sentrifugerør. Disse ble deretter tilsatt 25 ml milliQ-vann. Prøvene ble ristet opp, til asken var godt blandet med vannet, og prøvene ble stående til neste dag. Prøvene ble ristet opp igjen, og ble stående i 15 minutter minimum før pH ble målt (pH/Cond 340i/SET, WTW Wissenschaftlich Technische Werkstätten) (Krogstad 2009). pH i trinn 2 (se tabell 3.1) skal kun justeres dersom pH er lavere enn 7.

3.2.3 Sekvensiellekstraksjons-prosedyre

Aske mindre enn 2 mm i diameter, praktisk talt usiktet aske, ble benyttet til dette forsøket. Det ble veid inn 4 parallelle prøver med aske á ca 2 gram, i syrevaskede sentrifugerør (Oak Ridge sentrifugerør, Nalgene) på 50 ml. Det ble også tatt med 4 sentrifugerør som blank-prøver. Disse følger hele prosedyren.

Den sekvensielle ekstraksjonen ble utført etter en metode fra Oughton og Lind (2012), og oppsettet er vist i tabell 3.1 under. Alle kjemikalier benyttet er av p.a (pro-analysi) kvalitet, og alt vann benyttet er fremstilt ved omvendt osmose, og filtrert gjennom MilliQ-anlegget.

Tabell 3.1: I tabellen fremstilles prosedyren benyttet under den sekvensielle ekstraksjonen.

Fraksjon	Trinn	Metodebeskrivelse og reagenser
I	1	20 ml filtrert sjøvann ble tilsatt til hvert sentrifugerør. Innholdet i rørene ble blandet godt før de ble lagt på rullebord (RMS Assistent 348) i romtemperatur i 1 time.
	2	Prøvene ble deretter sentrifugert (Allegra™ 64R Centrifuge, Beckman Coulter) på 10000 g i 25 minutter ved 15 °C, før supernatanten ble pipettert over i en filtertrakt med blått bånd filter (S&S rundfilter, askefritt, Ø 110mm). Filtratet ble samlet i sentrifugerør på 50 ml (Saarstedt).
II	3	Prøvene ble tilsatt 20 ml 1M CH ₃ COONH ₄ (pH 7), ristet opp og deretter satt på rullebord i 2 timer.
	4	Trinn 2 gjentas
III	5	20 ml 1M CH ₃ COONH ₄ (pH 5) ble tilsatt prøvene, som ble blandet godt før de ble satt på rullebord i 2 timer.
	6	Trinn 2 gjentas
	7	Prøvene ble tilsatt 10 ml milliQ-vann, blandet opp og sentrifugert i 15 minutter, før supernatanten ble pipettert av og overført til filtertrakten. Filtratet ble samlet i sentrifugerør på 50 ml.
IV	8	20 ml 0,04 M NH ₂ OH·HCl (pH 3) i 25 % (v/v) CH ₃ COOH ble tilsatt prøvene, det ble blandet godt, og plassert i vannbad i 6 timer ved 80 °C (Julabo, SW 22). Ristingen på vannbadet ble satt på maks, og dette var 99 min ⁻¹ .
	9	Trinn 2 og 7 gjentas
V	10	Prøvene ble tilsatt 1 ml ad gangen av 30% H ₂ O ₂ løsningen (justert til pH 2 vha 3M HNO ₃), til 15 ml var tilsatt. Prøvene ble blandet forsiktig, før de ble satt på vannbad ved 80 °C i 5,5 time. Korkene på sentrifugerørne var skrudd løst til i tilfelle eksoterm reaksjon
	11	Prøvene ble så tilsatt 5 ml 3,2 M CH ₃ COONH ₄ i 20 % (V/V) HNO ₃ . Dette ble blandet godt, og prøvene ble satt på rullebord i 0,5 time.
	12	Trinn 2 og 7 gjentas
VI	13	20 ml 7M HNO ₃ ble tilsatt prøvene, og blandet godt før prøvene ble satt på vannbad ved 80 °C i 6 timer. Prøvene ble virvlet opp i intervaller på ca ½ time
	14	Trinn 2 og 7 gjentas

Filtratet fra hver fraksjon (I-VI) er samlet i hvert sitt sentrifugerør, Som vist i figur 3.1.

Overlapping mellom de ulike ekstraksjonsfraksjonene kan forekomme, da det ikke alltid finnes noe klart skille mellom fraksjonene. Hovedsaklig regnes fordelingen å følge dette oppsettet, hvor fraksjon fra tabell 3.1 er gjengitt her, med tilsvarende fordeling. Grunnstoffene det er snakk om at løses ut i hver fraksjon er:

I: Vannløselige grunnstoff adsorbent til overflaten av asken/lett ekstraherbare grunnstoff

II: Reversibelt bundet grunnstoff/utbyttbar fraksjon

III: Grunnstoff reversibelt bundet til asken, eller bundet til karbonater, dersom verdien for denne fraksjonen er høyere enn forgående fraksjon

IV: Grunnstoff bundet til lett reduserbart materiale som Fe og Mn oksider

V: Grunnstoff bundet til oksiderbare komponenter som organisk materiale

VI: Grunnstoff som er løselig i sterkt oksiderende syre (restfraksjon) (Grunnstoff sterkt bundet til oksiderbare komponenter)



Figur 3.1: Figuren viser hvordan oppsettet for den sekvensielle ekstraksjonen så ut. For hver fraksjon ble supernatanten overført til plasttraktene, med filter i, og filtrert ned i hver sine sentrifugerør.

3.2.4 Måling på ICP-OES

Før målingen på ICP-OES ble foretatt, ble fraksjon VI fortynnet 5 ganger, fraksjon IV ble fortynnet 2,5 ganger, og tilsatt 69 % (W/W) salpetersyre (HNO_3) til en konsentrasjon på 5%. Resten av løsningene, det vil si fraksjon I,II, III og V, ble syrekonservert med HNO_3 til 10 %,

og deretter ble fraksjon I fortynnet fem ganger på grunn av den høye saltkonsentrasjonen. Prøvene ble syrekonservert for å holde komponentene i løsning, og de ble fortynnet med milliq-vann.

Selve analysen med preparasjon av standarder og ulike matriser, ble foretatt av avdelingsingeniør Solfrid Lohne.

3.3 Analyse av ulike askefraksjoner

Sikting av aske ble foretatt (se forbehandling, avsnitt 3.1.1).

3.3.1 Dekomponering

Det ble veid inn mellom 0,2 og 0,25 gram med prøvemateriale, det vil si aske med ulike størrelsesfraksjoner i rene teflonrør. Tre paralleller ble veid ut av henholdsvis 0-63, 63-90, 90-212, 212-600, 600-1000 og 1000-2000 μm , og nøyaktig vekt av alle prøvene ble notert ned. I de påfølgende teflonrørene, ble det veid inn sertifisert referansemateriale, SRM1646 Estuarine Sediment (National Bureau of Standards 1982) og 2709a San Joaquin Soil (National Institute of Standards and Technology 2009). Tre teflonrør ble også tatt med som blankprøver. Til slutt ble det veid inn tre paralleller ekstra med størrelsesfraksjonen 212-600 μm og tre ekstra teflonrør ble tatt med som blank, fordi ulike ekstraksjonsmidler ble benyttet. Til de første (23) prøvene ble det tilsatt 5 ml konsentrert salpetersyre (69 % (W/W), før korkene ble satt på.

Til de ekstra 3 rørene med aske, samt de tre påfølgende "blank-rørene" ble det tilsatt 1 ml 40 % p.a-kvalitet flussyre (MERCK), og 5 ml HNO_3 . Deretter ble korkene satt på, før prøvene ble plassert over i 40 posisjonskarusellen som ble satt på Milestone Ultraclave® for dekomponering.

Loaden til ultraclaven ble tilsatt 320 ml destillert vann, 2-3 ml H_2SO_4 [Teknisk-kvalitet] og cirka 30 ml hydrogenperoksid [H_2O_2 PA-kvalitet]. Temperaturen under dekomponeringen kom opp i cirka 260 grader (og hele prosessen varte i et par timer). Etter dekomponeringen ble prøvene overført til nye 50 ml sentrifugerør ved å skylle ut av korken og selve beholderen 3 ganger med milliq-vann. Deretter ble det fylt opp med milliq-vann til totalt 50 ml løsning.

Prøvene med flussyre ble behandlet på en litt annen måte. Her ble 6 ml mettet borsyre (H_3BO_4) tilsatt i sentrifugerørene, før prøven ble overført. Deretter ble det fylt opp med milliq-vann til 50 ml.

3.3.2 Preparering av standarder

Prepareringen av standarder til analysen på ICP-OES ble foretatt, som beskrevet under. Ulike standarder ble preparert for analysen av prøvene dekomponert med HNO₃, i forhold til prøvene dekomponert med HF og HNO₃.

Tabell 3.2: Tabellen viser en oversikt over konsentrasjon av kalibreringsløsningene (standardene) benyttet for analysen på ICP-OES. Syrematriks A består av 10 ml HNO₃, og syrematriks B består av 10 ml matriks, som igjen består av 2 % HF, 10 % HNO₃, 120 ml mettet H₃BO₃ (Produsent: K.A. Jensen), og 9 ml HNO₃ for å oppnå lik matriks som prøvene. Minimum renhet på stamløsninene (spectrascan) er analysekvalitet (p.a.), de sertifiserte løsningene er markert med *.

Grunnstoff	Konsentrasjon stamløsning (mg/l)	Konsentrasjon (mg/l) I syrematriks A			Konsentrasjon (mg/l) I syrematriks B		
		Standard nr			Standard nr		
		1	2	3	1	2	3
*Fosfor, P	10000 ± 30	25		2,5	25		2,5
Natrium, Na	1000	10		1,0	10		1,0
*Sink, Zn	1000 ± 2	2,5		0,25	2,5		0,25
Mangan, Mn	1000	2,5		0,25	2,5		0,25
*Kalsium, Ca	10000 ± 2	200		20,0	25		2,5
*Silisium, Si	1001 ± 4	10		1,0	50		5,0
*Kalium, K	10039 ± 51	200		20,0	25		2,5
Magnesium, Mg	1000	10		1,0	10		1,0
*Jern, Fe	1000 ± 3	10		1,0	50		5,0
*Aluminium, Al	1006 ± 3	2,5		0,25	10		1,0
*Kobber, Cu	1001 ± 3		0,5	0,05		0,5	0,05
*Kobolt, Co	1003 ± 2		0,5	0,05		0,5	0,05

3.3.3 Måling på ICP-OES

En forhåndsutviklet metode ble benyttet, for måling av grunnstoffene gitt i tabell 3.2. Ikke alle disse grunnstoffene har potensiale til å virke begrensende på vekst av alger i saltvann (som vist i teorien), derfor er ikke alle resultatene fra analysen er tatt med i resultatdelen.

Analysen videre ble foretatt av avdelingsingeniør Solfrid Lohne.

3.4 Knusing av prøver og CHN-analyse

De siktede fraksjonene av aske-prøvene ble merket med nummer 1-7, etter økende størrelsesfraksjon (0-63, 63-90, 90-212, 212-600, 600-1000, 1000-2000 og <2000 μm). Prøvene ble blandet/homogenisert med skje under avtrekk, før et par skjeer av materialet, som var grovkornet og trengte å knuses (nr. 4-7), ble tilsatt i agat-morteren (Retsch RM200). Knusetiden ble satt til 4 minutter, og da prøven var ferdig knust ble skjeen tørket av med et papir før den ble benyttet for å overføre prøvematerialet til merkede papirposer. Agatmorteren ble så rengjort ved hjelp av en støvsuger (Nilfisk GS90) og en malerkost, før den ble tørket av med papir for å forsikre at den var ren. Prøvene ble deretter satt til tørking i to døgn på 55 °C, før analyse på Leco CHN 1000. Det ble veid ut ca 200 g av hver fraksjon aske i tinnkapsler. Disse ble forbrent ved 1050 °C, og analysert ved hjelp av en IR og TC-celle, for henholdsvis total karbon og nitrogen av avdelingsingeniør Irene E. Eriksen Dahl.

3.5 Scanning Electron Microscope (SEM) og sputter coater

Litt aske fra hver askefraksjon (<63 μm , <2mm) ble helt ut i hver sin petriskål. Deretter ble dobbeltsidig karbontape (Ted pella, INC) festet på SEM-stubber, som ble stemplet forsiktig ned på prøvematerialet, slik at det festet seg. Deretter ble et lag ("coating") bestående av gull og palladium lagt på ved hjelp av en Sputter Coater Polaron SC 7640 (Quorum Technologies Ltd, UK) for å hindre ladning og forsterke signalet. Deretter ble prøven sett på i SEM Zeiss EVO - 50 – EP (Carl Zeiss SMT Ltd, Camebridge (CB13JS), UK), og bilder ble tatt i SEI (Secondary electron imaging) modus, ved ulike forstørrelser, og av partikler med ulik morfologi. Overflatekomposisjonen til partiklene ble også undersøkt, ved bruk av BEI (backscattered electron imaging)-modus og røntgen mikroanalyse. Røntgen mikroanalyse benyttes for å bestemme sammensetningen av ulike grunnstoff i prøven. For analysen i BEI-modus ble prøvene preparert som ovenfor, men ikke coatet. Analysene ble foretatt av avdelingsingeniør Elin Ørmen.

3.6 Algeforsøk

3.6.1 Forbredelser

Sterilbenken (MEDINOR AS) ble satt på en halv time før start av forsøket, og før hver prøvetaking, og den ble grundig spritert med 70 % etanol. Det er spesielt viktig med sterile betingelser både når medie lages, og når stamkulturløsning skal overføres, for at ikke forurensninger skal komme med som kan ødelegge forsøket.

Det ble jobbet rent med kontinuerlig avbrenning av rør og kolber under prepareringen av mediet. Vitaminene som benyttes i mediet er på forhånd sterilfiltrert, og både medium og glassutstyr har blitt autoklavert (Gettinge GEL 2606 EC-1, Getinge AB, Sverige).

Medium benyttet under forsøket er f/2 (eller f/2 *10), dette prepareres ved hjelp av følgende løsninger gitt i tabell 3.3, og pH-en i mediet ble målt, og eventuelt justert til ca 7,6. For å fremstille mediet f/2 * 10, ble ti ganger så mye av natriumnitrat (NaNO₃) og natriumdihydrogenfosfat (NaH₂PO₄·H₂O) tilsatt.

Tabell 3.3: Tabellen viser en oversikt over innholdsstoffene i medium, samt konsentrasjon av disse, modifisert etter (Culture Collection of Algae and Protozoa 2002).

	f/2 – Medium	Konsentrasjon (g/L)
Vitaminer	Cyanocobalamin (Vitamin B ₁₂)	0,0005
	Thiamin hydroklorid (Vitamin B ₁)	0,1
	Biotin	0,0005
Spormetaller	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	4,16
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	3,15
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,01
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,022
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,01
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,18
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,006
	NaNO ₃	0,075
	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,00565

Til dette tilsettes 800 ml sjøvann, og 196,5 ml milliq-vann, til 1 liter løsning.

3.6.2 Oppstart

For å sette i gang algekulturen ble først erlenmeyerkolben med medium brent av ved hjelp av en gassbrenner (IBS, integra biosciences, fireboy plus), før medie ble helt over i et rent autoklavert algerør. Deretter ble kolben med medie og algerøret tilsatt medie brent av, før den sterile stamkulturen av *Tetraselmis suecica* (navn på strain) CCAP 66/14 samt (al-)folien som dekket den ble brent av. Det ble brukt en steril pipette, og alger fra stamkulturen ble tilsatt mediet til passende grønnfarge ble oppnådd. Dette er subjektivt, men fargen bør være lysegrønn, som vist i figur 3.2. Deretter blir den sterile stamkulturen, og algerøret brent av igjen, og hendholdsvis aluminiumsfolie (brent av) og en spesialdesignet kork med slange med

luftfilter og glassrør for luft-gjennomstrømning i kulturene ble satt på. Slangene med luftfilter ble lagt i mikrobølgeovnen (KENWOOD) i 3-4 minutter på maks effekt før de ble benyttet (for å drepe eventuelle bakterier og-/eller mikroorganismer).

Alt utstyret benyttet til algeforsøket, fra slanger til korker, og oppsats/stativ, forøvrig vist i figur 3.2, er spesiallaget og hånddreid. Alt sjøvann benyttet i forsøket er på forhånd filtrert gjennom et 1,2 µm glassmicrofiberfilter (VWR), autoklavert og pH-justert.

I de ulike forsøkene som følger, ble det benyttet ulike fremgangsmåter og innfallsvinkler, som beskrevet i tabell 3.4 under.

Tabell 3.4: Tabellen beskriver hva som er målet med hvert alge-forsøk, nummerert som 1, 2 og 3. Mengden av de ulike askefraksjonene tilsatt er ikke tatt med.

Forsøk nr	Beskrivelse/mål med forsøket
1	Innledende forsøk, for å undersøke om en direkte tilsetning av askefraksjonen <63 µm til alger i saltvann vil kunne gi en økning i biomasse, i forhold til en like stor konsentrasjon av alger dyrket i rent saltvann.
2	Ulike mengder aske (<63 µm) ble tilsatt direkte til alger grodd i medie, for å undersøke om mulig asken, og den reduserte tilgangen på lys kan føre til at algene gror saktere, i forhold til samme mengde alger i medie uten aske.
3	Aske (<2 mm) ble tilsatt indirekte (se ordforklaring) til saltvannet, for å undersøke om dette kan påvirke veksten i positiv retning i forhold til kontrollprøven (med kun alge og saltvann)
4	En større mengde aske av de to ulike størrelsesfraksjonene (<63 µm og < 2 mm) ble tilsatt indirekte for å undersøke om dette vil føre til økt konsentrasjon av næringsstoffer, og dermed økt vekst.



Figur 3.2: Bildet viser arbeidet i sterilbenken, hvor både algerør, gassbrenner, og erlenmeyerkolbe med alger og saltvann er vist fra forsøk 1. Algerørne vist i dette bildet er ferdigsammensatte, og autoklaverte, men de mangler slangen med filter på, samt slangeklemme. Dette ble satt på etter at løsningen var overført til rørene.

3.6.3 Forsøk 1

Det ble benyttet 9 algerør, romtemperatur, og 2 akvarier fylt med vann, for å oppnå minst mulig temperatursvingninger (da vann har en høy varmekapasitet). Til disse rørene ble det nødvendig med ca 3 liter saltvann, da hvert rør rommer omtrent 330 ml løsning. Arbeidet foregikk i sterilbenken (figur 3.2), og for å oppnå en lik konsentrasjon av alger i alle algerørene ble den oppkonsentrerte algeløsningen tilsatt i en erlenmeyerkolbe (VWR) som rommet 3 liter, som på forhånd var fylt opp med saltvannet. Dette ble blandet kontinuerlig, for å sikre en homogen fordeling av alger, og en autoklavert målesylinder ble benyttet for å sikre et likt volum i hvert algerør. Både målesylinderen, erlenmeyerkolben, og algerørne ble brent av underveis (før og etter hver tilsetning). Det ble veid inn 6 parallelle prøver på ca 0,8 gram aske (på Mettler AE 50) $<63 \mu\text{m}$ i størrelse i små begerglass (Dette tilsvarer et 1:400 forhold mellom aske og vann som forklart i Duggen et al. (2007)). Disse ble igjen overført til henholdsvis algerør 1-6, mens algerør 7-9 ble beholdt som kontroll/blank-prøver.

Det ble tatt stikkprøver av to ulike algerør på forsøkets første dag, ett tilsatt aske og en kontroll, og turbiditeten ble målt ved hjelp av HI93703 Portable Microprocessor Turbidity Meter (HANNA instruments). Det ble også tatt tørrvekt av prøvene, før lugol (produsert i 2005 på SKP) ble tilsatt i resterende løsninger for å drepe algene.

3.6.4 Forsøk 2

I dette forsøket ble algene dyrket i f/2*10 medie, og til algerør 1-3 ble det tilsatt 0,8 g aske, til algerør 4-6 ble det tilsatt 1,6 g aske, og rør 7-9 var kontroll-rør (uten tilsatt aske). Det ble tatt ut ca 40 ml alge fra den konsentrerte kulturen, og tilsatt mediet (cirka 3 liter medie) for en homogen blanding. Deretter ble dette overført til algerør, som i forrige forsøk, før den oppveide asken ble tilsatt. Størrelsesfraksjonen aske som benyttet var her også den minste fraksjonen, mindre enn 63 µm. På forsøkets første dag ble det tatt en stikkprøve av en av hver av de parallelle prøvene (kontroll og tilsatt 0,8 og 1,6 g aske), og det ble målt pH, turbiditet og salinitet. Det ble også tatt tre paralleller av tørrvekt fra en av hver av de parallelle prøvene innenfor hver gruppe (prøve 1-3, 4-6 og 7-9), samt en tørrvektsprøve fra de resterende to prøvene i en gruppe.

3.6.5 Forsøk 3

To liter sjøvann ble benyttet, hvorav den ene literen sjøvann ble tilsatt cirka nøyaktig 2,5 g av aske-fraksjonen <2mm (for nøyaktig innvekt, se vedlegg 5). Asken ble blandet godt med sjøvannet, før beholderen fikk stå i ro i ca 30 minutter, slik at asken kunne sedimentere. Deretter ble sjøvannet forsiktig helt av i en ren erlenmeyerkolbe, slik at asken ble igjen i beholderen. Dette ble foretatt fordi de fleste næringsstoffene, som nevnt i teorien, vil være løst ut på denne tiden. Det er dessuten også omtrent den tiden det tar for asken å bevege seg gjennom sonen for vekst. Dette sjøvannet, samt den andre literen med sjøvann ble hver tilsatt nøyaktig 10 ml alger fra den konsentrerte algekulturen, før hver beholder ble blandet godt og fordelt i hver sine 3 algerør ved hjelp av en målesylinder og en steril arbeidsmetode (som beskrevet ovenfor).

3.6.6 Forsøk 4

I overkant av 3 liter sjøvann ble blandet sammen i en erlenmeyerkolbe, for å sikre et likt utgangspunkt. Deretter ble 1 og 1 liter ført tilbake på 1-liters flasker. To av disse flaskene ble tilsatt omtrent nøyaktig 25 gram aske (for nøyaktig innvekt, se vedlegg 5) på henholdsvis <63 µm og <2mm. Innholdet ble blandet godt, før flaskene fikk stå i ro i 30 minutter, for at asken skulle sedimentere. Da 30 minutter hadde gått, var det forholdsvis enkelt å helle av sjøvannet fra den store fraksjonen aske, uten å få med noe av asken, mens for flasken tilsatt asken på <63µm var dette noe verre. Sjøvannet var lyse-grått i fargen, og det var tydelig at flere av de minste partiklene ikke hadde rullet og sedimentert. Men for å sikre like forhold (med hensyn på tiden, og det forrige forsøket) ble sjøvannet helt forsiktig av.

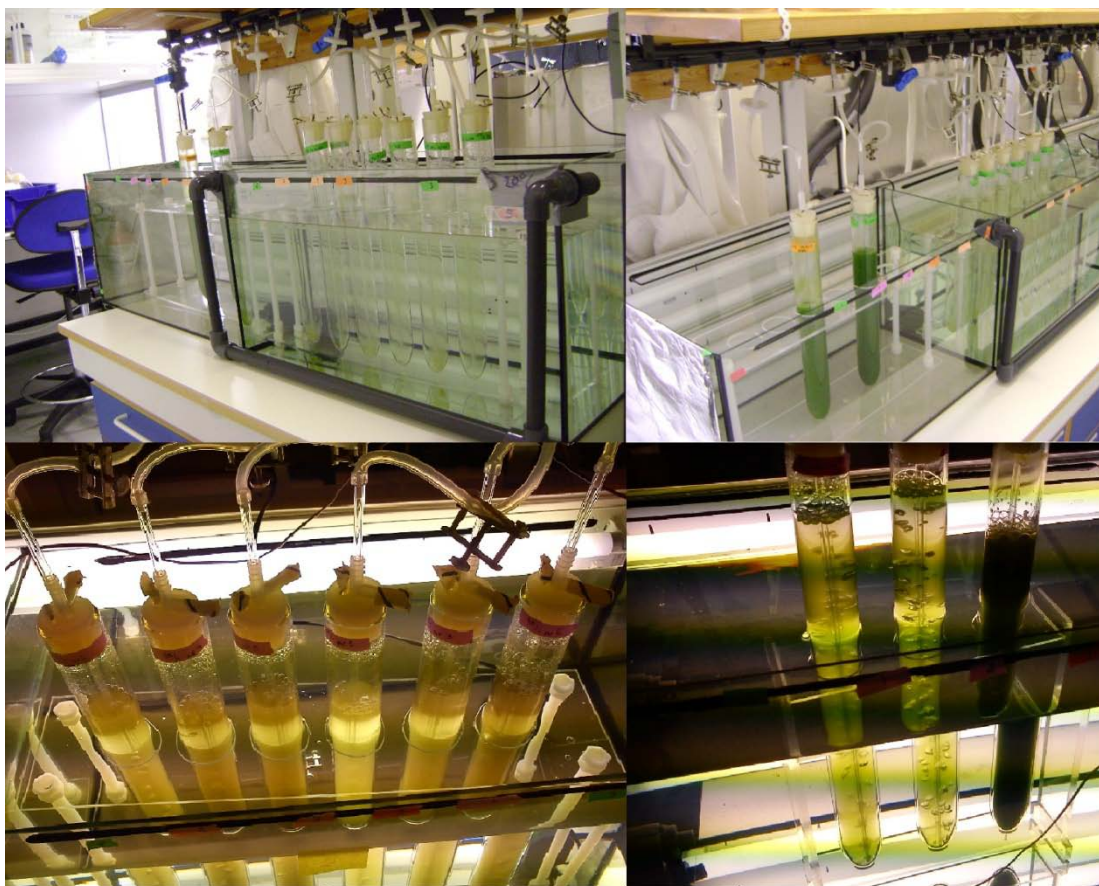
Til slutt ble hver av de tre literne med sjøvann tilsatt 25 ml algekultur, før hver liter ble fordelt i sine tre algerør.

3.6.7 Generelt for alle forsøkene

Algerørene ble satt i akvarium fylt med romtemperert vann, med lysrør bak, og koblet til luftinntak med 1 % CO₂, som vist i figur 3.3. Boblingen ble innstilt ved å justere åpninger i slangene ved hjelp av slangeklemmer. Hver dag ble temperaturen målt, og CO₂ tilgangen ble overvåket og justert til ca 1 %.

Prøver ble tatt hver dag med samme fremgangsmåte, og både pH, salinitet, turbiditet (FTU) ble målt, og tørrveksprøver ble preparert, før resten av prøveløsningene ble tilsatt lugol, for å drepe cellene, slik at de kunne oppbevares for telling i mikroskop.

Først ble prøverør merket, deretter ble ett algerør valgt ut og boblet godt opp for å få en så homogen løsning som mulig. Deretter ble boblingen skrudd igjen, og slangen tatt av luftinnstrømmingen, for at algerøret skal kunne forflyttes til sterilbenken. Her ble korken fjernet, og algerøret brent av før en steril pipettespiss (VWR) og Integra pipetboy ble benyttet til å ta ut litt over 10 ml prøve, og overføre det til et sentrifugerør/prøverør. Prøven ble tatt så raskt som mulig etter oppbobling, for å hindre at eventuell aske og alger skulle synke og gi en ujevn fordeling av prøven. Deretter ble algerøret brent av igjen, og korken trykket ned igjen/festet og røret ble satt tilbake i akvariumet, og koblet til slangen med tilførsel av CO₂.



Figur 3.7: Figuren viser oppsett av algerør i akvarier. I bildene øverst vises koblingene til luftinntaket, samt filterne som filtrerer den innkommende luften, og slangeklemmene som ble benyttet for å justere boblingen i rørne. I bildet nederst til høyre vises boblingen tydelig. Fargeforskjellen fra utgangskulturen, til algerørne i forsøksoppsettet på bildet øverst til høyre kommer også tydelig frem.

3.6.8 Tørrvekt

For tørrvektsmålingene ble filterne (Whatman GF/F 25mm Ø circles) vasket i milliQ-vann (dyppet 2 ganger ved hjelp av en pinsett i 2 ulike rene beholdere med milliQ-vann) og plassert i petriskåler med aluminiumsfolie, før de ble tørket i tørkeskap Plus II Incubator (GALLENKAMP) på 95 °C over natten. Deretter ble de plassert i en NALGENE eksikator, før de ble overført til nye, små petriskåler merket med teip, nummer og A, B og C se illustrasjon (figur 3.4). Filtrene ble veid (mettler toledo Excellence Plus (XP6)) med en gang de ble tatt ut av eksikatoren for å hindre at fuktighet fra luften absorberes og endrer vekten. Etter dette behøver ikke filterne å ligge i eksikator før de skal påføres alger. For å påføre algeløsningen til filterne ble en vaakumpumpe (KnF lab, laboport, NORPRENE®), en sugokolbe (SCHOTT DURAN 500 ml) og en filteroppsats (Sartorius) benyttet. Algeprøven ble blandet godt før uttak, for å sikre homogenitet i prøvetakingen. For å oppnå en jevn fordeling av alger over filteret ble 10 ml milliQ-vann tilsatt først, deretter et passende antall ml

av algekulturen avhengig av tykkelse (alt fra 0,3-3 ml ble benyttet), fordi tykke kulturer lett vil tette igjen filteret. Deretter ble 30 ml milliQ-vann tilsatt som vask, for å vaske ut salter og lignende som ellers ville kunne bidra til økt vekt. Etter at filtrene var ferdigpreparerte ble de lagt tilbake igjen i sine respektive petriskåler, og de ble satt til tørking over natten. Dagen etter ble de lagt over i en eksikator igjen, før de ble veid på samme vekt som før (Mettler Toledo Excellence Plus (XP6) (Mettler Toledo)). For utregning av tørrvekt (likning 1.1) ble vekten før tilsetning av alger trukket fra vekten etter tilsetningen, og deretter ble dette delt på antall milliliter algekultur tilsatt, noe som gjør at resultatet ble oppgitt som alger i mg/ml.

(1.1)

$$\frac{\text{vekt filter med alger} - \text{vekt filter}}{\text{ant.ml algeløsning}} = \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$



Figur 3.4: Her ligger filtrene i eksikatoren, i hver sine petriskåler, for å hindre at fuktighet fra luften absorberes og endrer vekten på filtrene, etter at de har blitt tørket i tørkeskapet. Filtrene ligger i hver sine merkede petriskåler for at en skal kunne skille de fra hverandre, for hvert filter har ulik vekt.

3.6.9 Turbiditet

Før turbiditet ble målt, ble prøvene blandet godt og helt over i en kyvette. Korken skrus på og beholderen plasseres i turbiditets-måleren. Etter målingen helles algekulturen tilbake til prøverøret, og glassbeholderen skylles godt med milliQ-vann og tørkes av dersom glasset er tilsmusset.

3.6.10 Celletelling

Celletelling ble foretatt ved hjelp av et Fuchs-Rosenthal tellekammer (Assistent/VWR), et lysmikroskop (Leitz Aristoplan) og en pipette. Prøvene ble blandet og en dråpe ble tilført på

begge sider av tellekammeret. Væsken fikk synke litt før tellingen startet. Det ble både benyttet 16 og 25 og 40 ganger forstørrelse, alt ettersom hvor tydelige algene fremstod, og hvor mye aske som eventuelt var til stede i prøven. Asken gjorde det vanskeligere å telle, så da ble ofte en høyere forstørrelse benyttet.

Dybden av kammeret er 0,200 mm, og på hver side av tellekammeret er det merket opp rutenett med 16 store ruter, hver delt inn i 16 små ruter. Hver av de store kvadratene er på 1mm^2 , mens de små kvadratene har sideflater på 0,25mm (se figur 3.5). For å beregne volumet av en liten rute benyttes følgende likning

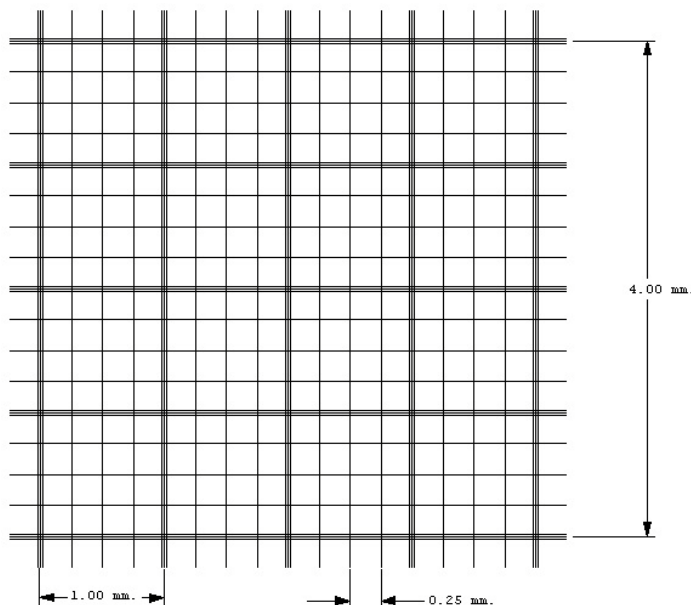
$$(1.1) \quad 0,25\text{mm} * 0,25\text{mm} * 0,2\text{mm} = 0,0125 \text{ mm}^3$$

Fordi å få celler per ml (1 ml er lik 1000 mm^3) ble mm^3 omgjort til antall milliliter:

$$(1.2) \quad \frac{0,0125}{1000} = 1,25 * 10^{-5} \text{ ml}$$

og for å finne ut hvor mange ruter som trengs for å romme 1 ml løsning deles 1ml på $1,25 * 10^{-5} \text{ ml}$, da får en 80000. Derfor blir likningen som følger:

$$(1.3) \quad \frac{\text{Celler}}{\text{ml}} = \frac{\text{ant.celler}}{\text{ant.ruter talt}} * 80000$$



Figur 3.8: Figuren viser rutenettet i et Fuchs-Rosenthal tellekammer (Hausser Scientific 2010)

3.6.11 Salinitet

Saliniteten i prøvene ble målt ved hjelp av et refraktometer (atago digital refractometer PR-100SA), som så oppgav salinitet i promille. Denne måler brytningsindeksen på vannet, og dette er et mål på vannets interaksjon med strålingen (Skoog et al. 2007b).

3.7 Statistikk

Bruken av statistikk i denne oppgaven er begrenset til t-tester med hensyn på tid og regresjonsanalyser, samt enkle substitusjonsmetoder, og boksplokk. Minitab er det statistiske programmet benyttet. Excel ble også benyttet til enklere analyser av data som gjennomsnitt, standardavvik utregning av deteksjon og kvantifikasjonsgrenser, samt konstruksjon av ulike figurer.

4.0 Resultat og diskusjon

4.1 Sekvensiell ekstraksjon

4.1.1 Presisjon, nøyaktighet, deteksjon- og kvantifikasjons-grenser

Presisjonen bestemmes av antall gjeldende siffer i standardavviket til analyseresultatene. Det er standardavviket, som sammen med andre begrensende faktorer som en innvekt med tre gjeldende siffer, som bestemmer antallet gjeldende siffer i gjennomsnittet av prøvene. Dersom gjennomsnittet får tre gjeldende siffer, indikerer dette god presisjon. De fleste prøvene, som er over deteksjon (LOD) og kvantifikasjonsgrensene (LOQ), se tabell 1 i vedlegg 1, har to til tre gjeldende siffer i gjennomsnittet. Dette tilsier at presisjonen i den sekvensielle ekstraksjonen er tilfredsstillende.

Det er visse forskjeller mellom presisjonen fra grunnstoff til grunnstoff, samt for de ulike fraksjonene ”innad i gruppen”. Analysen av kobolt for fraksjon IV-VI, gir to gjeldende siffer, mens analysen av kobber gir tre gjeldende siffer (for fraksjon II- VI). Ut fra dette kan en trekke slutningen at presisjonen i metoden for måling av kobber er bedre enn for målingen av kobolt, men begge målingene har allikevel en tilfredsstillende presisjon. For de andre grunnstoffene varierer presisjonen fra fraksjon til fraksjon, noe som er naturlig, da matriksene er ulike. Men presisjonen er jevnt over god i hele forsøket, (for hver fraksjon større enn LOQ).

Kobolt sine verdier kan ikke detekteres for de to første fraksjonene, og for den tredje fraksjonen kan verdien detekteres, men ikke kvantifiseres. Dette vil si at mengden kobolt som

løses ut i trinn 1-3 er svært lite og ikke er kvantifiserbart. Kobber derimot har kun en fraksjon som bare kan detekteres, og ikke kvantifiseres, og det er fraksjon 1. Det samme gjelder for jern. For sink og fosfor er ikke fraksjon 1 detekterbar, det samme gjelder fraksjon 2 for sink. Resten av fraksjonene for alle grunnstoffene er både detekter og kvantifiserbare.

I den sekvensielle ekstraksjonen er det ikke tatt med noe fullgodt mål på nøyaktigheten i metoden. Husstandarden 1643 h, sporbar til 1643 e, ble tatt med som en kontroll på kalibreringskurven, og resultatene av analysen kan benyttes som indikative resultater, men ikke som et fullverdig mål på nøyaktighet i metoden.

Tabell 4.5: Tabellen viser en oversikt over de sertifiserte verdiene til SRM 1643 e Trace elements in water, samt et gjennomsnitt av de målte verdiene for 1643 h (husstandarden). For Si og P er det ingen sertifisert verdi oppgitt i sertifikatet, så derfor er heller ikke analyseverdiene tatt med i tabellen.

Grunnstoff	Sertifisert verdi 1643 e	Målt verdi 1643 h (ICP-OES)
Cu	0,02276 ± 0,00031	0,0232 ± 0,00084
Mn	0,03897 ± 0,00045	0,039 ± 0,0010
Zn	0,0785 ± 0,0022	0,079 ± 0,0017
Co	0,02706 ± 0,00032	0,027 ± 0,0026
Fe	0,0981 ± 0,0014	0,106 ± 0,0061

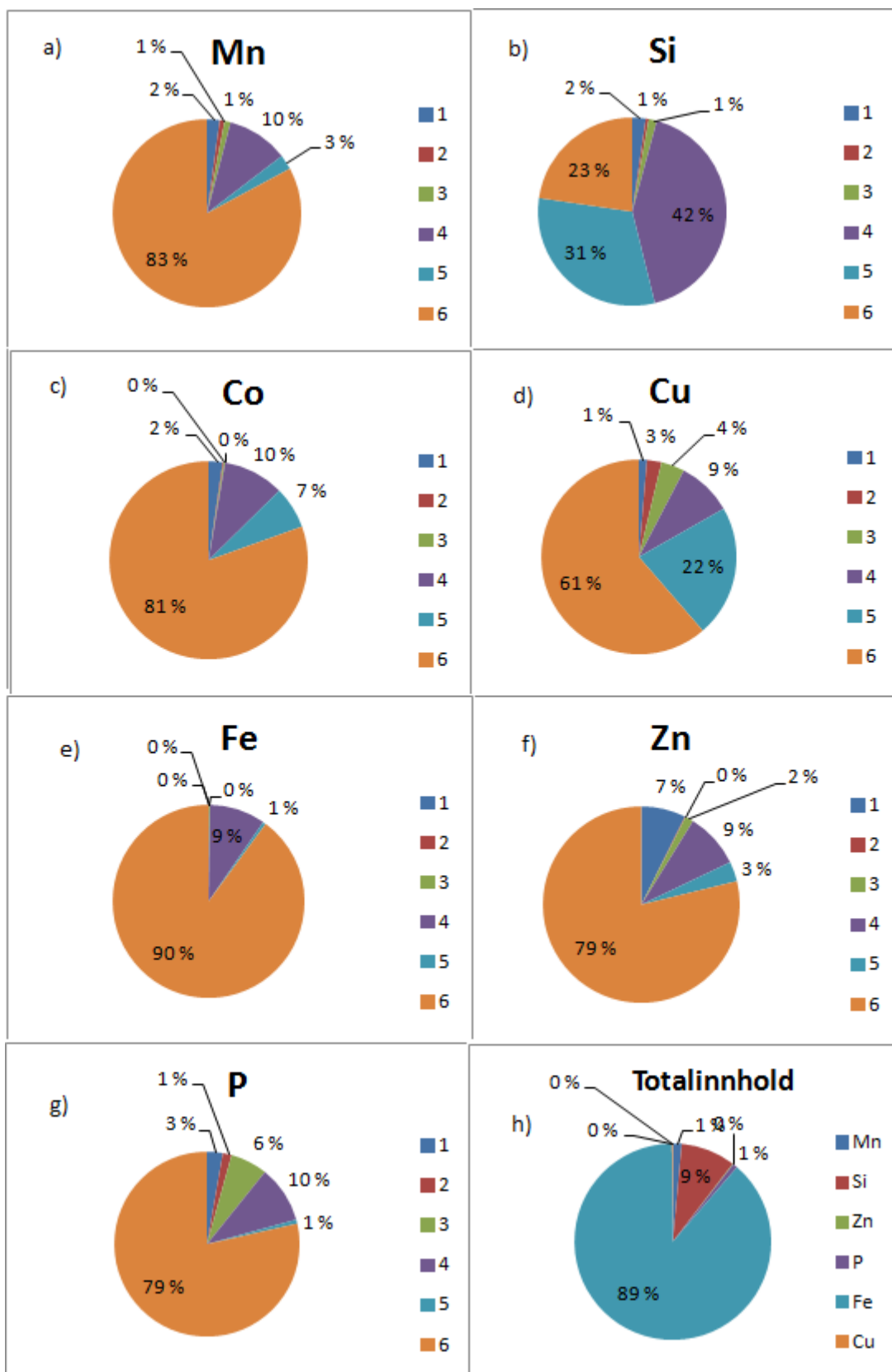
Under analysen av de ulike fraksjonene fra den sekvensielle ekstraksjonen på ICP-OES, så ble husstandarden 1643h målt 5 ganger, etter trinn 1, 2, 3, 5 og 6. Disse verdiene varierte noe, men ikke mye, noe som standardavviket viser i tabell 4.1 ovenfor. Dette gir god nøyaktighet på kalibreringskurven, samt god reproduserbarhet.

Cu sin verdi ligger innenfor sertifisert verdiområde dersom standardavviket oppgitt for målingen av 1643h blir tatt med. Dette indikerer god nøyaktighet. Det samme gjelder for Mn. Zn og Co ligger også innenfor det sertifiserte verdiområdet for 1643 e. Målingene for Fe ligger 2 standardavvik fra sertifisert gjennomsnitt, noe som er bra, da standardavviket for den sertifiserte verdien er så lav. Alt i alt gir dette en god kalibreringskurve, og en god indikasjon på at metoden er nøyaktig for bestemmelsen av grunnstoffene oppgitt i sertifikatet.

4.1.2 Sektordiagram

Resultatene har blitt fremstilt som sektordiagrammer med en prosentvis fordeling av de aktuelle grunnstoffene innen de ulike fraksjonene 1-6 (I-VI), se tabell 3.1, samt beskrivelse av

fraksjonene som gis under. Det er også tatt med et diagram som prosentvis viser utregnet totalinnhold av hvert grunnstoff (fraksjon I-VI) i forhold til hverandre. Figur 4.1 a-g, er konstruert ut fra resultatene, gitt i tabell 1 i vedlegg1. Der gjennomsnittlig konsentrasjon av et grunnstoff enten er mindre enn LOD og/eller LOQ, har henholdsvis LOD/2 eller LOQ/2 blitt benyttet som verdier for disse. Figur 4.1 h, er konstruert ut fra verdiene gitt i tabell 2 i vedlegg 1.



Figur 4.9: (a-g) viser en fremstilling av innholdet av hvert grunnstoff i hver fraksjon i den sekvensielle ekstraksjonen, for en forklaring av fraksjonene, se avsnitt 3.2.3, (h) viser prosentvis fordeling av det totale innholdet av bestemte grunnstoff i aske.

Som figur 4.1 viser, så er den høyeste andelen av hvert grunnstoff til stede i fraksjon 6, dette gjelder for alle grunnstoffene bortsett fra silisium, der det ser ut til at den største andelen er løst ut i fraksjon 4 (karakterisert som lett reduserbart materiale (Fe og Mn oksider)). Utfra totalinnholdet, også illustrert med et sektordiagram, er det jern og silisium som dominerer.

Andelen av hvert grunnstoff som anses som reversibelt og irreversibelt bundet, har følgende fordeling, oppgitt i prosent av totalinnhold. Da det er de tre første fraksjonene som den reversible delen består av, kan en av figur 4.1 ovenfor, trekke samme slutning som i Tabell 4.6 under, at kun en liten del av grunnstoffene er reversibelt bundet.

Tabell 4.6: Tabellen viser oversikten over hvor stor andel av hvert grunnstoff som er karakterisert som reversibelt eller irreversibelt bundet. Alle verdiene er gitt i prosent.

	Mn	Si	Zn	P	Fe	Cu	Co
reversibelt	4,1	4,2	8,8	11	0,22	7,6	2,7
irreversibelt	96	96	91	89	100	92	97

For øvrige resultater i mg/kg, se vedlegg 1, tabell 1.

4.1.3 Måling av pH

pH ble målt i fem parallelle prøver av aske oppslemmet i milliq-vann, for å bestemme pH i fraksjon 2 (II) av den sekvensielle ekstraksjonen. Resultatene fra pH-målingen ble $8,0 \pm 0,19$. Dette er omtrent likt med pH i saltvann.

4.2 Analyse av de ulike størrelsesfraksjonene av aske på ICP-OES

4.2.1 Valg av syre til dekomponering

Den mest vanlige syren å benytte til dekomponering er HNO_3 , men som beskrevet i teorien, så vil HF (flussyre) kunne løse opp silikater og dermed en høyere andel av stoffer som sitter i strukturen. Så andelen silisium som detekteres vil naturligvis være større for asken som er utsatt for dekomponering med HF og HNO_3 , enn kun HNO_3 . Dette kan derfor være fordelaktig for analysen av næringsstoffer, og det vil naturligvis føre til ulike resultater for aske dekomponert med ulike reaktanter.

4.2.2 Nøyaktighet, presisjon, deteksjon og kvantifikasjon i metoden

Dekomponering med salpetersyre

Analysen av de ulike sertifiserte referansematerialene (SRM), vises i tabell 4.3, og gir ett mål på nøyaktigheten i metoden, for askefraksjonene dekomponert med HNO_3 .

Tabell 4.7: tabellen viser et utdrag av de sertifiserte verdiene for de sertifiserte referansematerialene SRM 1646 Estuarine Sediment (National Bureau of Standards 1982) og 2709a San Joaquin Soil (National Institute of Standards and Technology 2009), samt de målte verdiene for disse referansematerialene fra ICP-OES for de utvalgte grunnstoffene (som kan vise seg å være begrensende på algevekst). Verdiene er oppgitt i mg/kg, og hver verdi for SRM målt på ICP-OES, ligger 3 målinger for samme prøve til grunn.

Grunnstoff	Sertifiserte verdier		Målt på ICP-OES	
	SRM 1646	SRM 2709a	SRM 1646	SRM 2709a
Cu	18 ± 3		15	27,5
Mn	375 ± 20	529 ± 18	299	477
Zn	138 ± 6		126	96
Co	10,5 ± 1,3	12,8 ± 0,2	8,1	11
P	540 ± 50		546	634
Fe	33500 ± 1000	33600 ± 700	3,06 *10 ⁵	3,09 * 10 ⁴
Si		303000 ± 400	804	2050

I følge tabell 1 i vedlegg 2, så kan alle grunnstoffene detekteres og kvantifiseres. Presisjonen bestemmes av antall gjeldende siffer i analyseresultatene av reelle prøver av aske, og dersom gjennomsnittet av prøvene får tre gjeldende siffer, indikerer dette en god presisjon.

Nøyaktigheten i forsøket indikeres av analysen av sertifisert referansemateriale. Dersom de sertifiserte verdieneområdene oppgitt i sertifikatet, stemmer overens med verdiene av analysert SRM, så er metoden nøyaktig for bestemmelsen av det aktuelle grunnstoffet.

Kobolt (Co) sin verdi for SRM 1646 Estuarine Sediment ligger to standardavvik (SD) fra sertifisert verdi, mens den målte verdien for SRM 2709a San Joaquin Soil ligger flere standardavvik fra SRM-verdiområde. Da standardavviket til Co for SRM 1646 er nokså høyt, og målingene for SRM 2709a ligger langt fra sertifisert område, så kan en ikke konkludere på god nøyaktighet i analysen.

Dersom den dårlige nøyaktigheten skyldes at matriksen ikke er tilstrekkelig lik dekomponert vulkanaske, så kan en velge å se bort i fra dette, og allikevel konkludere på at metoden har en tilfredsstillende nøyaktighet med hensyn på analysen av kobolt. Antall gjeldende siffer for de ulike størrelsesfraksjonene målt med hensyn på kobolt (vedlegg 2, tabell 1) varierer mellom å ha 3 og 2 gjeldende siffer. De tre minste størrelsesfraksjonene har 3 gjeldende siffer, mens de

tre neste har 2. Dette indikerer god og tilfredsstillende presisjon for måling av Co i de ulike størrelsesfraksjonene.

Kobber (Cu) har kun en sertifisert verdi oppgitt for SRM 1646 Estuarine Sediment (tabell 4.3), og den målte verdien ligger innenfor sertifisert verdiområde. Dette gir/indikerer god nøyaktighet i metoden for måling av Cu. Kobber (Cu) har tre gjeldende siffer for analysen av alle fraksjonene (vedlegg 2, tabell 1), bortsett fra 212-600 μm , som har 2 gjeldende siffer. Noe som tilsammen gir god presisjon for måling av Cu.

Jern (Fe) sine analyserte verdier for SRM 1646 Estuarine Sediment ligger tre standardavvik fra det sertifiserte gjennomsnittet. Analyseverdien for SRM 2709a San Joaquin Soil ligger flere standardavvik fra det sertifiserte verdiområdet, noe som til sammen gir dårlig nøyaktighet for analysen av jern. Presisjonen for måling av jern i forsøket varierer med antall gjeldende siffer, 3, 2, 3, 2, 2, 2 for henholdsvis fraksjon 0-63, 63-90, 90-212, 212-600, 600-1000, 1000-2000 μm . Totalt sett gir dette en bra presisjon for målingene av jern i metoden.

Mangan (Mn) sine målinger fra ICP-OES (tabell 4.3) for både SRM 1646 Estuarine Sediment og SRM 2709a San Joaquin Soil ligger 3 SD fra sertifisert verdiområde (eller 4 SD fra gjennomsnittet til SRM). Metodens nøyaktighet for målingene av mangan er derfor dårlig/uakseptabel. Resultatene for målingen av mangan (Mn), vedlegg 2, tabell 1, gir tre gjeldende siffer for fraksjon 0-63, mens resten av fraksjonene får 2 gjeldende siffer. Det vil si at presisjonen for målingen av Mn er tilfredsstillende.

Fosfor (P) sin verdi ligger godt innenfor sertifisert område for SRM 1646 Estuarine Sediment, og gir derfor god nøyaktighet for analysen av fosfor. Det er ikke oppgitt noen sertifisert verdi for fosfor for SRM 2709a San Joaquin Soil. Antall gjeldende siffer for de ulike størrelsesfraksjonene målt med hensyn på fosfor, har alle 2 gjeldende siffer, (bortsett fra 63-90 μm fraksjonen som har 3 gjeldende siffer), noe som gir en tilfredsstillende presisjon.

Analysen av silisium (Si) er svært unøyaktig, da det sertifiserte referansematerialet, SRM 2709a San Joaquin Soil, sertifiserte verdi er 147 ganger så høyt som det som er målt på ICP-OES. Resultatet er rett og slett uakseptabelt, så det er tydelig at salpetersyre ikke egner seg for dekomponering når analytten er silisium. Presisjonen for måling av Si i forsøket varierer mellom et antall gjeldende siffer på 2, 1, 2, 3, 2 og 2, for henholdsvis fraksjon 0-63, 63-90, 90-212, 212-600, 600-1000, 1000-2000 μm . Totalt sett gir dette en tilfredsstillende presisjon for alle fraksjonene bortsett fra 63-90 μm .

Den målte verdien for sink (Zn) (tab 4.3) ligger to standardavvik fra det sertifiserte verdiområdet for SRM 1646 Estuarine Sediment. Det faktum at den målte verdien for SRM 1646 ligger to standardavvik fra sertifisert gjennomsnitt behøver ikke nødvendigvis å bety at nøyaktigheten for bestemmelsen av sink i metoden er dårlig. Dersom standardavviket oppgitt i sertifikatet er lite, så vil allikevel resultatene kunne være tilfredsstillende nøyaktige ut fra usikkerhet i metoden. Derfor gir analysen av sink en tilfredsstillende nøyaktighet. Målingene av de ulike størrelsesfraksjonene med hensyn på sink, gir tre gjeldende siffer for de tre minste størrelsesfraksjonene, og 2 gjeldende siffer for de tre største fraksjonene (212-600, 600-1000 og 1000-2000 μm). Dette indikerer god presisjon i metoden.

Det ser ut som det er rimelig tilfeldig hvilke fraksjoner av asken som har bedre presisjon enn andre. Det ser likevel ut til å være en trend for at de større fraksjonene har et lavere antall gjeldende siffer enn de minste fraksjonene. Fraksjon 1 har oftest 3 gjeldende siffer, og fraksjon 6 (1000-2000 μm) har alltid 2 gjeldende siffer. Dette gir allikevel en tilfredsstillende presisjon (for analysen av hvert av grunnstoffene). Disse små forskjellene kan skyldes at homogeniteten i prøvene er litt forskjellige. I den minste størrelsesfraksjonen kan det bare være aske mindre enn 63 μm , mens i de større fraksjonene kan det være aske fra de mindre fraksjonene i tillegg, som ikke har blitt ristet igjennom sikten (fordi den var full for eksempel). Den eneste fraksjonen som ikke gir en tilfredsstillende presisjon, er fraksjon 2 (63-90 μm) for Si, da den kun har ett gjeldende siffer.

Dekomponering med en blanding av flussyre og salpetersyre

Alle resultatene i tabell 2, vedlegg 2 for dekomponering og analyse av størrelsesfraksjon 212-600 μm med HF og HNO₃ kan kvantifiseres og detekteres. Analysen av Co gir dårlig presisjon, med kun ett gjeldende siffer i gjennomsnittet. Analysen av Fe, Mn og Zn gir en tilfredsstillende presisjon med 2 gjeldende siffer, og analysen av Mn, P og Si gir god presisjon, med tre gjeldende siffer i gjennomsnittet.

4.2.3 SRM 2709a San Joaquin Soil som referansemateriale for dekomponering med HNO₃

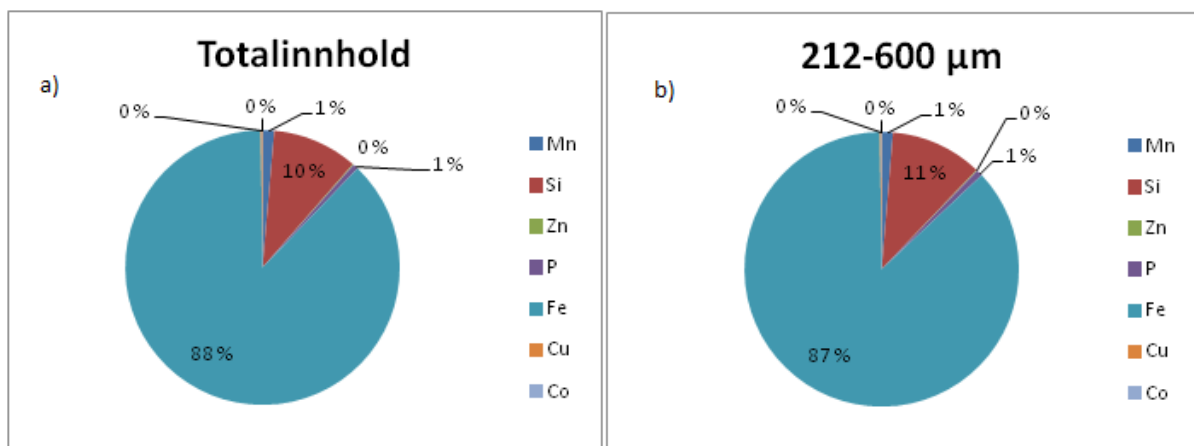
I forhold til de sertifiserte referansematerialene, så har det vist seg at San Joaquin Soil ikke egnet seg så godt som SRM til metoden, da grunnstoffene analysert ikke stemte overens med det sertifiserte verdiområdet i sertifikatet for Co, Fe, Mn og Si. Grunnstoffene P, Zn og Cu har ingen sertifiserte verdier å sammenliknes med (tabell 4.3). I metoden ble HNO₃ benyttet til dekomponeringen, mens produsenten har benyttet en annen syreblanding bestående av både HNO₃ og HF (Mackey et al. 2010). Verdiene oppgitt i sertifikatet ligger derfor høyere enn verdiene oppnådd ved dekomponering med HNO₃, grunnet at flussyren vil løse ut silikater, og

dermed en høyere andel av grunnstoffene fra strukturen. Dette gjør at SRM 2709a San Joaquin soil var uegnet til bruk som referansemateriale, når HNO_3 ble benyttet til dekomponering.

Verdiene analysert for de sertifiserte referansematerialene var høyere for kobolt, enn for resultatene analysert fra asken for både SRM 1646 og 2709a. Det samme gjelder for analysen av grunnstoffene Fe, Mn, P, Si og Zn. For Cu så ligger verdien for SRM 1646 nesten likt med verdiene analysert (i alle fall for den minste fraksjonen), mens verdien for SRM 2709a er høyere. Det hadde vært best å benytte referansematerialer som har så lik som mulig verdi som det som skal analyseres, men dette er vanskelig å finne ut av på forhånd. Dette anses som akseptabelt for formålet.

4.2.4 Resultater for dekomponering med HNO_3 , fremstilt i sektor- og søylediagram

I figur 4.2 har totalinnholdet av næringsstoffer fra hver størrelsesfraksjon har blitt slått sammen og delt på antallet fraksjoner for å finne den tilnærmede fordelingen av grunnstoffene i totalfraksjonen, det vil si asken <2mm i diameter. Fordi hver fraksjon av asken ikke er like voluminøs/stor som den andre, det er for eksempel en større andel av asken som er i en størrelsesorden fra 212-600 μm enn det finnes av fraksjonen <63 μm , så vil muligens ikke en slik fremstilling gi et riktig bilde/en riktig fremstilling. Derfor har det blitt lagd et tilsvarende diagram, hvor fraksjonen som det ble mest av under siktingen (den mest voluminøse fraksjonen) ble fremstilt, for å sammenlikne disse. For en oversikt over resultatene figurene har blitt fremstilt fra se vedlegg 2, tabell 1, og tabell 3 for utregnet totalinnhold.



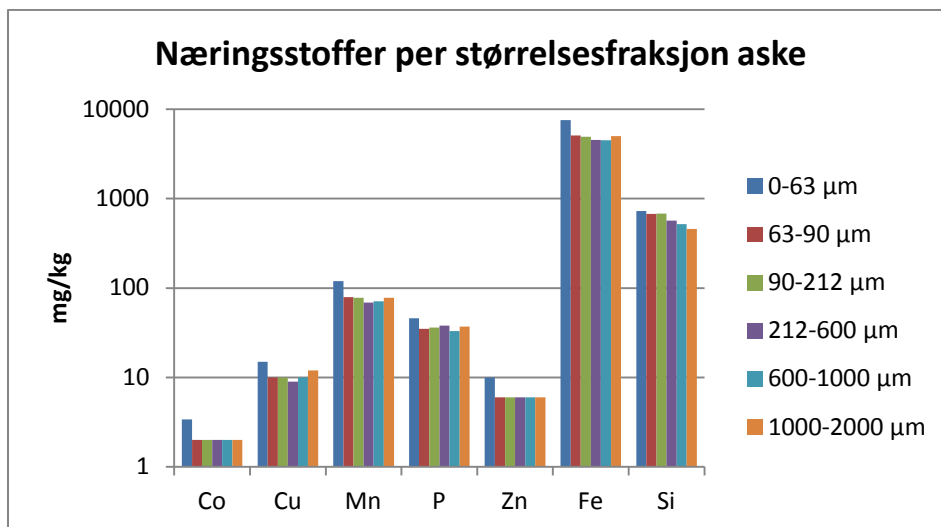
Figur 4.10: Figuren viser forskjellen mellom gjennomsnittlig totalinnhold av hvert grunnstoff, regnet ut ved å summere opp konsentrasjonen av hvert grunnstoff i hver størrelsesfraksjon og dele på antallet fraksjoner, samt å ta

utgangspunkt i den dominerende størrelsesfraksjonen i asken (mest materiale), det vil si askefraksjonen mellom 212 og 600 μm .

Figur 4.2 viser at det er ikke er noen stor forskjell mellom Totalinnhold og fraksjon 212-600 μm , det er kun en litt større andel Si i forhold til Fe i 212-600 μm fraksjonen, men da forskjellen kun er på 1 %, kan en ikke si at dette er en signifikant forskjell. Den dominerende fraksjonen (212-600 μm), er derfor representativ for totalinnholdet.

Sammenlikning av figur 4.2 "Totalinnhold", med "Totalinnhold" i figur 4.1, viser at det er en tilnærmet lik fordeling mellom de ulike grunnstoffene i forhold til hverandre. Innholdet av jern er en prosent høyere i figuren 4.1 h), mens innholdet av Si er 1% høyere i figur 4.2 a), men som forklart ovenfor kan en ikke si at dette er en signifikant forskjell.

Da det er vanskelig å lese noe mer informasjon ut ifra figur 4.2, enn at innholdet av jern og silisium er høyt i forhold til de andre grunnstoffene, ble resultatene (for tabell over dataene, se vedlegg 2, tabell 1) fremstilt som et søylediagram, med logaritmisk skala.

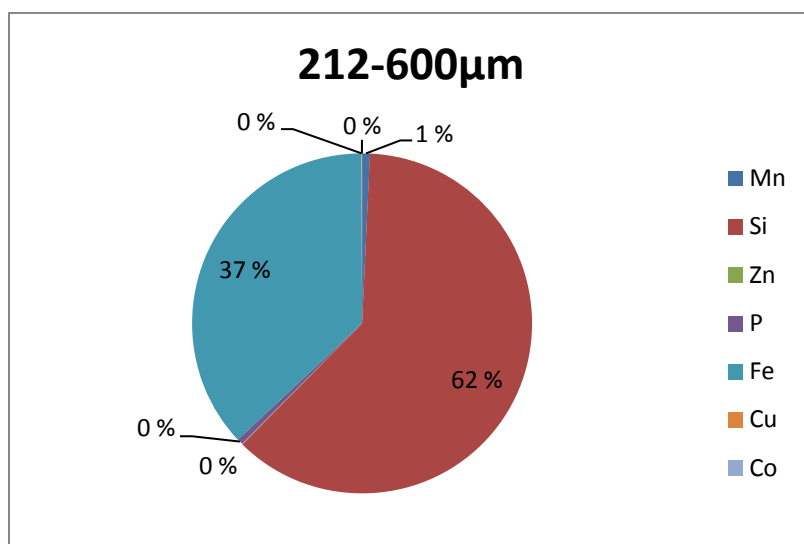


Figur 4.11: Figuren viser en logaritmisk fremstilling av analysen av de ulike næringsstoffene, i de ulike størrelsesfraksjonene av aske.

Den minste størrelses-fraksjonen, 0-63 eller $<63 \mu\text{m}$, er den fraksjonen som inneholder den høyeste konsentrasjonen av alle grunnstoffene (fig. 4.3). I resten av fraksjonene ser konsentrasjonene av grunnstoffene ut til å variere noe, men ligger relativt stabilt lavere enn konsentrasjonene til den minste fraksjonen. Standardavvikene (se tabell 1, vedlegg 2) er så små, at det blir en signifikant forskjell fra målingene for fraksjonen $<63 \mu\text{m}$ i forhold til de andre fraksjonene.

4.2.5 Resultater for dekomponering med HF og HNO₃, fremstilt i sektordiagram

Figuren under viser et tilsvarende sektordiagram, som figur 4.2, bortsett fra at her er flussyre blitt benyttet i stedet for HNO₃ til dekomponeringen. Se vedlegg 2, tabell 2 for verdier i g/kg, som figuren har blitt konstruert ut fra.



Figur 4.12: Figuren viser resultat av analysen, hvor dekomponering av størrelsesfraksjon 212-600 µm, ved bruk av flussyre (HF) ble foretatt. Resultatet er oppgitt som prosent av totalinnhold.

En sammenlikning av fraksjon 212-600 µm, dekomponert ved hjelp av HNO₃ (figur 4.2), og HF og HNO₃ (figur 4.4) ble foretatt. Ut ifra figur 4.4 kan en se at sammensetningen prosentvis er ulik fra figur 4.2, blant annet er andelen av totalen for silisium mye større i figur 4.4 (denne figuren). Ved en sammenlikning av tabell 1, størrelsesfraksjon 212-600 µm, og tabell 2 i vedlegg 2, vises det at mengden av både silisium og jern løst ut ved bruk av HF er betraktelig høyere enn mengden løst ut ved bruk av HNO₃. Verdiene er så forskjellige som 14,8 og 0,566 g/kg for Si, og 8,9 og 4,5 g/kg for Fe. Altså mye mer silisium enn jern er løst ut ved bruk av HF, men ved bruk av HNO₃ er mer jern løst ut enn silisium. Innholdet av alle grunnstoffene i fraksjon 212-600 µm er høyere der dekomponeringen er foretatt med HF. Dette tyder på at denne dekomponeringen har vært mer effektiv.

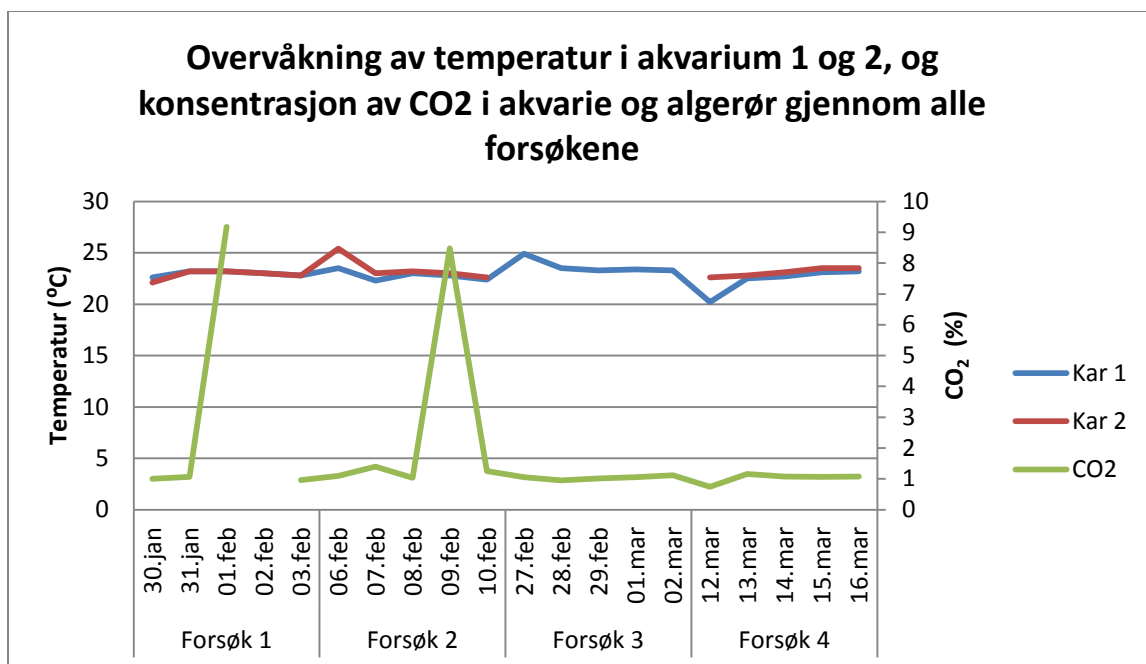
Prosentvis stemmer resultatene godt overens, for den sekvensielle ekstraksjonen, og for analysen av de dekomponerte størrelsesfraksjonene, men når en sammenlikner dataene i tabell for totalinnhold fra den sekvensielle ekstraksjonen i g/kg (tabell 2, vedlegg 1) med tabell 1 og 2 i vedlegg 2 (for dekomponering av de ulike størrelsesfraksjonene med HNO₃ og HF), ser en at dekomponeringen med HF gir tilnærmet like resultater som en ser fra den sekvensielle ekstraksjonen, mens dekomponeringen med HNO₃ har vært mindre effektiv for nesten alle

grunnstoffene, selv om den minste fraksjonen, som har det høyeste innholdet av grunnstoff blir benyttet som utgangspunkt.

Dekomponeringen er forventet å ekstrahere ut en større andel av grunnstoffer enn den sekvensielle ekstraksjonen. Dette er også tilfellet for asken dekomponert med HNO₃ og HF, men dekomponeringen med HNO₃ gav lavere resultater enn verdiene for den sekvensielle ekstraksjonen. Det kan derfor virke som om det var dekomponeringen med blandingen av HF og HNO₃ som gav det beste resultatet, og at denne metoden, med fordel kunne ha blitt benyttet på alle størrelsesfraksjonene av aske.

4.3 Algedyrking

Temperaturprofil for kar 1 og 2 (°C), samt CO₂ oppgitt i % i forsøk 1-4, er sammen fremstilt i figur 4.5 under. I forsøk 3 ble kun kar 1 benyttet, da det kun var 6 algerør i forsøket. Den andre februar ble ikke CO₂ målt, noe som vises i et brudd i grafen.



Figur 4.13: Figuren viser en oversikt over temperaturen i karene som algerørene ble satt i for å holde temperaturen stabil. Temperaturen i algerørene vil derfor ha tilnærmet lik temperatur som oppgitt her. Konsentrasjonen av CO₂, som ble pumpet inn i algerørene er også vist i figuren.

Temperaturen og konsentrasjonen skulle holdes så konstant som mulig, men som figur 4.5 viser, så har konsentrasjonen av CO₂ variert noe, da den var litt vanskelig og stille inn. Hver gang prøver ble tatt, ble rørene koblet fra CO₂-uttaket, og da de deretter ble koblet på igjen kan ulik innstilling av boblingen i rørene ha ført til noe endring. Det fantes også flere uttak til

CO₂, som under noen av forsøkene ble benyttet av andre, og dette kan ha hatt en påvirkning på CO₂ tilførselen. Denne ble justert igjen så raskt som mulig, etter at det ble oppdaget.

Oversikten over salinitet og pH (figur 1 i vedlegg 3), viser at disse har holdt seg tilnærmet konstante. Som figuren viser, så ble ikke saliniteten målt i forsøk 1. I forsøk 2 er saliniteten noe forskjellig fra målingene for forsøk 3 og 4. Dette kan forklares med at algene ble dyrket i medie og ikke rent saltvann. Ifølge oppskriften på medie (tabell 3.4 og avsnitt 3.6.1) så er det tilsatt noe milliq-vann, som kan forklare en noe lavere salinitet. Som forklart i teorien kan en høy salinitet hemme celledeling, og føre til tap av fotosyntetisk aktivitet, i tillegg til endringer i osmotisk regulering, som kan kreve energi. Da det har blitt påvist at *T. suecica* har optimale vekstbetingelser som ligger mellom 25-35 ‰ salinitet, er det derfor fordelaktig at saliniteten holder seg tilnærmet konstant rundt 35-36 ‰, og ikke lavere enn 29 ‰, for alle forsøkene.

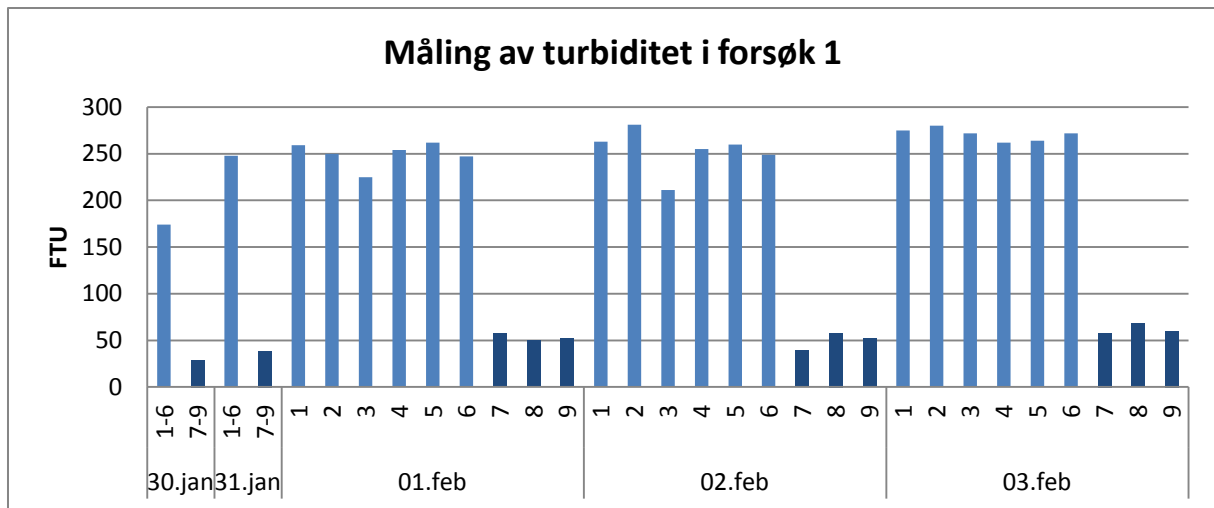
Karbondioksid ble benyttet for å regulere pH, og en økning i pH kan tyde på for lite tilgang på CO₂, eller at algene har brukt opp all CO₂. Dette vil ikke komme til å skje her, da tilførselen av CO₂ til algerørene er konstant. Dette viser også figur 1 i vedlegg 3. Endringer i salinitet og pH, kan også virke inn på løseligheten til grunnstoff bundet til asken, men fordi verdiene holder seg relativt konstante, så vil dette mest sannsynlig ikke ha noen stor effekt.

4.3.1 Forsøk 1- Innledende forsøk

Prøve 1 til 6 er algerør, hver tilsatt cirka 0,8 g aske (For nøyaktig innvekt, se tabell 1 i vedlegg 5), og prøve 7-9 er blankprøver, det vil si kun utgangskultur fortynnet i saltvann. Et like stort volum av utgangskulturen ble tilsatt til hver av prøvetypene for å få et likt utgangspunkt. For forsøksoppsett se eksperimentelt, samt vedlegg 4 i tabell 1.

Turbiditetsmålinger

Under vises en figur med turbiditetsmålinger foretatt gjennom forsøk 1.



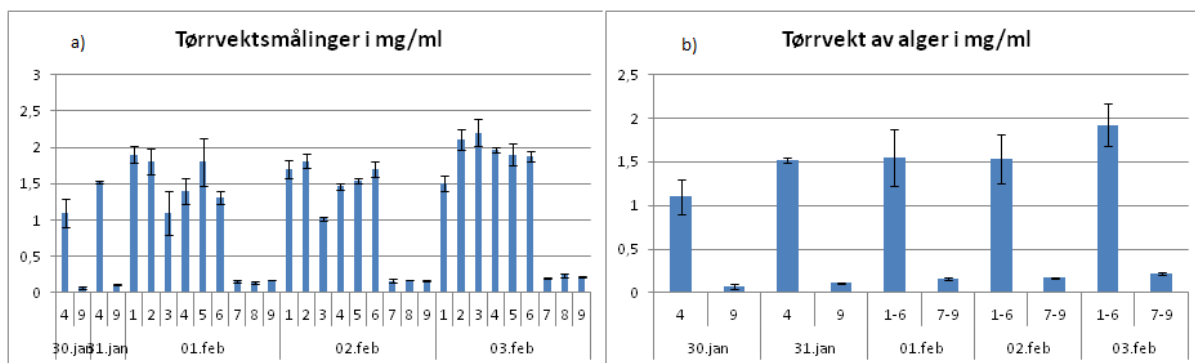
Figur 4.14: Figuren viser turbiditet målt i de ulike prøvene igjennom forsøk 1, prøve 1-6 er tilsatt aske direkte, og prøve 7-9 er blankprøver (som definert i ordliste). I tabell 1 i vedlegg 4 finnes det en oversikt over forsøksoppsettet. Den 30 og 31 januar ble ett algerør med henholdsvis prøve og blank valgt ut og tatt prøve av (og turbiditet ble målt). I resten av forsøket ble det tatt prøver av alle rørene.

Ut fra Figur 4.14 kan en se at det er signifikant forskjell på turbiditetsmålingene med og uten tilsatt aske, dette er å forvente, da asken vil gi utslag i målingen, (som beskrevet i teorien). Ut fra turbiditetsmålingene virker det som om konsentrasjonen av alger i løsningen har økt fra 30. til 31. januar, men deretter stabilisert seg på et nivå rundt 250 FTU for prøve 1-6, og rundt 50 FTU for prøve 7-9.

Men dersom en tar gjennomsnittet av målingene fra den 3. februar for prøve 1-6 minus utgangs turbiditeten, får en et mye høyere resultat, enn dersom en utfører samme operasjon for prøve 7-9 den 3. februar, minus turbiditeten for samme prøver den 30. januar.

Tørrvektsmålinger

Målingene av tørrvekt ble her foretatt med tre filter per prøve, og resultatene vises i figur 4.7 a) og b) under.



Figur 4.7: a) viser tørrvekt per prøve i mg/ml, regnet ut som gjennomsnitt fra tre filter per prøve, med tilhørende standardavvik. De første to dagene av forsøket ble det kun tatt prøve av alger nr 4 og 9. Figur b) viser resultatet av tørrvektsmålinger (mg/ml), på et gjennomsnitt av parallelle prøver hvor n=6, og n=3, med tilhørende standardavvik (unntak for 30. og 31. januar). I både figur a og b er Prøve 1-6 er tilsatt aske, mens prøve 7-9 er blankprøver, for oppsett se vedlegg 4, tabell 1.

I og med at prøvene inneholder aske, og prøvetaking er foretatt på samme måte hver dag, ble det antatt at askekonsentrasjonen i hver prøve, hver dag, vil holde seg tilnærmet konstant. Dette vil nok ikke være tilfelle, da menneskelige, samt instrumentelle avvik med hensyn på prøvetaking og oppblanding av algeløsningen (ved hjelp av bobling) før prøvetaking, og ved preparering av tørrvektsprøver, vil spille inn. I tillegg ble det i de ulike forsøkene en ulik grad av belegg på bunnen av algerørene, som etterhvert ikke var mulig å få blandet inn i løsningen ved å justere boblingen (CO₂-en). Dette vil også være med og skape avvik for både tørrvekt (som vist med høye standardavvik), turbiditet og celledtelling.

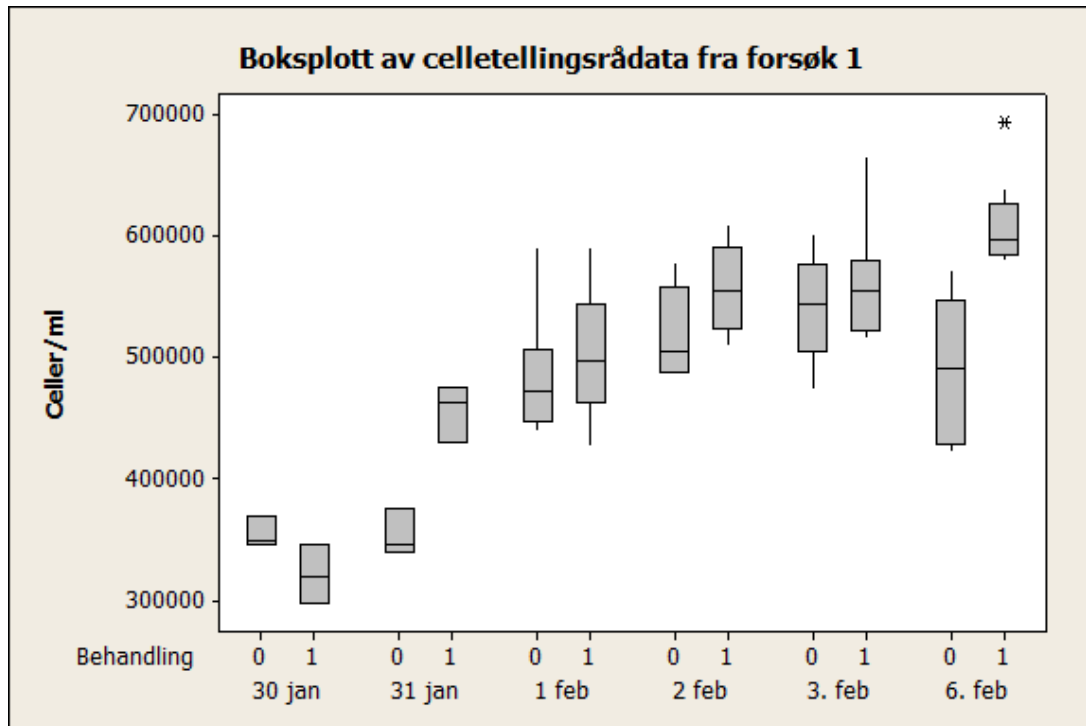
Ut ifra disse tørrvektsmålingene (fig. 4.7) er det vanskelig å bestemme om det har vært større vekst i prøvene i forhold til blankprøvene. En kan se at det har vært vekst i begge, men ikke at veksten i prøven er signifikant forskjellig fra veksten i blanken, fordi standardavvikene til prøvene (1-6) er så høye. I tillegg så er standardavvikene til prøvene overlappende hele tiden, bortsett fra den 30. og 31. januar. Men ved disse datoene så er det bare tatt uttak av en prøve.

Men dersom en tar utgangspunkt i resultatene fra prøve fire og prøve ni (fig 4.7 a), eller gjennomsnittet av målingene for prøve 1-6 og 7-9 som vist i figur 4.7 b, og tar slutt minus start med tilhørende standardavvik, så viser resultatet at tørrvekten har økt mest i prøvene tilsatt aske, enda standardavvikene er høyere enn for blankprøvene (se vedlegg 11 for utregninger).

Celletellinger og statistikk

Figur 4.8 viser et boksplokk av resultatene for celledtellingene, konstruert i minitab. For å finne ut om det virkelig er noen signifikant forskjell på behandlede prøver (prøve 1-6, tilsatt aske)

og ubehandlede prøver (prøve 7-9), så ble det i tillegg utført en regresjonsanalyse ved hjelp av minitab.



Figur 4.8: Figuren viser et boksploTT over celletall i forsøk 1. Behandling null tilsvarer prøve 7-9 (som er blankprøvene, dvs ikke tilsatt aske) og behandling 1 tilsvarer prøve 1-6.

Ut fra boksploTTet i figur 4.8 så ser det ut til at en krummet linje vil passe best som modell for dataene. Derfor antas modellen, vist i linkning 1.5.

$$(1.4) \quad Y = \beta_0 + \beta_1 \text{tid} + \beta_2 \text{behandling} + \beta_3 \text{tid}^2 + \text{feilledd } (e_i).$$

Utifra regresjonsanalysen (se vedlegg 6) ser en først at R^2 (determinasjonskoeffisienten) er på 66 %, noe som betyr at 66 % av variasjonen i datasettet kan forklares utifra modellen.

I tillegg er alle p-verdiene oppgitt til mindre enn 0,05, og det betyr at de krommede linjene er parallellforskjøvet i forhold til hverandre, og at en antar at behandlet ligger høyere enn ubehandlet, men at veksten i forhold til tid er den samme. Som en også kan se ut fra datasettet (regresjonsanalysen), og boksploTTet er det flere avvikende verdier og uvanlige observasjoner i datasettet. Disse legger minitab merke til, slik at en kan velge å fjerne dem dersom man finner en god grunn. Det er ikke vanlig å fjerne observerte verdier bare fordi de ikke passer inn i modellen.

BoksploTTet viser, at tellingene foretatt for behandling null og en overlapper de fleste dager, unntatt 31. januar. Også distribusjonen av data, samt avvik fra middelvei er svært

varierende. I boksplottet er den midterste vannrette linjen medianen. Og som figuren viser så er ikke alltid medianen i midten av datasettet. (Dataene ligger generelt høyt i forhold til medianen for de ubehandlede prøvene, for prøvene tilsatt aske er verdien varierende.)

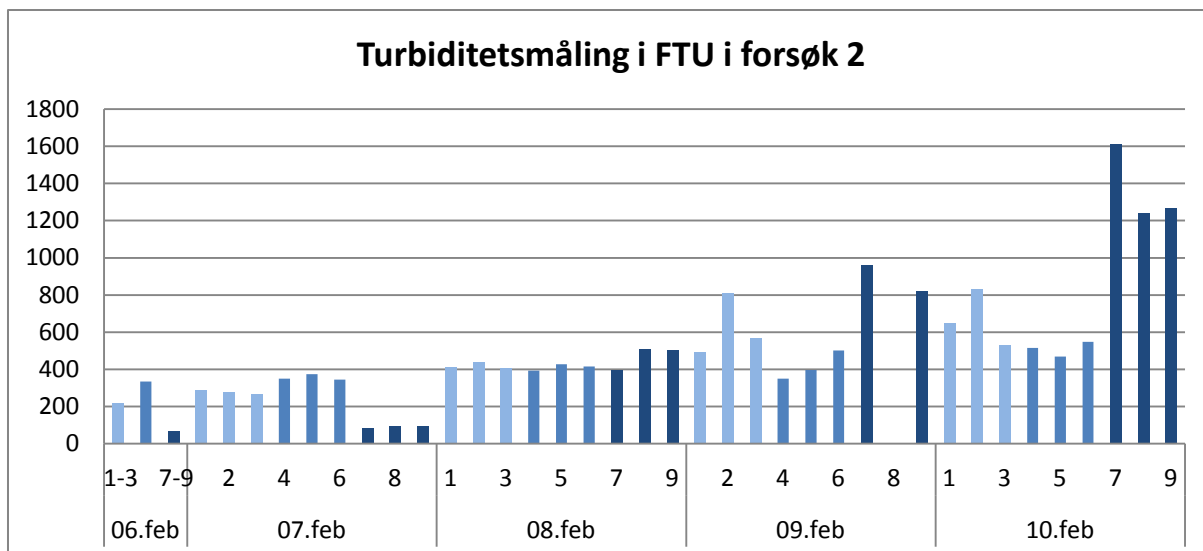
Som en kan se ut fra figur 1, vedlegg 10, så er det variabelt hvor mange av prøvene som har blitt talt tre ganger under forsøk 1. Og som standardavvikene i søylediagramet indiker, så er tellingene nokså variable. Dette kan blant annet skyldes at cellene i prøvene tilsatt aske hadde aggregert/dannet aggregater med asken, noe som vanskeliggjorde nøyaktige tellinger. Som nevnt vil også sedimentering, prøvetaking og oppblanding av prøve, ved prøvetaking og ved celletelling (overføring av en representativ prøve til tellekammer) ha betydning for resultatet. Figuren viser også at tellingen for prøve 7 den 2. februar, svært lav i forhold til tellingen for prøve 8. Da dataene ble lagt inn i minitab, og et scatterplott, samt en regresjonsanalyse ble kjørt, ble det raskt klart at verdiene for prøve nr 7 må være uteliggere. En feil må ha skjedd med prøvetakingen eller celletellingen denne dagen, fordi tellingene var høyere for prøven dagen før og dagen etter. I boksplottet ble derfor disse verdiene fjernet.

4.3.2 Forsøk 2

I dette forsøket er algerør nr 1 til 3 og 4 til 6 tilsatt aske, mens prøve 7-9 er ”blankprøver”. Blankprøver her, som i forrige, og neste forsøk, betyr samme behandling som prøvene, bare ikke tilsatt aske. Så blankprøvene, og prøvene er tilsatt en like stor mengde alger, og er dyrket i samme dyrkningsmedie, enten saltvann eller $f/2 * 10$. Her ble vekstmedie $f/2 * 10$ benyttet for å dyrke algene, (for å undersøke om asken kunne ha en mulig negativ effekt). For nøyaktig innvekt tilsatt i rør 1-6, se vedlegg 5, tabell 2, og for forsøksoppsett se eksperimentelt under forsøk 2, samt tabell 1 i vedlegg 4.

Turbiditetsmålinger

Under vises en fremstilling av turbiditetsmålinger foretatt i forsøk 2.



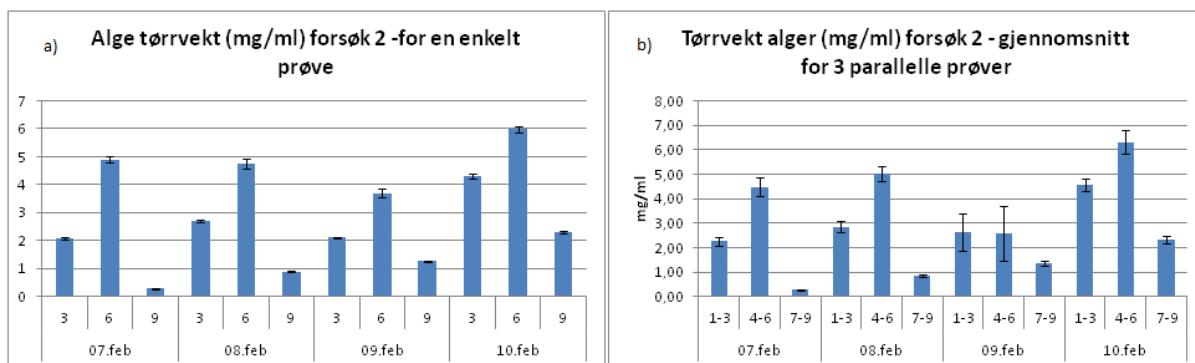
Figur 4.9: Figuren viser målinger av turbiditet (FTU) i forsøk 2. Prøve 1-3 og 4-6 er tilsatt aske, mens prøve 7-9 er blankprøver. Den 6.februar ble det tatt en prøve fra ett tilfeldig valgt rør fra hver av prøve 1-3, 4-6 og 7-9.

Turbiditetsmålingen (fig. 4.9) i prøve 8, den 9. februar er ikke tatt med, da måleverdien først ble på over 1000 FTU. Siden ble den fortynnet, både 2 og 10 ganger, men dette gav feil resultat i forhold til at prøven fra før av/opprinnelig skulle hatt en verdi over 1000. Ved fortynning to ganger ble verdien målt til 284 FTU, ganges dette med 2, blir det 568, altså langt under 1000. Fortynning 10 ganger gav resultat 54, altså 540. Og dette er sånn ca like mye som verdien for prøve 8 var allerede den 8.februar. I tillegg er både målingene for prøve 7 og 9 mye høyere den 9.februar, og det er naturlig å anta at parallelle prøver, som til det tidspunktet har fulgt hverandre godt, ikke vil slutte med det. En kan også se på målingen den 10.februar, at prøve 8 og 9 fremdeles følger hverandre.

På startdagen er turbiditeten lavest hos blankprøven, kun inneholdende alge og medie, etterfulgt av prøve 1-3 tilsatt 0,8 g aske, og til sist prøve 4-6 tilsatt 1,6 g aske (høyest turbiditet). Men to dager etter (den 8. februar) er forskjellene utjevnet. Deretter øker turbiditeten i prøve 7-9 mest, etterfulgt av prøve 1-3 og 4-6. Dette tyder på at en økt tilsetning av aske vil gi dårligere vekst. Dette kan skyldes at lystilgangen er mindre/dårligere i prøvene tilsatt aske, da prøvene raskt antok en gråtone da asken ble tilsatt, og i forhold til blankprøvene uten aske var fargeforskjellen signifikant.

Tørrvektsmålinger

Figur 4.10 a og b viser to ulike fremstillinger av tørrvektsresultatene for forsøk 2.



Figur 4.10: a) figuren fremstiller tørrveksresultatet fra forsøk 2, med utregnet gjennomsnitt og standardavvik for prøver påført tre filtere (n=3). For en oversikt over ”prøvetype” og generelt forsøksoppsett, se tabell 1, vedlegg 4. : b) Figuren viser gjennomsnittlig tørrvekt av alger i mg/ml i forsøk 2. For en oversikt over ”prøvetype”, se tabell 1, vedlegg 4.

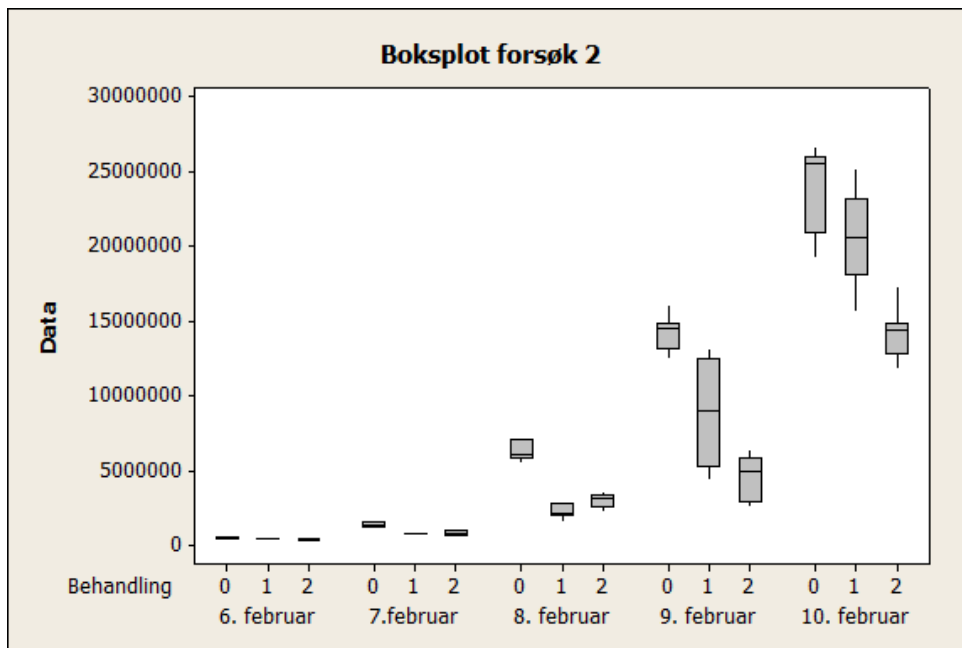
Sammenlikning av tørrveksresultater (fig 4.10 a) med celletellingen i figur 4.11, viser at tørrvekten gir et misvisende resultat, men en kan allikevel se at prøve 9 har hatt en jevn økning i tørrvekt. Og da denne ikke er tilsatt aske, må økningen skyldes en økning i biomasse.

Prøve 9, og prøve 7-9 i figur 4.10 a) og b) har hatt en jevn økning i vekt, mens de andre prøvene har vært mer varierende. Prøve 1-3 (og prøve 3) og prøve 4-6 (og prøve 6) viste stor variasjon fra den 8 til 9. februar. Tørrvektene gikk plutselig ned, og usikkerheten i fig 4.10 b) den 9. februar er stor. Generelt har vekten i prøvene økt med hensyn på tid, men fordi prøve 1-3 er tilsatt 0,8 g aske, og hver av prøvene 4-6 er tilsatt 1,6 g aske, så er det naturlig at vekten av disse vil være høyere enn vekten av prøvene kun tilsatt alger. Vekten av prøve 4-6 er derfor høyest under hele forsøket, etterfulgt av prøve 1-3, og til sist prøve 7-9. Grunnen til at tørrveksresultatene gir et mindre klart resultat enn turbiditetsmålingene, kan skyldes at mindre endringer i askekonsentrasjon på filteret vil gi mye større utslag i forhold til vekst i biomasse. En vekst i biomasse vil gi høyere utslag i turbiditetsmålinger, enn i tørrvekt i forhold til asken.

Celletellinger og statistikk

Celletellinger ble foretatt hver dag i hver prøve. Helst skal hver prøve telles tre ganger hver, men dette ble ikke alltid foretatt, da det var flere parallelle prøver. Resultatene er fremstilt som et boksplokk i figur 4.11. celletellingen er litt vanskeligere å foreta rett/nøyaktig på grunn av aske og aggregering (som nevnt tidligere), samt tilfeldige feil som skyldes prøvetaking, og at inhomogene dråper algekultur kan bli talt. Allikevel vil nok celletellingen være den mest pålitelige kilden av de benyttede måle metodene, når aske er tilsatt.

Resultatene fra figur 4. 11 sammenliknet med resultatene i figur 4.9, viser at datoen 7. februar har gitt ganske forskjellige resultater. Noe som ikke er overraskende, som diskutert ovenfor, på grunn av påvirkningen av den direkte tilsetningen på turbiditetsmålingen. Etter dette (den 7. februar) derimot er de to fremstillingene (fig 4.9 og 4.11) samsvarende, med hensyn på at blankprøven allerede den 8. februar er har vist noe større vekst enn prøvene. Både den 9. og 10. februar går det mye opp og ned i resultatene. Boksplottet og prøve 1-3 (bahandling 1) gir verdier som rekker over et stort område.



Figur 4.15: Figuren viser et boksplott med oversikt over celletall per milliliter prøveløsning, og hvordan utviklingen (i celletallet) har vært over tid, avhengig av behandling. Behandling null, er prøve 7-9, som ikke er tilsatt aske (blankprøvene), behandling 1 tilsvarer prøve 1-3, som er tilsatt 0,8 g aske, og behandling 2 er da prøve 4-6, tilsatt 1,6 g aske. For en mer detaljert beskrivelse av prøveoppsettet se tabell 1 i vedlegg 4.

Utifra boksplottet (fig 4.11) så ser det ut til å være eksponentiell vekst, noe som er å forvente da næringstilgangen er høy. Forsøker derfor en eksponentiell-modell (likning 1.6):

$$(1.5) \quad \log Y = \beta_0 + \beta_1 \text{tid} + \beta_2 \text{tid}^2 + \beta_3 X_2 + \beta_4 X_3 + \text{feilledd } (e_i).$$

Utifra regresjonsanalysen (for datasettet, se vedlegg 7) ser en først at R^2 er høy (95,2%), og det vil si at 95,2% av variasjonen i datasettet kan forklares utifra modellen. Ved videre studier av dataene kan en med sikkerhet si at behandlingene er parallforskjøvet fordi β_3 og β_4 er signifikant forskjellig fra 0, samt at de respektive p-verdiene er mindre enn 0,05 (vedlegg 7). β_3 er avstand mellom behandling 0 (ubehandlet) og behandling 1, mens β_4 er avstand mellom behandling 0 (ubehandlet) og behandling 2. De estimerte forskjellene (β_3 og β_4) er

koeffisientene foran X2 og X3. X2 og X3 er variable som tar verdien 0 og 0 for ubehandlet, 1 og 0 for behandling 1, og 0 og 1 for behandling 2. Dette betyr at vekst i forhold til tid er den samme.

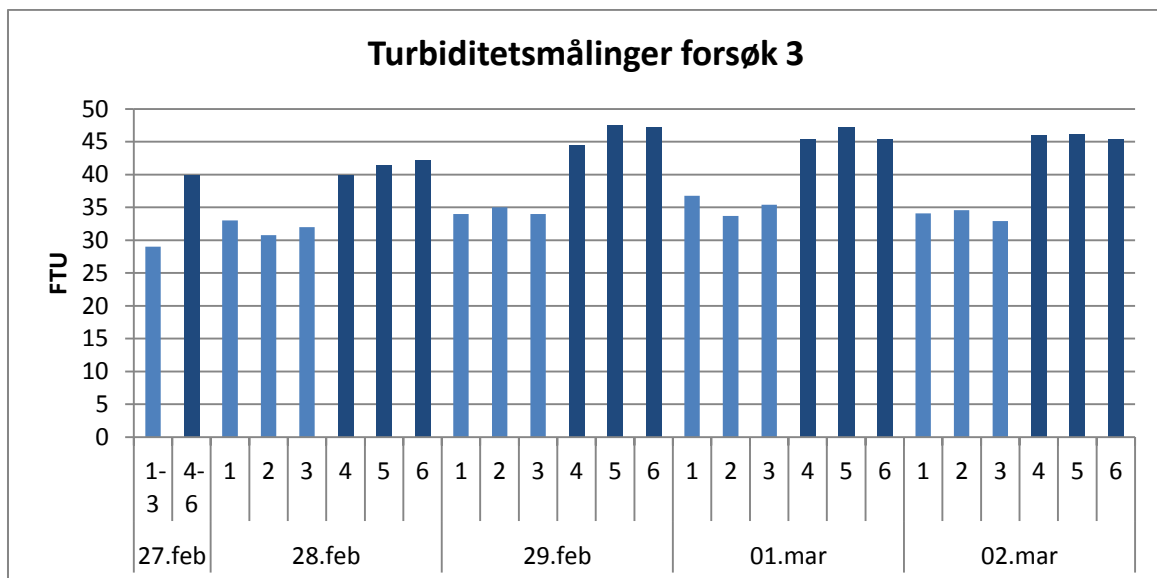
4.3.3 Forsøk 3

Her er prøve 1-3 blank det vil si kun utgangskultur fortynnet i saltvann. Prøve 4-6 er tilsatt ca nøyaktig 0,8 g aske ”indirekte” (for nøyaktig innvekt se vedlegg 5) og dyrket i saltvann. For mer informasjon om forsøksoppset se tabell 1, vedlegg 4.

Resultatene er fremstilt som søylediagrammer for turbiditet (FTU) og tørrvekt (mg/ml). For celledtall (celler/ml) er resultatene fremstilt i boksplokk.

Turbiditetsmålinger

Under vises en figur for turbiditetsmålinger fra forsøk 3.

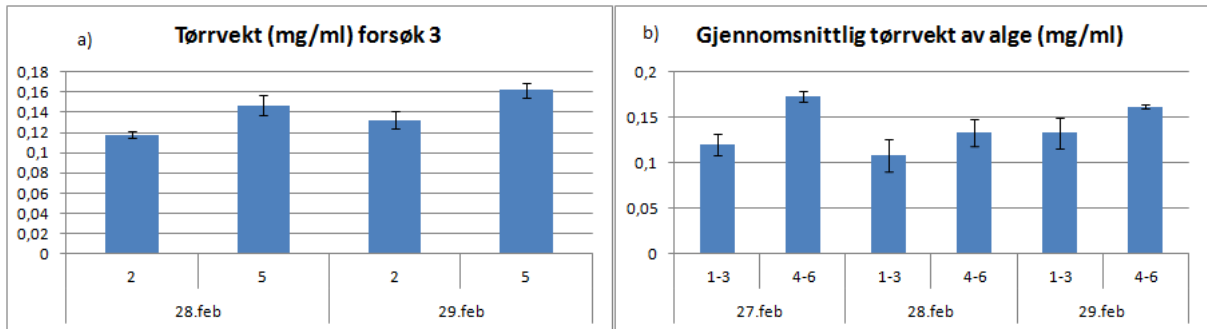


Figur 4.16: Figuren viser en oversikt over turbiditetsmålinger for forsøk 3. Prøve 1-3 er blank, og prøve 4-6 er parallelle prøver tilsatt aske indirekte som beskrevet i metoden, og ordlisten (se tabell 1, vedlegg 4 for en forklaring). Den 27. februar ble prøve 1-3 preparert i samme flaske, så prøven er tatt fra denne, det samme gjelder for prøve 4-6 denne datoen. Etter dette har prøver blitt tatt som vanlig.

Figur 4.12 viser at allerede før forsøket var ordentlig startet, så var turbiditeten i prøve 4-6 høyere enn i blanken. Men forskjellen mellom prøve 1-3 og 4-6 holder seg tilnærmet konstant gjennom hele forsøket/alle målingene.

Tørrveksresultater

I figur 4.13 vises tørrveksresultatene fra forsøk 3, fremstilt på to ulike måter.

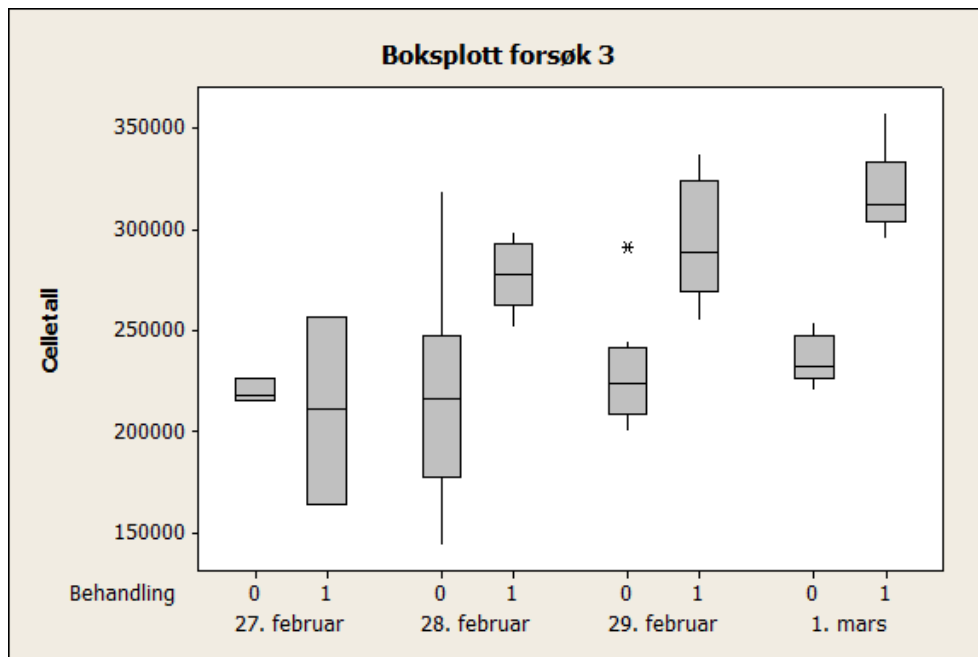


Figur 4.173: Figur a) viser gjennomsnittlige resultater for de prøvene det ble tatt tre paralleller av/tørrvektprøver av under forsøket, med tilhørende standardavvik. Resultatene fra 27. februar ble ikke tatt med her, da de samme er tatt med i b. Figur b) viser den gjennomsnittlige tørrvekten for prøvene med aske (4-6), og prøvene uten aske (1-3) også referert til som blankprøver. Verdiene er regnet ut ved hjelp av tre parallelle tørrvektprøver for prøve 2 og 5, sammen med henholdsvis tørrvektresultat fra parallelle prøver til disse: prøve 1 og 3, og 4 og 6. På forsøkets første dag ble en prøve tatt fra hver liter av henholdsvis sjøvann tilsatt alger, og sjøvann som har vært i kontakt med aske, med en tilsvarende mengde alger tilsatt.

Figur 4.13 b) (for gjennomsnittlig tørrvekt av alger) viser målingene av tørrvekt i forsøk 3, og sammenliknet med figur 4.12 (turbiditetsmålingene) så ligner figuren mest på turbiditetsmålingen den første dagen, mens dag 2 og 3 (28. – 29. februar) er det lite forskjell på prøvene med hensyn på tørrvekt. Det ser ut til å være større forskjell mellom prøvene 1-3 og 4-6 i turbiditet og celletall, enn i tørrvekt (se boksplott fig 4. 14).

Celltelling-statistikk

For å undersøke om tid og behandling har en effekt på veksten av celler, ble en regresjonsanalyse utført i minitab, og et boksplott ble konstruert (fig 4.14).



Figur 4.18:. Figuren viser et boksploTT fra forsøk 3. Behandling null og en, er henholdsvis blankprøve (1-3) og prøve 4-6 (tilsatt aske indirekte). For en mer detaljert prøvebeskrivelse se tabell 1 i vedlegg 4.

Ut fra boksploTTet, ser det ut til at rette linjer best beskriver dataene, men at stigningstallet til behandling 1 er høyere enn for behandling 0. Derfor blir et samspillsledd tatt med, og følgende modell (likning 1.7) antas:

$$(1.6) \quad Y_i = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 B + \beta_3 T * B \quad (T \text{ står for tid og } B \text{ for behandling}).$$

Hvor β_0 er en konstant, β_1 er stigningstallet til behandling null, β_2 er forskjell mellom skjæringspunkt med Y-aksen, dersom en ikke antar at startkonsentrasjonen er lik (den burde egentlig teoretiske sett være det, men vanskelig å avgjøre om den egentlig er det). β_3 beskriver hvor mye mer behandling 1 stiger, enn behandling null.

Ifølge resultatene (vedlegg 8), så kan en se at koeffisienten til Tid*Behandling (β_3) er høy, og det betyr at behandling 1 stiger med 22619 celler/ml mer enn behandling 0. I tillegg så gir p-verdien muligheten til å forkaste H_0 som sier at β_3 er null, og at linjene stiger like raskt!

I dette datasettet kan 58,3 % av variasjonen beskrives ved hjelp av modellen (den lineære sammenhengen). Grunnen til forholdsvis lav determinasjonskoeffisient, er som ovenfor, at variasjonen er stor innenfor hver/samme tid og behandling. Variasjonen i tellingene foretatt på blankprøven den 28 februar rekker over et svært stort verdiområde, og er det godt eksempel på hvor usikre tellingene kan være og hvorfor R^2 ikke er høyere.

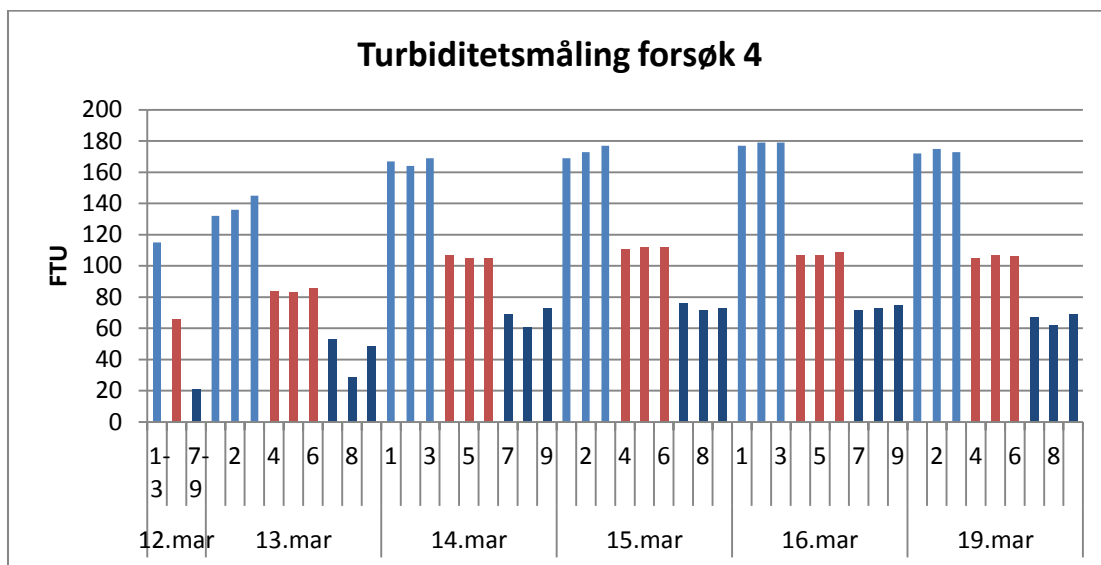
Figur 4.14 viser at iallefall 50 % av dataene, som ligger inni boksen, ikke overlapper den 29. februar og 1. mars. Og dette tyder derfor på at veksten i prøven har vært større enn hos blanken. Men avvikene til middel-verdien for prøven talt den 27. februar er svært stor, det samme gjelder for blankprøvene talt den 28. februar.

4.3.4 Forsøk 4

I dette forsøket ble aske med størrelse 0-63 μm og <2 mm tilsatt til henholdsvis prøve 1-3 og 4-6. Prøve 7-9 ble ikke tilsatt aske, og er heretter omtalt som blankprøve. For en mer detaljert beskrivelse av oppsett og prøvepreparering se tabell 1 i vedlegg 4 eller under eksperimentelt for forsøk 4.

Turbiditetsmåling

Under vises en figur med oversikten over turbiditetsmålingene fra de ulike prøvene, gjennom forsøk 4. Parallele prøver er markert med samme farge, for å gjøre det enklere å følge utviklingen.



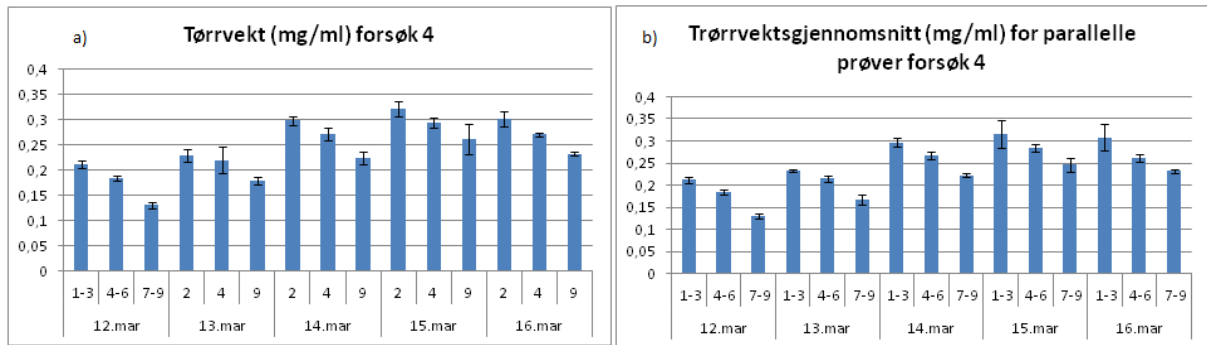
Figur 4.19: Figuren viser turbiditetsmåling gjennom forsøk 4. Prøve 1-3 og 4-6 har hatt sjøvann som har vært i kontakt med aske med ulik størrelse mens prøve 7-9 er blankprøve. For en mer detaljert beskrivelse av prøver og oppsett se vedlegg 4 tabell 1, eller eksperimentelt for forsøk 4.

Som figur 4.15 viser, så har prøve 1-3 blitt målt til å ha høyest turbiditet, etterfulgt av prøve 4-6, og tilslutt prøve 7-9. Dette skyldes nok at den ”indirekte” tilsetningen av asken til prøve 1-3 var av den minste størrelsen, og dermed ikke sedimenterte raskt nok, og dermed ble helt av sammen med sjøvannet som ble benyttet i forsøket. Det samme gjelder til en viss grad for prøve 4-6, men her ble en større askefraksjon benyttet <2 mm, og en større andel av asken vil derfor sedimentere, og hindre en like stor videreføring av asken over i algerørene. Det samme

gjelder for tørrvektsmålingene vist i figur 4.16, (som følger samme trend som turbiditetsmålingene). Det ble ikke observert noe særlig vekst i prøvene etter 15 mars. Dette gjelder både for turbiditetsmålingene (fig 4.15) og tørrvektsmålingene (fig 4.16).

Tørrvektsmålinger

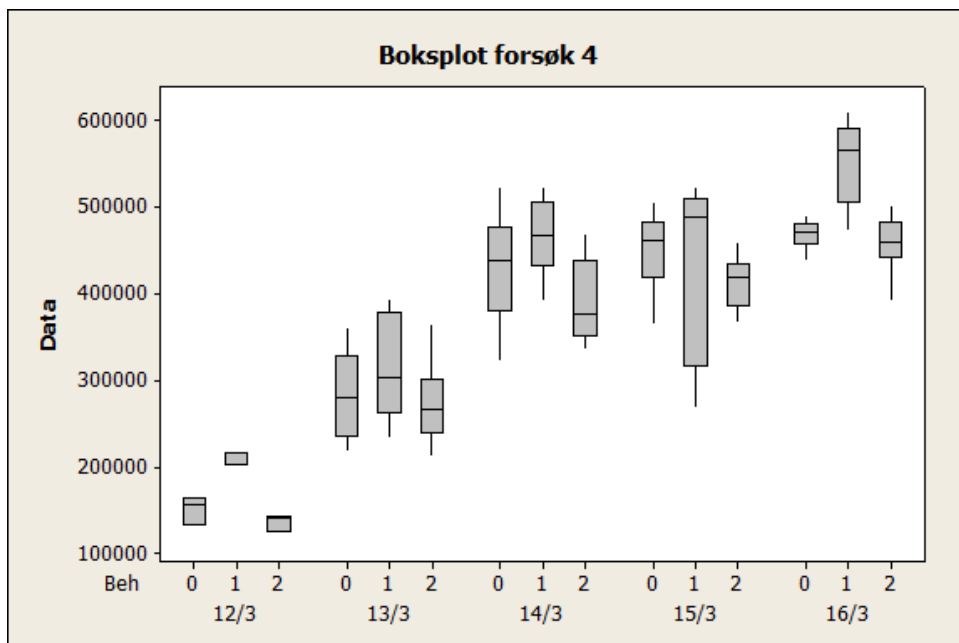
Tørrvektsresultatene fra forsøk 4 er fremstilt på to ulike måter i figuren under.



Figur 4.16: a) her vises tørrvektsresultater for parallelle resultater for prøvene 2,4 og 9, b) viser gjennomsnitt av resultater for tørrvekt (mg/ml) for prøvene 1-3, 4-6 og 7-9, hvor $n=3$ og standardavvik er gitt. For en mer detaljert prøvebeskrivelse (gjelder både a og b), se tabell1, vedlegg 4, eller eksperimentelt for forsøk 4. Prøvene tatt den 12. mars ble tatt en fra hver fra sjøvann som har vært i kontakt med aske av ulik størrelse (1-3 og 4-6), iblandet alger, og kun sjøvann tilsatt alger (7-9).

Celletelling og statistikk

Resultatene fra celledellingene i forsøk 4, er fremstilt som et boksplott, ved bruk av minitab.



Figur 4.17: Figuren viser et boksplott av celledellingene fra forsøk 4, over tid og med hensyn på/med forskjellige behandlinger.

For det første kan en ut fra regresjonsanalysen i vedlegg 9, se at R^2 (determinanskoeffisienten) er relativt høy, 82,7 %. Dette vil si at 82,7 % av variasjonen i datasettet kan forklares av modellen, det vil si den krummede linjen (andregradsfunksjonen). Modellen som er antatt sier at vekstraten avtar med tid, (og at påvirkningen på tid er avhengig av behandling).

Modellen antatt er gitt i likning 1.8:

$$(1.7) \quad Y = \beta_0 + \beta_1 \text{tid} + \beta_2 \text{tid}^2 + \beta_3 X_2 + \beta_4 X_3 + \text{feilledd } (e_i).$$

I denne modellen er X_2 og X_3 variabler som antar verdiene 0 og 0 for ubehandlet, 1 og 0 for behandling 1, og 0 og 1 for behandling 2. De estimerte forskjellene mellom β_3 , som er avstanden mellom behandling null og behandling en, og β_4 , som er forskjellen mellom behandling null og to, er gitt som estimerte koeffisienter foran X_2 og X_3 (se modell).

Resultatet (vedlegg 9) viser at det ikke er noen signifikant forskjell mellom behandling 0 og behandling 2 (også vist i boksplottet ovenfor (fig 4.20), da X_3 , som er forskjellen mellom disse to linjene gir en p-verdi som ikke viser en signifikant forskjell. Det vil si en p-verdi større enn 0,05. P-verdien til X_2 derimot, er mindre enn 0,05, og gir dermed en signifikant forskjell mellom behandling 0 og 1. Veksten i behandling 1 er signifikant forskjellig fra veksten i behandling 0. Det betyr at en ut fra den statistiske analysen, og modellen valgt kan si at veksten er høyere i behandling 1 enn null, men veksten i forhold til tid er den samme.

I dette forsøket tilsvarer behandling 0, blankprøven, eller prøven som ikke har vært i kontakt med aske (prøve 7-9 i figurene 4.15 og 4.16 ovenfor). Behandling 1 er saltvann-algeløsningen som har vært i kontakt med askestørrelsen $<63 \mu\text{m}$ (prøve 1-3), og behandling 2 er saltvann algeløsningen som har vært i kontakt med aske på størrelse $<2 \text{ mm}$ (prøve 4-6).

Ut fra resultatene kan en derfor trekke slutningen at det er en signifikant forskjell mellom prøvene uten tilsatt aske og prøvene behandlet med aske $<63 \mu\text{m}$, dette gav en høyere vekst, men bare parallelforskjøvet oppover, så en kan ikke si at veksten i forhold til tid er forskjellig. Men blankprøvene kan ikke skilles fra prøvene tilsatt aske med størrelse $<2 \text{ mm}$.

Dette kan skyldes at startkonsentrasjonen av celler i algerør 1-3, som vist i boksplottet, var svært høy i forhold til startkonsentrasjonen av behandling null og to. Slik endte den også opp, så selv om det er vist at linjen ligger lenger opp, så er veksten over tid den samme som for de andre behandlingene, og en kan derfor ikke si at veksten har vært større i prøve 1-3.

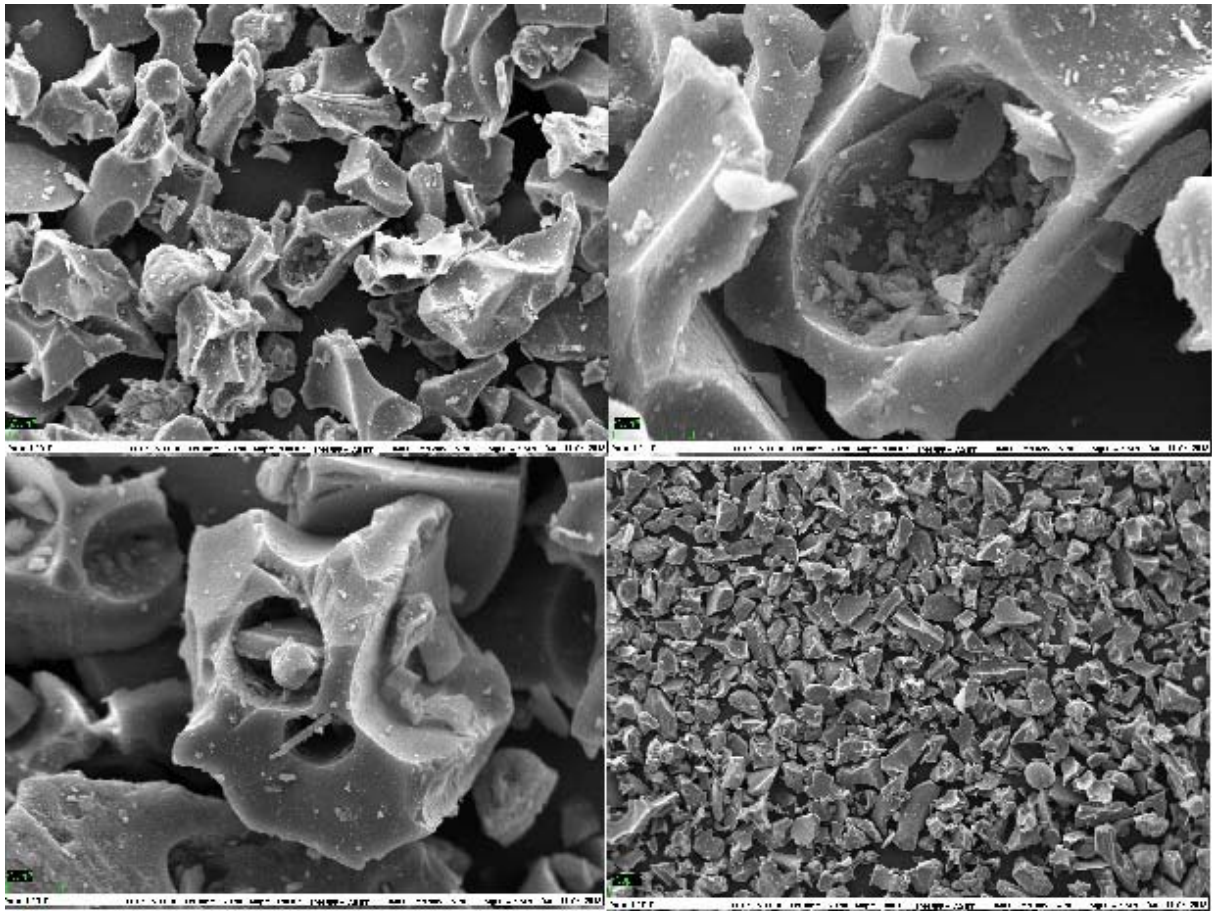
Grunnen til at det i forsøk 3 ble observert en vekst i prøvene i forhold til blanken, og at det ikke ble observert annet enn at veksten var parallelforskjøvet i forhold til hverandre i forsøk 4 (enda prøvene i forsøk 4 tilsatt mer aske < 2 mm indirekte enn i forsøk 3), kan være at det i forsøk 3 ble tilsatt mindre av utgangskulturen. Utgangskulturen består av alger og medie (f/2*10), for at konsentrasjonen av alger skal bli høy nok til å kunne benytte i tillagning av startløsningene i forsøket. Da denne løsningen inneholder mye næring, vil en større tilsetning av utgangskulturen i forsøket gjøre at mer næring blir tilgjengelig i alle algerør, og dermed kan det være at eventuelle næringsstoffer som asken tilfører blir lite i forhold til dette (denne næringskonsentrasjonene) og at en derfor ikke ser noen signifikant forskjell med hensyn på vekst i forhold til tid i forsøk 4. I forsøk 3 derimot ble det kun tilsatt 10 milliliter av utgangskulturen, noe som ikke vil føre til en høy konsentrasjon av næringsstoffer fortynnet i en liter med sjøvann.

4.4 SEM

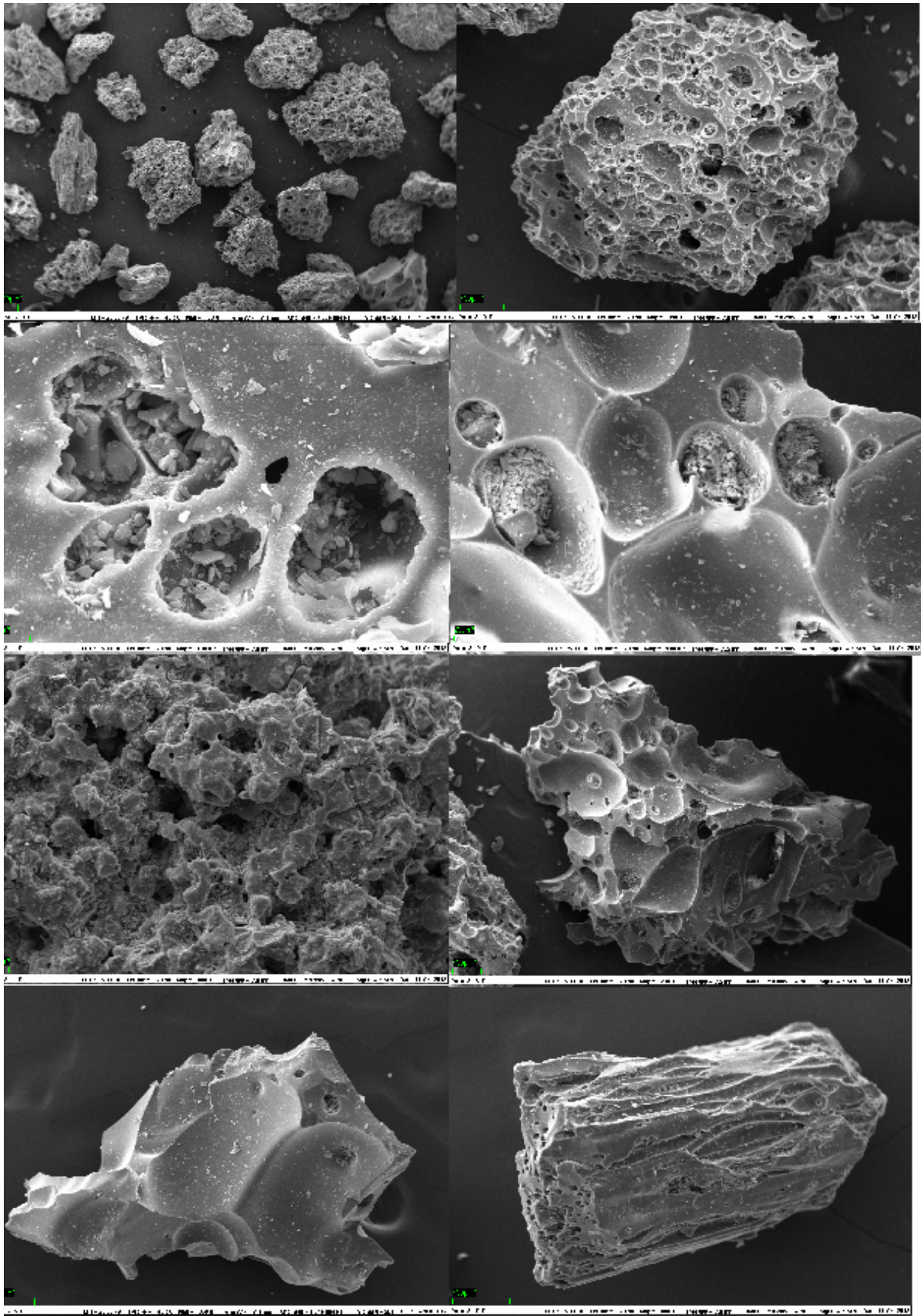
Scanning electron microscopy ble benyttet for å se på topografi, samt overflatesammensetning av grunnstoffer på askepartiklene. Resultatene kan benyttes for å si noe om homogeniteten i prøvene.

4.4.1 Topografi (SEI-modus)

Bilder av topografien til askepartikler <63 µm, og <2 mm er henholdsvis fremstilt i figur 4.18 og 4.19.



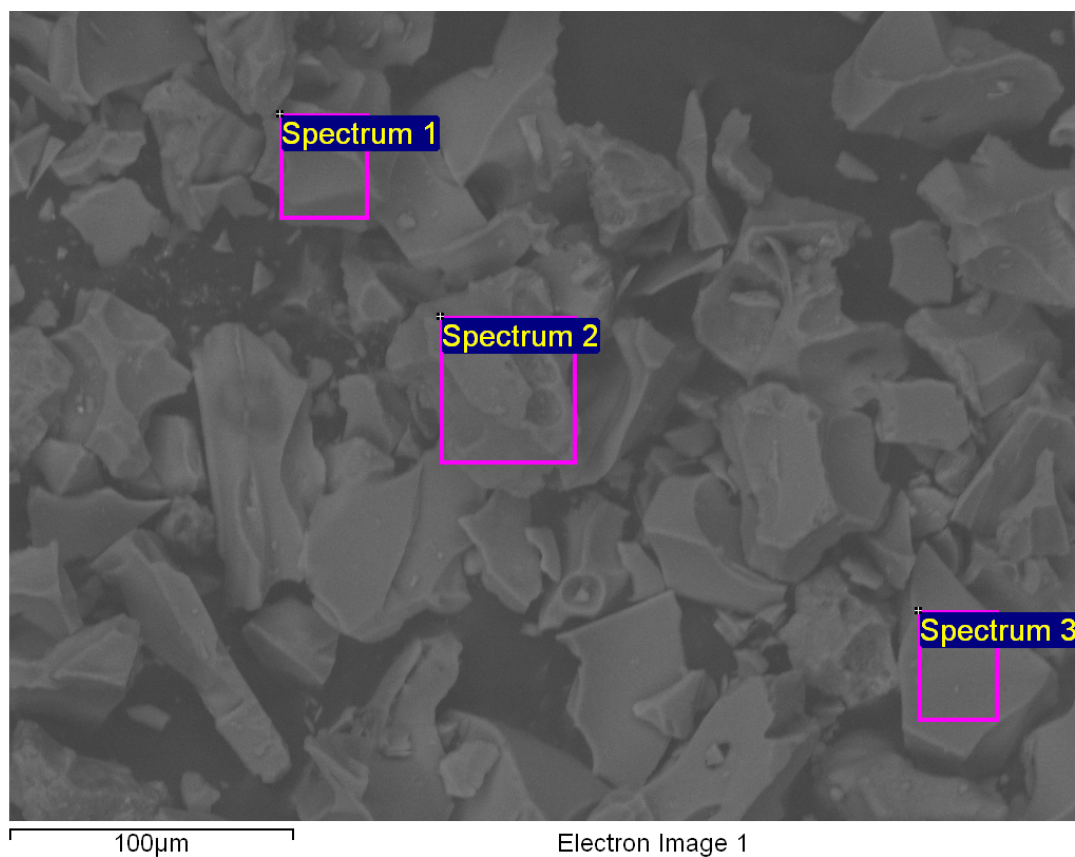
Figur 4.18: Figuren viser bilder tatt med SEM (scanning electron mikroskop) av askepartikler med størrelse $<63 \mu\text{m}$. Ulik forstørrelse er benyttet på de ulike bildene.



Figur 4.19: Figuren viser også resultat fra SEM, men dette er askefraskjonene < 2mm, vist i ulike forstørrelser

4.4.2 Distribusjon av grunnstoff i atomprosent (BEI-modus)

Her vises resultater i BEI-modus, for distribusjon av grunnstoff på overflaten av askepartiklene med henholdsvis størrelse <63 μm , og <2 mm, i atomprosent.

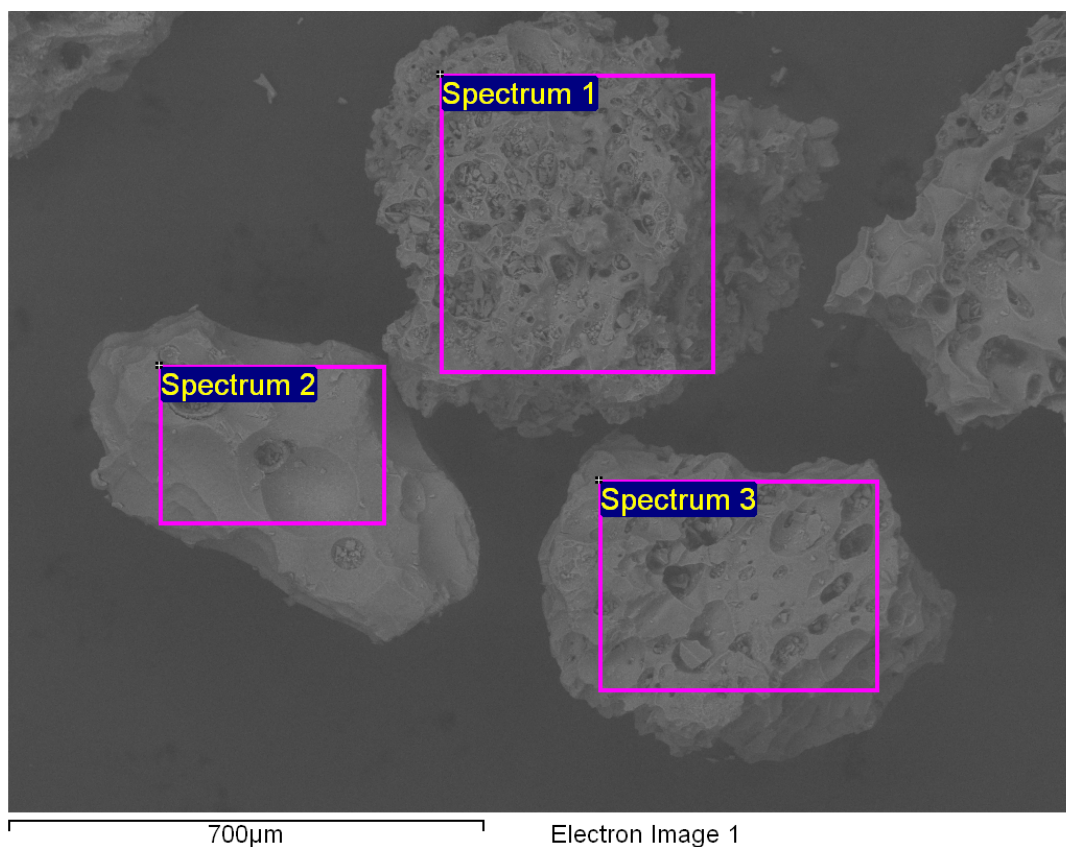


Figur 4.20: Figuren viser hvilke områder av partiklene, som har blitt analysert i bei-modus. Disse partiklene er mindre enn 63 μm .

Resultatet fra analysen av spekterne fra figur 4.20, er oppgitt som atomprosent, i Tabell 4.8.

Tabell 4.8: tabellen viser en prosentvis fordeling mellom grunnstoffene, fra spekter 1, 2 og 3 vist i figur 4.20.

Spectrum	In stats.	C	O	Na	Mg	Al	Si	K	Ca	Ti	Fe
Spectrum 1	Yes	22.1	57.2	1.3	1.8	3.1	9.8	0.1	2.0	0.4	2.2
Spectrum 2	Yes	25.9	54.6	1.2	1.6	2.9	9.1	0.1	1.9	0.5	2.3
Spectrum 3	Yes	23.2	52.9	1.2	1.8	3.4	11.4	0.2	2.7	0.5	2.7
Mean		23.7	54.9	1.3	1.7	3.1	10.1	0.1	2.2	0.5	2.4
Std. deviation		2.0	2.2	0.1	0.1	0.2	1.2	0.0	0.4	0.1	0.3



Figur 4.20: Figuren viser partikler <2 mm, og hvilke områder som har blitt analysert i bei modus.

Resultatet fra analysen av spekterne vist i figur 4.21, er oppgitt som atomprosent, i tabell 4.6. Som figur 4.21, og 4.20 viser, så viser analysen av askepartiklene i BEI-modus også noe topografi, men ikke fullt så tydelig som SEI-modus, da emisjons/reaksjons-volumet i BEI er mindre enn SEI (se teori).

Tabell 4.9: tabellen viser resultatene, som en prosentvis fordeling (atomprosent), for spekterne i figur 4.21.

Spectrum	In stats.	C	O	Na	Mg	Al	Si	K	Ca	Ti	Fe
Spectrum 1	Yes	25.5	55.0	1.2	1.5	2.7	8.8	0.1	1.9	0.5	2.7
Spectrum 2	Yes	25.7	55.1	0.9	1.4	2.7	9.4	0.1	1.7	0.5	2.6
Spectrum 3	Yes	14.9	60.7	1.5	1.9	3.6	11.6	0.1	2.3	0.5	2.9
Mean		22.0	56.9	1.2	1.6	3.0	9.9	0.1	2.0	0.5	2.7
Std. deviation		6.1	3.3	0.3	0.3	0.5	1.5	0.0	0.3	0.0	0.2

4.4.3 Diskusjon av resultater fra SEM

Analyse av partiklene i SEM i SEI modus (fig 4.18 og 4.19) som gir et bilde av topografien i prøven, viser at ingen av partiklene er like, og at overflaten kan variere betraktelig. Analysen av partiklene mindre enn 2 mm, gitt i figur 4.19, viser at disse ikke er homogene/har et homogent utseende. Dette har heller ikke partiklene i figur 4.18, som er partikler mindre enn 63 μm .

BEI-modus og røntgenmicroanalyse ble også benyttet for å se etter ulikheter i komposisjon/innholdsstoffer på overflaten til askepartiklene, ved å se på den prosentvise fordelingen av grunnstoff i et avgrenset område på ulike partikler. Som figur 4.20 og 4.21 viser så er fargen jevnt grå på alle partiklene, det er ingen svært lyse eller svært mørke områder på partiklene. Dette ville ha indikert henholdsvis tilstedeværelsen av tyngre eller lettere grunnstoff der fargeforandringen i bildet var. Fordi dette ikke var tilfellet, og fordi tabell 5 og 6, viser en tilnærmet lik prosentvis fordeling av grunnstoff (atomprosent), tyder dette på en homogen overflatekomposisjon. Spekter 3 i begge tabellene, gir en litt høyere verdi for Si, Al og Ca, og dette viser at selv om overflatekomposisjonen er tilnærmet homogen, er det allikevel noe variasjon. Gjennomsnittet for analysen av fraksjonen <63 μm , gav et lavere standardavvik på de fleste grunnstoffene, noe som ikke er uvanlig, fordi disse partiklene er mer homogene i størrelse.

4.5 Resultat CHN-analysen

Både verdiene for total nitrogen og karbon ligger under deteksjonsgrensen på 0,05 %, så ingen av størrelsesfraksjonene av asken inneholder verken karbon eller nitrogen. I studiene foretatt av Duggan et al. (2007) ble det funnet et nitrogen-innhold i asken, (ved hjelp av agitation experiments). Så en annen type aske, kan inneholde N.

Kan hende skyldes den begrensede veksten av alger i flere av forsøkene mangel på nitrogen, som ikke var tilstede på asken. Alle andre næringsstoffer, som kan virke begrensende på vekst av alger i gjennomsnittlig saltvann, ble vist å være tilstede i små konsentrasjoner.

4.6 Sammenlikninger med andre studier i litteraturen

Frogner et al. (2001) var de først til å undersøke løseligheten av jern og andre micro og macronæringsstoffer til aske i kontakt med sjøvann (ved hjelp av "flow through" eksperimenter). Ulike mengder av ulike størrelsesfraksjoner av prøver fra forskjellige steder ("tectonic settings") har blitt benyttet, og jern løses alltid ut (Duggan et al. 2007; Frogner et al. 2001; Olgun et al. 2011). Det har også blitt vist at asken behøvde kort kontakttid, for å løse

ut høye konsentrasjoner av disse næringsstoffene. I forsøk 3, med alger ble det vist at dette kan stemme også her. Kort kontaktid mellom akse og vann ble gjennomført, og det allikevel ble observert en høyere økning i celletall over tid i disse prøven, i forhold til blankprøvene. I den sekvensielle ekstraksjonen er det kun Si og Mn, som er over kvantifikasjonsgrensen når kun saltvann blir brukt som løsemiddel. Men det faktum at det har blitt påvist vekst i prøve i forhold til blank, tyder på at noen andre næringsstoff også kan ha blitt løst ut, da den økte veksten mest sannsynlig ikke bare skyldes Mn og Si.

Den sekvensielle ekstraksjonen, samt dekomponeringen foretatt på asken viser også at jern løses ut. Men i disse metodene, bortsett fra fraksjon 1 i den sekvensielle ekstraksjonen, benyttes sterkere ekstraksjonsmidler eller reagenser for å ekstrahere næringsstoffene fra asken. Dekomponeringen blir blant annet benyttet for å få en totalbestemmelse av innholdet av næringsstoffer i asken.

Mange ulike ratioer av aske:løsemiddel er benyttet i de ulike studiene, og det finnes ingen enkelt anbefaling på dette (duggan 2010). Men for å ta utgangspunkt i studien til Duggen et al. (2007), så ble ratioen 1:400 benyttet. Det skal tilsvare askemengder på et par centimeter på havbunnen (et middels stort vulkanutbrudd).

Duggen et al. (2007), utførte også et vekstforsøk med en diatome, og det ble benyttet sjøvann med tilsatt overskudd av alle næringsstoffer som trengs, bortsett fra jern. Sjøvannet brukt til å dyrke tre av seks kulturer fikk være i kontakt med asken i en kort tidsperiode (15-20 min). Det ble påvist en vekst av algene tilsatt fertilisert sjøvann, ved hjelp av målinger av fotosyntetisk effektivitet (Fv/Fm) og klorofyll (chl a). I forsøk 3, så ble det påvist en øket vekst, som hos Duggen et al. (2007), men her er andre parametere målt. I tillegg til at en annen algetype er benyttet.

4.7 Forslag til videre arbeid

Som teorien beskriver så kan samhandlingen til asken med askesøylen ha vært for kort til at betydelige mengder av næringsstoffer har blitt adsorbent til overflaten. Derfor hadde det vært nyttig å ha med aske som har blitt transportert over større avstander, for å undersøke om disse ville hatt en annen sammensetning av næringsstoffer, samt om de ville ha frigitt mer biotilgjengelige grunnstoffer.

Som nevnt under sammenlikning med litteraturen, så har det blitt utført *in vitro* eksperimenter hvor et overskudd av alle næringsstoffer er tilsatt saltvann, bortsett fra jern, for å undersøke

om en tilsetning av vulkanaske vil føre til en oppblomstring av alger. Det ble påvist en større vekst i prøver tilsatt aske. Denne undersøkelsen kunne med fordel ha blitt undersøkt med asken fra Grimsvötn også, for å enten bekrefte eller avkrefte at teorien stemmer for denne asken. I tillegg så finnes det flere områder hvor vekst er begrenset av tilgang på jern, så dette er en høyst aktuell problemstilling, som fortjener videre undersøkelser, (og eventuelt bekreftelser).

Det kunne også vært utført en undersøkelse om det ved et overskudd av macronæringsstoffene i vannet, tilsvarende forholdene i områder med høy tilgang på disse (HNLC-områder, som "subarctic northeast Pacific" (Hamme et al. 2010)), gav noen funksjon av å tilsette aske. Et forhold hvor kun nitrogen er tilstede i overskudd hadde også vært interessant å se på, for å undersøke om det er tilgangen på nitrogen som har virket begrensende på veksten av algene (da det ikke ble funnet noe nitrogen i asken ved analyse på CHN).

Det som i vekstforsøkene kanskje fører til den største usikkerheten, er asken. Den burde ikke bli tilsatt direkte i algerørene, da dette ikke vil være naturlig. Asken vil nokså raskt sedimentere gjennom den opplyste sonene i havet hvor alger lever. I tillegg så vil asken virke inn på målingene av turbiditet og tørrvekt, og til dels celledellingene. Derfor burde kun indirekte tilsetning foretas, og asken bør skilles fra saltvannet enten ved for eksempel filtrering eller sentrifugering.

Videre bruk av SEM, og sammenlikning av mapping av aske-partikler som er uberørte, med partikler som har vært i kontakt med saltvann, for å undersøke om det ville gi noen forskjell i forhold til overflatekomposisjonen av grunnstoff, kunne vært interessant å utføre.

Kun tørrtilsetning (dry deposition) av aske ble forsøkt, men det hadde også vært spennende å forsøke å se på/simulere en våtavsetning av aske. Dette er hva som skjer når aske samhandler med "sky-vann" (cloud water). Løseligheten til jern øker med minkende pH, som er tilstede i "sky-vannet" (Duggen et al. 2010).

5. Konklusjon

Generelt er presisjon og nøyaktighet i metodene som benyttes for å analysere askens innholdsstoffer, med hensyn på totalinnhold i de ulike størrelsesfraksjonene (0-63, 63-90, 90-212, 212-600, 600-1000 og 1000-2000 μm) og den sekvensielle ekstraksjonen (< 2 mm) tilfredsstillende.

Resultatet av analysen av størrelsesfraksjonene, viser at den minste størrelsesfraksjonen (< 63 μm) inneholdt en noe høyere konsentrasjon næringsstoffer enn resten av fraksjonene. Analysen av asken på SEM viste at overflatekomposisjonen med hensyn på prosentvis fordeling av grunnstoff var homogen, på tross av inhomogen morfologi og størrelse.

Hoveddelen av det som ble løst ut under den sekvensielle ekstraksjonen er irreversibelt bundet, og lite biotilgjengelig. Av totalinnholdet for hvert grunnstoff, så er kun cirka 4 % Mn, 4 % Si, 9 % Zn, 11 % P, 0,2 % Fe, 8 % Cu, and 3 % Co reversibelt bundet.

Totalt sett så ble det løst ut mest jern og silisium i både den sekvensielle ekstraksjonen og analysen av av asken fordelt etter størrelse. Andre næringsstoffener utgjør en liten andel av totalen. Ifølge analysen på CHN inneholdt ikke asken N.

Den største bidragsyteren til usikkerheten i målingene av algevekst er den tilsatte asken. Den fører til at målingene av turbiditet og tørrvekt blir vanskelige å tolke. Celletellingen er også svært varierende, og fører med seg en betydelig usikkerhet, enda den kanskje i mindre grad enn de andre målingene vil påvirkes av asken.

Vulkanasken fra Grimsvötn inneholder næringsstoffer som algene trenger for å reprodusere. Det ble vist ved hjelp av algeforsøk *in vitro* at saltvann som har vært i kort kontakt med aske (<2 mm) kan gi en økt vekst av alger (*Tetraselmis suecica*), i forhold til alger tilsatt saltvann. Det ble også lagt ned en påstand om at en økende tilsetning av aske direkte til et algerør som inneholder et overskudd av næring vil kunne hemme veksten, men dette ble ikke bekreftet av den statistiske analysen. Den viste bare til en parallellforskyvning, og ikke at vekst var forskjellig over tid. Men dersom denne analysen hadde blitt foretatt med samspill, og kanskje med felles startpunkt, så kunne resultatene blitt annerledes. Men dette ble for avansert, så videre analyser behøves.

I enda andre algeforsøk ble det også kun vist at alger dyrket i saltvann, både tilsatt en liten mengde aske (<63 μm) direkte, og en større mengde aske indirekte (av både askefraksjon <63 μm og < 2mm), gav en parallellforskyvning av celletall for algene behandlet med <63 μm aske, i forhold til ubehandlet/blankprøven. Det var ikke statistisk mulig å skille behandlet med aske <2 mm fra ubehandlet. Så vekst i forhold til tid var den samme. Det at ikke flere forsøk viste forskjell i vekst fra prøve til blank, kan skyldes mengden med næringsløsning (medium) som tilsettes prøvene sammen med den konsentrerte algeløsningen. Dersom denne mengden

er stor i forhold til konsentrasjonen av næringsstoffer løst fra asken, vil ikke effekten av asken bli signifikant.

Det er vanskelig å si hvor stor effekt en algeoppblomstring kan ha på opptak og lagring av CO₂. Ulike studier har vist at det kan ha en effekt, men at den ikke nødvendigvis er stor . Næringsbudsjettet i havoverflaten kan endres, og vekst av alger stimuleres i områder med begrenset tilgang på mikronæringsstoffer, som jern, som følge av en tilsetning av aske.

Mer forskning trengs på området, samt flere statistiske analyser. En svakhet med forsøksoppsettene, var at den direkte tilsetningen av aske i algerør, ikke vil være naturlig, da asken raskt vil synke ned gjennom den opplyste sonen i havet.

6. Referanser

- Becker, E. W. (1994). *Microalgae: biotechnology and microbiology*, b. 10: Cambridge University Press. 292 s.
- Beer, J., Mende, W. & Stellmacher, R. (2000). The role of the sun in climate forcing. *Quaternary Science Reviews*, 19 (1–5): 403-415.
- Boss, C. B. & Freedden, K. J. (1997). *Concepts, instrumentation and techniques in inductively coupled plasma optical emission spectrometry*. second utg. USA: Perkin-Elmer Corporation. 125 s.
- Brand, L. & Guillard, R. (1981). The effects of continuous light and light intensity on the reproduction rates of twenty-two species of marine phytoplankton. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 50 (2-3): 119-132.
- CICERO. (2010). Klima forklart: Strålingspådriv, <http://www.cicero.uio.no/webnews/index.aspx?id=11321>, funnet 22/2 2012.
- CICERO. (2012). Faktaark 4: FNs klimapanel og klimaskeptikerne. <http://www.cicero.uio.no/webnews/index.aspx?id=11148>, funnet 13/4 2012.
- Culture Collection of Algae and Protozoa. (2002). f/2 Medium. Dunstaffage Marine Laboratory, Oban, Argyll, PA37 1QA, UK.
- Dahl, I. E. E. (2012). *Personlig meddelelse, IR-celle*. IPM, UMB, Ås.
- Delmelle, P., Lambert, M., Dufrière, Y., Gerin, P. & Óskarsson, N. (2007). Gas/aerosol–ash interaction in volcanic plumes: New insights from surface analyses of fine ash particles. *Earth and Planetary Science Letters*, 259 (1–2): 159-170.
- Dow, K. & Downing, T. E. (2011). *The atlas of climate change: mapping the world's greatest challenge*. London: Earthscan. 128 s. s.
- Doyle, J. (2011). *Mediating climate change: Julie Doyle*. Farnham: Ashgate. 182 s. s.
- Duggen, S., Croot, P., Schacht, U. & Hoffmann, L. (2007). Subduction zone volcanic ash can fertilize the surface ocean and stimulate phytoplankton growth: Evidence from biogeochemical experiments and satellite data. *Geophysical research letters*, 34 (1).
- Duggen, S., Olgun, N., Croot, P., Hoffmann, L., Diete, H., Demelle, P. & Teschner, C. (2010). The role of airborne volcanic ash for the surface ocean biogeochemical iron cycle: a review. *Biogeosciences*, 7: 827-844.
- Durant, A., Villarosa, G., Rose, W. I., Delmelle, P., Prata, A. J. & Viramonte, J. G. (2011). Long-range volcanic ash transport and fallout during the 2008 eruption of Chaitén volcano, Chile. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C*.
- Fabregas, J., Abalde, J., Herrero, C., Cabezas, B. & Veiga, M. (1984). Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture*, 42 (3-4): 207-215.
- Falkowski, P. G., Barber, R. T. & Smetacek, V. (1998). Biogeochemical Controls and Feedbacks on Ocean Primary Production. *Science*, 281 (200): 200-206.
- Filgueiras, A., Lavilla, I. & Bendicho, C. (2002). Chemical sequential extraction for metal partitioning in environmental solid samples. *J. Environ. Monit.*, 4 (6): 823-857.
- Frogner, P., Gíslason, S. R. & Óskarsson, N. (2001). Fertilizing potential of volcanic ash in ocean surface water. *Geology*, 29 (6): 487.
- Fuglestedt, J. & Murvoll, M. (2009). Noen sentrale konklusjoner i andre hovedrapport fra FN's klimapanel (IPCC 1995).
- Goldstein, J. I., Newbury, D. E., Echlin, P., Joy, D. C., Romig, A. D., Lyman, C. E., Fiori, C., and Lifshin, E. (2003). *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis*: Springer.
- Hamme, R. C., Webley, P. W., Crawford, W. R., Whitenev, F. A., DeGrandpre, M. D., Emerson, S. R., Eriksen, C. C., Sabine, C. L., Batten, S. D., Coogan, L. A., et al. (2010). Volcanic ash fuels anomalous plankton bloom in subarctic northeast Pacific. *Geophysical research letters*, 37 (L19604): 5.
- HANNA instruments. (1998). Instruction manual HI-93703 Portable microprocessor turbidity meter. 23.

- Harris, D. C. (2010). *Sample preparation*. Harris, D. C. (red.). Quantitative Chemical Analysis. Eighth Edition. New York: W. H Freeman and Company/Clancy Marshall.
- Hausser Scientific. (2010). *Counting Chambers Fuchs-Rosenthal*, <http://www.hausserscientific.com/products/fuchs-rosenthal.html>. Horseham, PA: Hausser Scientific (lest 29.09).
- Healey, F. (1973). Inorganic nutrient uptake and deficiency in algae. *Critical Reviews in Microbiology*, 3 (1): 69-113.
- Hecky, R. E. & Kilham, P. (1988). Nutrient Limitation of Phytoplankton in Freshwater and Marine Environments: A Review of Recent Evidence on the Effects of Enrichment. *Limnology and Oceanography*, 33 (4): 796-822.
- Helsel, D. R. (1990). Less than obvious-statistical treatment of data below the detection limit. *Environmental science & technology*, 24 (12): 1766-1774.
- Helsel, D. R. (2006). Fabricating data: how substituting values for nondetects can ruin results, and what can be done about it. *Chemosphere*, 65 (11): 2434-2439.
- Henriksen, T. & Kanestrøm, I. (2000). *Energi, klima, natur, miljø*. Oslo: Gyldendal akademisk. 348 s. s.
- IPCC. (2012). *Organization*. <http://www.ipcc.ch/organization/organization.shtml#.T5UX59UzCS0>,funnet 23/4 2012.
- Jensen, K. A. (2011). Lukket dekomponering med ultraclave®. KJM-340-Instrumentell uorganisk analyse, IPM, UMB, ÅS: 1-3.
- Jensen, K. A. (2012). *Personlig meddelelse*. Ås.
- Jones, M. T. & Gislason, S. R. (2008). Rapid releases of metal salts and nutrients following the deposition of volcanic ash into aqueous environments. *Geochimica et cosmochimica acta*, 72 (15): 3661-3680.
- Jung, S., Rickert, D., Deak, N., Aldin, E., Recknor, J., Johnson, L. & Murphy, P. (2003). Comparison of Kjeldahl and Dumas methods for determining protein contents of soybean products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80 (12): 1169-1173.
- Kirkpatrick, J., Enion, D. & Burd, D. (1995). Hydrofluoric acid burns: a review. *Burns*, 21 (7): 483-493.
- Krogstad, T. (2009). Laboratoriemetoder til emnet JORD 212, Jordanalyse. 36.
- Kroth, P. G., Chiovitti, A., Gruber, A., Martin-Jezequel, V., Mock, T., Parker, M. S., S.Stanley, M., Kaplan, A., Caron, L., Weber, T., et al. (2008). A Model for Carbohydrate Metabolism in the Diatom *Phaeodactylum tricornutum* Deduced from Comparative Whole Genome Analysis. *PLoS ONE*, 3 (1): 14.
- Lackner, K. S. (2002). Carbonate chemistry for sequestering fossil carbon. *Annual Review of Energy and the Environment*, 27: 193-232.
- Lackner, K. S. (2003). A guide to CO2 sequestration. *Science*, 300 (5626): 1677.
- Lohne, S. (2011). Metodeutvikling på ICP-OES. KJM-340-Instrumentell uorganisk analyse, IPM, UMB, ÅS: 5.
- Løvås, G. G. (2004). Analyse av sammenhenger. I: Løvås, G. G. (red.) *Statistikk for universiteter og høyskoler*. Oslo: Universitetsforlaget.
- Mackey, E. A., Christopher, S. J., Lindstrom, R. M., Long, S. E., Marlow, A. F., Murphy, K. E., Paul, R. L., Popelka-Filcoff, R. S., Rabb, S. A., Sieber, J. R., et al. (2010). Certification of Three NIST Renewal Soil Standard Reference Materials for Element Content: SRM 2709a San Joaquin Soil, SRM 2710a Montana Soil 1, and SRM 2711a Montana Soil 2. *National Institute of Standards and Technology Special Publication 260-172*.
- Minitab 15. (2012). Boxplots. *Minitab Hjelp*.
- National Bureau of Standards. (1982). Standard Reference Material 1646 Estuarine Sediment. Washington, D. C 20234.
- National Institute of Standards and Technology. (2009). Standard Reference Material® 2709a San Joaquin Soil - Baseline Trace element Concentrations. Gaithersburg, MD 20899.
- Olgun, N., Duggen, S., Croot, P. L., Delmelle, P., Dietze, H., Schacht, U., Óskarsson, N., Siebe, C., Auer, A. & Garbe-Schönberg, D. (2011). Surface ocean iron fertilization: The role of airborne

- volcanic ash from subduction zone and hot spot volcanoes and related iron fluxes into the Pacific Ocean. *Global Biogeochem. Cycles*, 25 (4): GB4001.
- Oskarsson, N. (1980). The interaction between volcanic gases and tephra: fluorine adhering to tephra of the 1970 Hekla eruption. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 8: 251-266.
- Oughton, D. H. & Lind, O. C. (2011). *Metodebeskrivelse for sekvensiell ekstraksjon (jord, sediment)*. Ås. 8 s.
- Quorum Technologies Ltd. SC7640 Auto/Manual High Resolution Splutter Coater Operating Manual. (1): 36.
- Richmond, A. (1986). *CRC Handbook of microalgal mass culture*: CRC Press. 528 s.
- Roksti, S. (2012). *Personlig meddelelse*. Ås: Senter for Klimaregulert Planteforskning.
- Rose Jr, W. I. (1977). Scavenging of volcanic aerosol by ash: Atmospheric and volcanologie implications. *Geology*, 5: 621-624.
- Skoog, D. A., Holler, F. J. & Crouch, S. R. (2007a). An Introduction to Infrared Spectrometry. I: Skoog, D. A., Holler, F. J. & Crouch, S. R. (red.) *Principles of Instrumental Analysis -Sixth Edition*. Belmont: David Harris.
- Skoog, D. A., Holler, F. J. & Crouch, S. R. (2007b). An Introduction to Spectrometric Methods. I: Skoog, D. A., Holler, F. J. & Crouch, S. R. (red.) *Principles of Instrumental Analysis -sixth edition*. Belmont: David Harris.
- Standing, W. J. F. (2002). *Remobilisation of Trace Elements from Soils and Sediments: Biological Relevance to Estuarine Ecosystems*: Agricultural University of Norway, Department of Soil and Water Sciences.
- Stumm, W. & Morgan, J. J. (1996). *Aquatic chemistry: chemical equilibria and rates in natural waters*. New York: Wiley. XVI, 1022 s. s.
- Taylor, G. E. & Barrett, M. R. (2009). Canada's experience in emission trading and related legal issues. I: Freestone, D. & Streck, C. (red.) *Legal aspects of carbon trading: Kyoto, Copenhagen and beyond*, s. LVII, 657 s. Oxford: Oxford University Press.
- Tessier, A., Campbell, P. G. C. & Bisson, M. (1979). Sequential extraction procedures for the speciation of particulate trace metals. *Analytical chemistry*, 51 (7): 844-851.
- Thomas, W., Seibert, D., Alden, M., Neori, A. & Eldridge, P. (1984). Yields, photosynthetic efficiencies and proximate composition of dense marine microalgal cultures. II. *Dunaliella primolecta* and *Tetraselmis suecica* experiments. *Biomass*, 5 (3): 211-225.
- Tiessen, H. & Moir, J. O. (1993). Total and organic carbon. I: R.Carter, M. (red.) *Soil samplin and methods of analysis*, s. 187-199: Lewis publishers.
- United Nations. (1998). Kyoto protocol to the united nations framework convention on climate change.
- vanLoon, G. W. & Duffy, S. J. (2005a). Atmospheric aerosols. I: Gary W. vanLoon, S. J. D. (red.) *Environmental chemistry, a global perspective*, s. 125-141. New York: Oxford University Press.
- vanLoon, G. W. & Duffy, S. J. (2005b). The chemistry of global climate. I: *Environmental Chemistry - A global perspective*, s. 164-194. Oxford: Oxford University Press.
- vanLoon, G. W. & Duffy, S. J. (2005c). The hydrosphere. I: Gary W. vanLoon, S. J. D. (red.) *Environmental chemistry, a global perspective*, s. 197-210. New York: Oxford University Press.
- Watson, A. J. (1997). Volcanic iron, CO₂, ocean productivity and climate. *Nature*, 385 (6617): 587-588.
- Weart, S. (2003). *The Discovery of Global Warming*. Cambridge: Harward University Press.
- Økland, J. & Økland, K. A. (2006). *Vann og vassdrag 3. Kjemi, fysikk og miljø*. 2. utgave.

Vedlegg 1 – Sekvensiell ekstraksjon

Sekvensiell ekstraksjons tabell med utregnet gjennomsnitt, deteksjon og kvantifikasjonsgrenser vises her. Utregningen fra resultatene oppgitt i mg/L , til mg/g som er lik g/kg, og videre til milligram per kg ble utført etter følgende likninger:

$$\frac{\text{Konsentrasjon grunnstoff} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) * \text{antall ml løsning}}{1000 \frac{\text{ml}}{\text{l}} * \text{vekt (g)}} = \text{mg/g} = \text{g/kg}$$

$$\text{g/kg} * 1000 \text{ mg/g} = \text{mg/kg}$$

Tabell 1: Tabellen viser en oversikt over resultatene fra analysen av prøvene fra den sekvensielle ekstraksjonen på ICP-OES. En oversikt over de ulike grunnstoffene det ble analysert på, sammen med deteksjons og kvantifikasjonsgrense, og eventuelle verdier for prøvene over dette, er oppgitt i tabellen i mg/kg.

Grunnstoff	Fraksjon	Deteksjonsgrense (LOD)	Kvantifikasjonsgrense (LOQ)	Prøve-gjennomsnitt	SD
Co	I	0,19	0,62	<LOD	
	II	0,016	0,052	<LOD	
	III	0,0055	0,018	<LOQ	
	IV	0,0061	0,02	0,42	0,026
	V	0,016	0,054	0,29	0,012
	VI	0,068	0,23	3,4	0,13
Cu	I	0,1	0,34	<LOQ	
	II	0,0056	0,019	0,313	0,0070
	III	0,0089	0,03	0,502	0,0064
	IV	0,0058	0,019	1,18	0,078
	V	0,022	0,074	2,83	0,12
	VI	0,019	0,065	7,93	0,35
Fe	I	0,55	1,8	<LOQ	
	II	0,011	0,037	0,3	0,28
	III	0,021	0,071	17	1,1
	IV	0,36	1,2	770	25,1
	V	0,12	0,39	42	4,0
	VI	0,66	2,2	7400	230
Mn	I	0,00094	0,0031	2,9	0,16
	II	0,0023	0,0076	1,12	0,074
	III	0,002	0,0066	1,4	0,14
	IV	0,0076	0,025	14,1	0,44
	V	0,022	0,073	3,4	0,21
	VI	0,023	0,077	111	4,4
Si	I	0,84	2,8	19	1,1
	II	0,12	0,39	4,3	0,21
	III	0,079	0,26	11,6	0,75
	IV	0,12	0,39	350	9,6
	V	0,28	0,92	260	15
	VI	0,26	0,87	189	3,2

Zn	I	1,7	5,6	<LOD	
	II	0,032	0,11	<LOD	
	III	0,029	0,096	0,16	0,065
	IV	0,013	0,044	1,06	0,025
	V	0,034	0,11	0,38	0,02
	VI	0,036	0,12	9,2	0,36
P	I	3,9	12,8	<LOD	
	II	0,23	0,75	1,11	0,081
	III	0,17	0,56	4,6	0,19
	IV	0,21	0,71	7,1	0,6
	V	0,6	2	0,51	0,077
	VI	0,69	2,3	56	1,9

Tabell 2: Tabellen viser totalinnholdet, summert over de ulike fraksjonene fra den sekvensielle ekstraksjonen, gitt i g/kg.

	Totalinnhold (g/kg)
Mn	0,134
Si	0,834
Zn	0,0137
P	0,0757
Fe	8,23
Cu	0,0129
Co	0,00446

Vedlegg 2 – Analyse av størrelsesfraksjoner av aske

Tabell 1: Tabellen viser en oversikt over grunnstoffkonsentrasjon i hver størrelsesfraksjon, hvor n=3, i g/kg, samt deteksjon (LOD) og kvantifikasjonsgrenser (LOQ), utregnet fra standardavvik til blankprøvene ganget med henholdsvis 3 og 10.

Størrelse (µm)	Co		Cu		Mn		P		Zn		Fe		Si	
	Snitt	SD	Snitt	SD	Snitt	SD	Snitt	SD	Snitt	SD	Snitt	SD	Snitt	SD
0-63	0,00340	0,000034	0,0146	0,00043	0,119	0,0017	0,046	0,0017	0,0097	0,00014	7,55	0,076	0,73	0,059
63-90	0,00241	0,000091	0,0100	0,00018	0,079	0,0016	0,0347	0,00043	0,00620	0,000040	5,1	0,10	0,7	0,10
90-212	0,00243	0,000053	0,0099	0,00026	0,078	0,0011	0,036	0,0010	0,00604	0,000056	4,90	0,0080	0,68	0,048
212-600	0,0024	0,00010	0,0093	0,00091	0,069	0,0030	0,038	0,0014	0,0055	0,00027	4,5	0,16	0,566	0,0056
600-1000	0,0023	0,00025	0,0096	0,00036	0,071	0,0042	0,033	0,0029	0,0057	0,00023	4,5	0,27	0,52	0,054
1000-2002	0,0024	0,00027	0,012	0,0013	0,078	0,0035	0,037	0,0087	0,0065	0,00052	5,0	0,28	0,46	0,039
Blank	LOD	0,00020	0,00013	0,0116	0,00015	0,00042	0,082	0,00087						
	LOQ	0,00066	0,00043	0,039	0,00051	0,0014	0,28	0,00029						

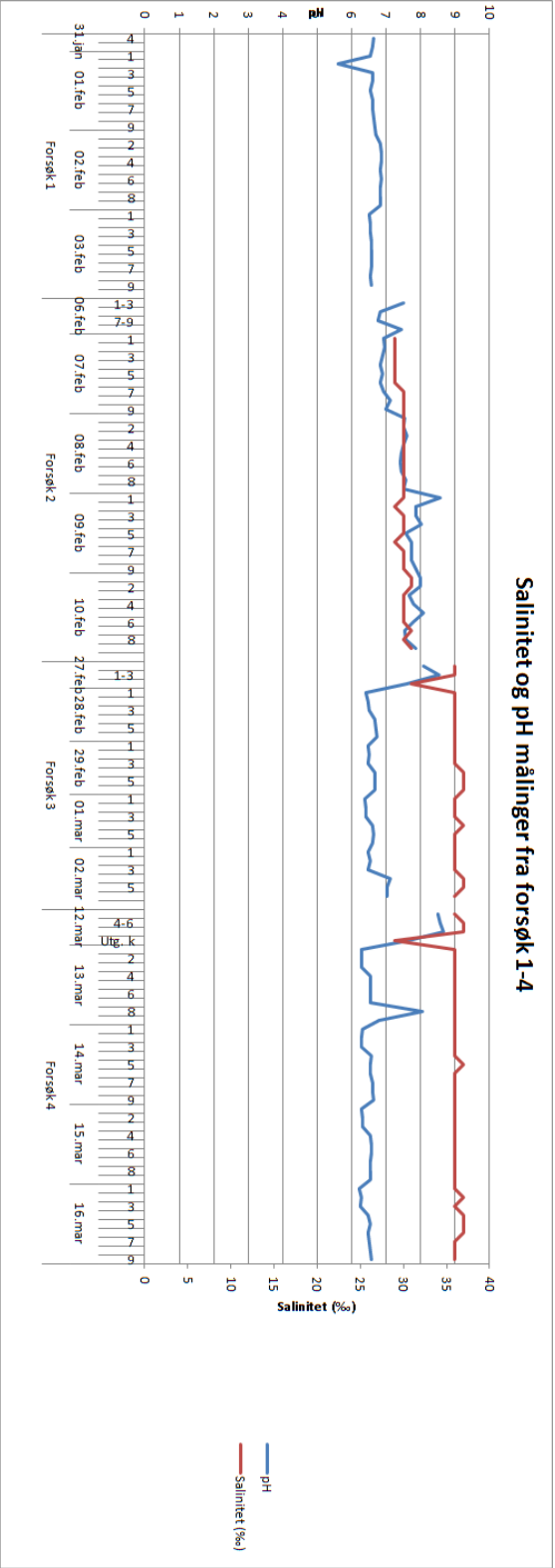
Tabell 2: Tabellen viser en oversikt over grunnstoffkonsentrasjon (g/kg) i størrelsesfraksjonen 212-600 µm dekomponert ved hjelp av HF, samt deteksjon (LOD) og kvantifikasjonsgrenser (LOQ), utregnet fra standardavvik til blanken ganget med 3 og 10.

Størrelses Fraksjon (µm)	HF	Co	Cu	Fe	Mn	P	Si	Zn
		g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg
212-600	snitt	0,00531	0,00995	8,9	0,180	0,135	14,9	0,0141
	SD	0,000095	0,000046	0,12	0,00082	0,0033	0,748	0,0000078
blank	LOD	0,00016	0,00011	0,0037	0,00013	0,0019	0,34	0,00044
	LOQ	0,00052	0,00038	0,012	0,00043	0,0062	1,1	0,0015

Tabell 3: Tabellen viser en oversikt over totalinnhold regnet ut ved å addere sammen resultatene for hvert grunnstoff for hver fraksjon, og dele det på antallet fraksjoner.

Grunnstoff	Totalinnhold (mg/kg)
Mn	82,3
Si	603,5
Zn	6,7
P	37,5
Fe	5255,7
Cu	11,0
Co	2,2

Vedlegg 3 – Salinitet og pH gjennom forsøk 1-4



Figur 1: Figuren viser en oversikt over pH og salinitet målt igjennom de ulike algedyrkningsforsøkene 1-4.

Vedlegg 4 – Oversiktstabell algeforsøk 1-4

Vedlegget viser en oversiktstabell over innhold (hva som er tilsatt) i de ulike prøvene, samt hvordan tilsetningen av aske har blitt utført.

Tabell 1: Tabellen viser en oversikt over hvilke dato de ulike forskene gikk over, hvilke prøver som er blaknprøver, og prøver, hva de ulike prøvene er tilsatt av aske, hvilken fraksjon, og om tilsetningen er såkalt direkte eller indirekte, og om forsøket er utført i saltvann eller medium Det som menes med indirekte tilsetning, er at saltvannet i prøvene har vært i kontakt med asken i ca 30 minutter, før vannet ble helt av – og benyttet videre i forsøket (forøvrig beskrevet nærmere under forsøk 3 og 4, avsnitt 3.6.5 og 3.6.6)

Forsøk nr	Dato	Blank prøver	Prøve-nr	Antall g aske tilsatt per rør (330 ml)	Aske-størrelse	Direkte/indirekte tilsetning	Vekstvilkår
1	30/1 – 3/2	7-9	1-6	0,8 g	0-63 µm	Direkte	Saltvann
2	6/2 – 10/2	7-9	1-3	0,8 g	0-63 µm	Direkte	Medie
			4-6	1,6 g	0-63 µm		
3	27/2 – 2/3	1-3	4-6	0,8	<2 mm	Indirekte	Saltvann
4	12/3 – 19/3	7-9	1-3	8,0	0-63 µm	Indirekte	Saltvann
			4-6	8,0	<2 mm		

Vedlegg 5 – Innvekt av aske forsøk 1-4

Innveid aske forsøk 1

Tabell 1: Tabellen viser innvekt av aske, med tilhørende nummer på algerør, som asken er tilsatt.

Begerglass korresponderende til alge-rør nr	Innvekt (g)
1	0,802
2	0,8270
3	0,8036
4	0,7941
5	0,8024
6	0,8236
7-9	0

Innvekt aske forsøk 2

Tabell 2: Tabellen viser innvekt av aske med tilhørende nummer på prøven det er tilsatt i.

Prøve	Utveid aske (g)
1	0,8020
2	0,8008
3	0,8018
4	1,6051
5	1,6006
6	1,6136
7-9	0

Innvekt aske forsøk 3 (indirekte tilsetning):

Algerør 1-3: 2,5068 g til 1 liter sjøvann.

Det vil si at i en homogen løsning vann, vil det være 0,8 g aske i gjennomsnitt tilsatt til hvert algerør, da $(2,5/1000)*320$ ml er 0,8 g.

Innvekt aske forsøk 4 (indirekte tilsetning):

Algerør 1-3: 24,9969 det vil si for hver 320 ml : $(24,9969\text{g}/1000\text{ml})*320\text{ml} = 7,999 \approx 8$ g.

Algerør 4-6: 24,9997 det vil si for hver 320 ml : $(24,9997\text{g}/1000\text{ml})*320 \text{ ml} = 7,999 \approx 8$ g.

Vedlegg 6 - Regresjonsanalysen av celletellinger for forsøk 1.

Regression Analysis: Celletall versus Tid; Behandling; tid**2

The regression equation is

$$\text{Celletall} = 314429 + 97354 \text{ Tid} + 39258 \text{ Behandling} - 10623 \text{ tid}^{**2}$$

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	314429	17639	17,83	0,000
Tid	97354	13072	7,45	0,000
Behandling	39258	10491	3,74	0,000
tid**2	-10623	2303	-4,61	0,000

S = 47137,0 R-Sq = 67,3% R-Sq(adj) = 66,1%

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	3	3,75547E+11	1,25182E+11	56,34	0,000
Residual Error	82	1,82196E+11	2221900515		
Total	85	5,57743E+11			

Source	DF	Seq SS
Tid	1	2,93482E+11
Behandling	1	34775817397
tid**2	1	47289218217

Unusual Observations

Obs	Tid	Celletall	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
1	0,00	318750	353687	17698	-34937	-0,80 X
2	0,00	345000	353687	17698	-8687	-0,20 X
3	0,00	297500	353687	17698	-56187	-1,29 X
52	5,00	693333	574892	11639	118441	2,59R
54	0,00	346250	314429	17639	31821	0,73 X
55	0,00	348750	314429	17639	34321	0,79 X
56	0,00	368750	314429	17639	54321	1,24 X
62	2,00	590000	466646	9668	123354	2,67R
84	5,00	422500	535634	12851	-113134	-2,49R
86	5,00	435000	535634	12851	-100634	-2,22R

R denotes an observation with a large standardized residual.

X denotes an observation whose X value gives it large leverage.

Vedlegg 7 - Regresjonsanalysen fortatt på rådata av celletellinger i forsøk 2

Regression Analysis: log celle versus Tid; Tid**2; X2; X3

The regression equation is

$$\log \text{ celle} = 13,2 + 1,15 \text{ Tid} - 0,0399 \text{ Tid}^{**2} - 0,471 \text{ X2} - 0,685 \text{ X3}$$

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	13,1800	0,0916	143,92	0,000
Tid	1,15289	0,08525	13,52	0,000
Tid**2	-0,03985	0,01865	-2,14	0,035
X2	-0,47141	0,07057	-6,68	0,000
X3	-0,68490	0,06795	-10,08	0,000

S = 0,290059 R-Sq = 95,4% R-Sq(adj) = 95,2%

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	4	174,483	43,621	518,47	0,000
Residual Error	100	8,413	0,084		
Total	104	182,897			

Source	DF	Seq SS
Tid	1	165,302
Tid**2	1	0,291
X2	1	0,343
X3	1	8,548

Unusual Observations

Obs	Tid	log celle	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
38	2,00	14,2761	14,8550	0,0616	-0,5789	-2,04R
64	3,00	16,3957	15,8086	0,0566	0,5871	2,06R
70	3,00	14,7662	15,5951	0,0529	-0,8289	-2,91R
71	3,00	14,7901	15,5951	0,0529	-0,8050	-2,82R
72	3,00	14,9576	15,5951	0,0529	-0,6375	-2,24R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Vedlegg 8 - Regresjonsanalysen fra forsøk 3

Regression Analysis: Celletall versus Tid; Behandling FORSØK 3

The regression equation is

$$\text{Celletall} = 197498 + 17413 \text{ Tid} + 58739 \text{ Behandling}$$

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	197498	9195	21,48	0,000
Tid	17413	4173	4,17	0,000
Behandling	58739	8032	7,31	0,000

$$S = 31605,8 \quad R\text{-Sq} = 54,8\% \quad R\text{-Sq}(\text{adj}) = 53,2\%$$

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	2	71346704450	35673352225	35,71	0,000
Residual Error	59	58936615129	998925680		
Total	61	1,30283E+11			

Source	DF	Seq SS
Tid	1	17928016549
Behandling	1	53418687901

Unusual Observations

Obs	Tid	Celletall	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
7	1,00	318750	214911	6404	103839	3,36R
13	1,00	143830	214911	6404	-71082	-2,30R
35	0,00	163750	256237	9362	-92487	-3,06R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Vedlegg 9 - Regresjonsanalysen fortatt på rådata av celletellinger i forsøk 4

Regression Analysis: celletall versus Tid; tid**2; X2; X3

The regression equation is

$$\text{celletall} = 286950 + 141188 \text{ Tid} - 25967 \text{ tid}^{**2} + 50496 \text{ X2} - 24002 \text{ X3}$$

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	286950	14978	19,16	0,000
Tid	141188	19691	7,17	0,000
tid**2	-25967	6273	-4,14	0,000
X2	50496	15482	3,26	0,003
X3	-24002	15129	-1,59	0,123

$$S = 37059,2 \quad R\text{-Sq} = 84,8\% \quad R\text{-Sq(adj)} = 82,7\%$$

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	4	2,29078E+11	57269413198	41,70	0,000
Residual Error	30	41201478824	1373382627		
Total	34	2,70279E+11			

Source	DF	Seq SS
Tid	1	1,74832E+11
tid**2	1	21391248043
X2	1	29398110355
X3	1	3456496018

Unusual Observations

Obs	Tid	celletall	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
3	0,00	267917	337446	14954	-69529	-2,05R
17	1,00	487917	402171	12688	85746	2,46R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Vedlegg 10 – Celletelling forsøk 1

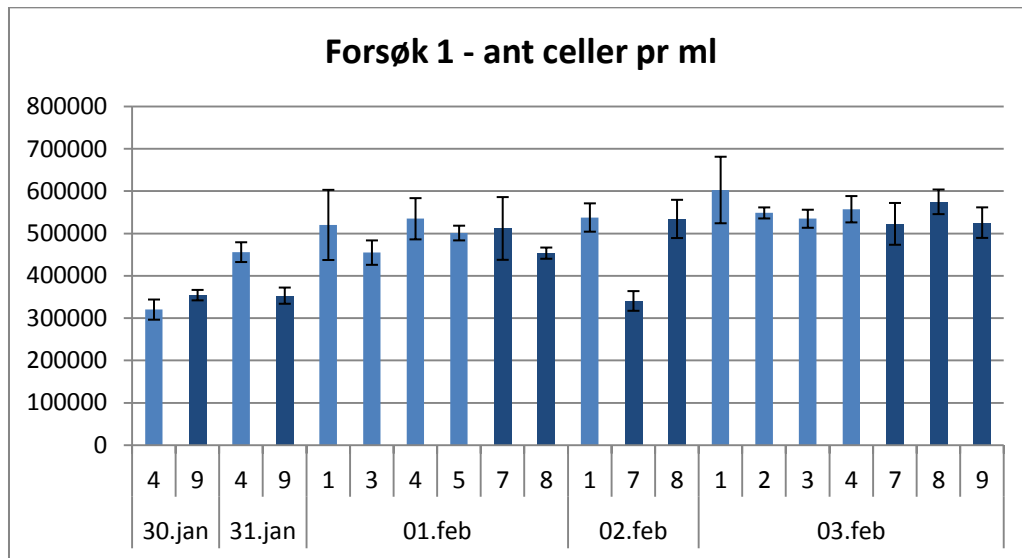


Figure 1: Figuren viser celletellinger foretatt for forsøk 1, for alle prøvene som ble talt tre ganger. Prøve 1-6 er tilsatt aske, og prøve 7-9 er blankprøver.

Vedlegg 11 - Utregning av forskjell i tørrvekt og FTU fra start til slutt i F 1-4

Tørrvekt forsøk 1:

$$\text{Prøve 9: } (0,219 \pm 0,0052) - (0,07 \pm 0,025) = 0,149 \pm 0,026$$

$$\text{Prøve 4: } (1,96 \pm 0,039) - (1,1 \pm 0,2) = 0,86 \pm 0,20$$

Den laveste veksten prøve fire kan ha er 0,66 mg/ml og den høyeste verdien som prøve ni kan ha er 0,175 mg/ml

Sammenlikner også de gjennomsnittlige verdiene:

$$\text{Prøve 7-9: } (0,220 \pm 0,020) - (0,07 \pm 0,025) = 0,15 \pm 0,032$$

$$\text{Prøve 1-6: } (1,92 \pm 0,24) - (1,1 \pm 0,2) = 0,82 \pm 0,31$$

Forskjellen mellom disse prøvenes minste og høyeste verdi er noe mindre, men fremdeles er veksten høyere i prøvene enn i blanken.