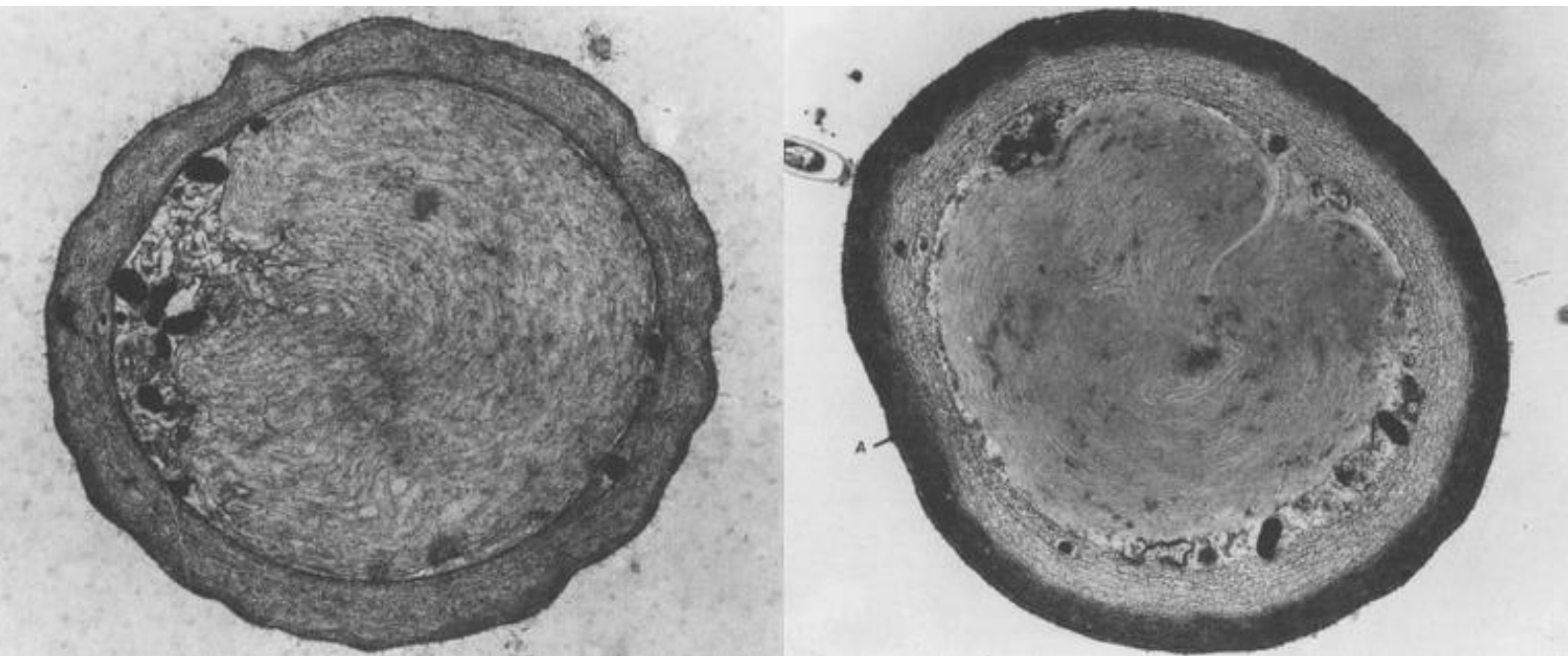


Modificering af *Ectocarpus siliculosus* ved biosorption af tungmetaller



Trine Bertram Rasmussen
Svendborg Gymnasium – 3.y
Projekt Forskerspirer 2016
Naturvidenskab

INDHOLD

1	Indledning.....	1
2	Formål og problemformulering	1
2.1	Afgrænsning	2
2	Teori og empiri og metode	2
2.1	Biosorption med alger	2
2.2	Forarbejdning af alger	3
2.3	Overproduktion af polysakkarider i cellevæggen.....	3
2.4	Biosorption med <i>Ectocarpus siliculosus</i>	3
2.5	Metode.....	4
2.5.1	Proteolytiske polysakkarid-ekstraktioner	4
2.5.1	Bestemmelse af adsorptionskapacitet med tungmetals-analyser	4
3	Projektets udførelse	5
3.5	Forsøgsbeskrivelse	5
3.5.1	Pilotforsøg	5
3.5.2	Forsøg	6
3.6	Tidsplan	6
3.7	Budget.....	7
4	Konklusion og perspektivering.....	8
5	Kontakter	9
6	En stor tak.....	9
7	Litteraturliste	10
8	Bilag	11

1 INDLEDNING

Koncentrationen af tungmetaller i mange dele af miljøet er steget gennem årene grundet industrialisering og andre menneskelige aktiviteter, hvilket er et aktuelt problem for miljøet og menneskets helbred.^{1,2} Eftersom tungmetaller er særdeles svære at nedbryde, forventes det at miljø- og sundhedsproblemer vil eksistere i mange år frem.¹

Mange traditionelle metoder til at rense spildevand for tungmetaller har adskillige ulemper. De kan fx være ineffektive eller ekstremt dyre, når der er tale om store volumener vand med lave koncentrationer af metal-ioner mellem 1 og 100 mg pr. L. De kan også kræve dyrt udstyr, producere store mængder giftigt slam, der kræver vanskelig behandling og bortskaffelse m.m.^{4,5} Der er derfor de seneste år opstået interesse for at udnytte biosorption til at fjerne tungmetaller fra spildevand, og metoden har udviklet sig til et lovende alternativ. Fordelene ved denne metode inkluderer: høj effektivitet, at den er omkostningseffektivt (især når biosorbenter genbruges og metaller udvindes til genbrug), har stærk metal-bindende kapacitet og er miljøvenlig.^{5,6} Hvis processen skal blive succesfuld, kræver det dog i høj grad velovervejede valg af biosorbent og gennemtænkt design af biosorption-processen.⁶ Brunalger har vist sig at være blandt de mest effektive og lovende biosorbenter grundet deres indhold af alginat og fucoidaner i cellevæggen, som giver dem gode metal-bindende kompetencer.³ Man kan med fordel forbehandle algerne på forskellige måder for at øge deres adsorptionskapacitet af tungmetaller.⁵

2 FORMÅL OG PROBLEMFORMULERING

Formålet med dette studie er at få bedre forståelse for, hvordan alger tilpasser sig et miljø forurenet med tungmetaller, og om denne viden evt. kunne bruges til modificering og forbehandling af alger, hvis det i fremtiden skulle blive aktuelt med alge-baserede spildevandsrensingsanlæg, der ikke blot renses for næringssalte, men for tungmetaller. Eftersom det hovedsageligt er funktionelle grupper på polysakkarider i algens cellevæg, der er ansvarlige for biosorptionen, ville det være oplagt at undersøge, hvorvidt det er muligt at modificere algen, således at den producerer flere af disse.³ Dette leder mig til følgende problemformulering:

Vil brunalgen *Ectocarpus siliculosus* overproducere polysakkarider i cellevæggen, når den udsættes for cadmium, og hvor meget vil det i så fald øge dens adsorptionskapacitet af tungmetallet?

2.1 AFGRÆNSNING

I forhold til hvorledes alger tilpasser sig forurening af tungmetaller, beskæftiger dette studie sig udelukkende med udviklingen af cellevæggens polysakkarider, da det vil blive for omfattende også at undersøge organeller, som påvirkes af tungmetallerne og evt. sammenhæng. Af hensyn til budgettet er det heller ikke muligt at undersøge flere alger eller flere tungmetaller.

Der er mange faktorer, som påvirker biosorptions-processen og hvorvidt alger succesfuldt og effektivt kan rense spildevand for tungmetaller.⁶ Dette studie beskæftiger sig derfor kun med at undersøge én mulighed for at forbehandle brunalger til formålet at optage tungmetaller fra en opløsning. Det vil stadig kræve yderligere forskning at udvikle en færdig metode til modificering med henblik på forbehandling af alger i stor skala, samt bestemme hvorvidt denne metode ville kunne betale sig omkostnings- og ressourcemæssigt.

2 TEORI OG EMPIRI OG METODE

2.1 BIOSORPTION MED ALGER

Biosorption er et begreb, som beskriver fjernelsen af metaller ved passiv binding til ikke-levende biomasse fra en vandig opløsning. Dette indebærer at mekanismen ikke er metabolisk kontrolleret.³

Biosorption er en kompleks proces, der involverer mange forskellige mekanismer, og det samlede metaloptag er ofte resultatet af en kombination af elektrostatiske interaktioner, ionbytning, kompleksdannelse, mikroudfældning m.m. Biosorption sker i algens cellevæg, hvis bestanddele indeholder funktionelle grupper, som er ansvarlige for at binde metal-ionerne i opløsningen. Antallet af aktive sider på biosorbentens overflade, tilgængeligheden og kemiske tilstand, samt affiniteten af en metal-ion for en given funktionel gruppe har direkte indflydelse på processen, hvor dette studie beskæftiger sig med førstnævnte.⁶

Brunalger har vist særlig godt potentiale som biosorbent, hvilket skyldes den ofte tykke cellevæg, som består af mindst to forskellige lag (se bilag 1), hvor polysakkaridet alginat udgør størstedelen, men også fucoidaner (sulfaterede mukopolysakkarider) spiller en rolle i forhold til biosorption.

Disse to stoffer indeholder de funktionelle grupper som giver brunalgerne deres gode evne til at fastholde tungmetaller. Alginat indeholder carboxylsyre, mens fucoidaner indeholder sulfonsyre (se bilag 2 og 3).³

2.2 FORARBEJDNING AF ALGER

En biosorbents adsorptionskapacitet defineres i dette studie som μg tungmetal, der adsorberes pr. mg biomasse. Der er mange forskellige måder, hvorpå det er muligt at behandle alger for at øge deres adsorptionskapacitet, som indebærer fysiske og/eller kemiske behandlinger.^{4,5} Til industriel anvendelse kan det være en fordel at bruge tørrede alger frem for levende af følgende grunde: (1) tørret biomasse kan opbevares i stuetemperatur; (2) de kan udnyttes som biosorbenter i lang tid uden at miste deres biosorptive evner; (3) de bliver ikke påvirket af giftigheden fra tungmetaller eller andre eventuelle stoffer; (4) tørrede alger har tilsvarende eller ligefrem højere adsorptionskapacitet end levende.^{5,6}

2.3 OVERPRODUKTION AF POLYSAKKARIDER I CELLEVÆGGEN

Eftersom det primært er polysakkariderne i algens cellevæg, der står for at binde metal-ionerne, er det oplagt at undersøge, om man kan modificere alger til at producere flere af disse, da dette ville give flere bindingssider. R. Andrade et al. (2010)⁸ indsamlede algen *Padina gymnospora* fra to forskellige havbugter: Sepetiba Bay (SB) og Ribeira Bay (RB), hvor SB er stærkt forurenet med især Cd og Zn, mens RB repræsenterede et nærliggende metal-frit område. De konkluderede, at indholdet af tungmetaller var seks gange så højt i algerne fra SB end dem fra RB. Yderligere viste resultater fra polysakkarid-ekstraktioner, at koncentrationen af især alginat og fucoidaner var betydeligt højere i alger fra SB end i alger fra RB (Se bilag 4 og 5). De antog at Cd og Zn har stimuleret algeceller til at syntetisere cellevægs-polysakkarider, så metallerne binder sig til funktionelle grupper i cellevæggen frem for at trænge ind i cytoplasmaet, hvor de for alvor gør skade. De betragtede derved overproduktionen af polysakkarider som en forsvarsmekanisme.⁸ Det er denne forsvarsmekanisme, som dette studie er interesseret i at udnytte til modifikation af andre brunalger.

2.4 BIOSORPTION MED ECTOCARPUS SILICULOSUS

Ectocarpus siliculosus er en trådformet primitiv alge, sammenlignet med *Padina gymnospora*.¹⁵ Den er nem at arbejde med i laboratorier og benyttes som modelorganisme for brunalger.⁹ Winter, C. et

al (1994) påviste *Ectocarpus siliculosus* som en effektiv biosorbent. Under mætningsforhold blev der adsorberet 41.5 µg Cd pr. mg biomasse, og både ved høje og lave koncentrationer af tungmetal lykkedes det at adsorbere op til 98% af Cd fra opløsningen.¹⁰

2.5 METODE

2.5.1 Proteolytiske polysakkarid-ekstraktioner

Jeg vil benytte mig af samme fremgangsmåde, som studiet af R. Andrade, Leonardo et al. (2010) brugte til at ekstrahere fra *Padina gymnospora*.

Der udtages et sample fra en kultur med *Ectocarpus siliculosus*, som tørres og pulveriseres (partikelstørrelse på ca. 300 µm). 4 g biomasse fordøjes med papain i 100 mM sodium acetate buffer, 5 mM EDTA og 5 mM cysteine (pH 5) ved 60° i 24 timer med mild omrystning. Den opnåede væske centrifugeres, og polysakkarider udfældes ved brug af cetylpyridinium-klorid og ethanol. Udfældningen frysetørres, og det resulterende pulver opløses i 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) og overføres til en DEAE-cellulose harpiks i glassøjle (kromatografi) (ca. 9 x 2 cm) og renses i 200 mL af den samme buffer med 0.2 M NaCl. Søjlen elueres med en lineær saltgradient (0-2 M NaCl) med gennemløbshastighed på 12 mL i timen. Fraktioner af 3 mL indsamles og tjekkes for sulfaterede polysakkarider med metachromasia metoden, beskrevet af Farndale, R.W. et al. (1986)¹¹ og det samlede sukkerindhold (hexoser) med Phenol-H₂SO₄ metoden, som beskrevet af Dubois, Michel et al. (1956).¹² Ud fra denne ekstraktion udarbejdes en absorptionskurve, hvorefter koncentrationen af polysakkarider kan bestemmes.

2.5.1 Bestemmelse af adsorptionskapacitet med tungmetals-analyser

For at finde ud af hvor meget *Ectocarpus siliculosus*' adsorptionskapacitet er steget efter et givent tidsinterval og en vis udvikling, vil der blive foretaget tungmetals-analyser. Tungmetals-analyser foretages for at kunne beregne, hvor meget tungmetal *Ectocarpus siliculosus* har optaget fra en opløsning, hvorfra det vil blive muligt at beregne adsorptionskapacitet (µg Cd pr. mg biomasse). Adsorptionsprocessen vil foregå som beskrevet i Winter, C. et al (1994) med få ændringer, for at være sikker på at biosorbenten mættes. Der skal bruges 100 mg tørret og pulveriseret biomasse (partikelstørrelse på ca. 300 µm), som opslættes i 10 mL CdCl₂-opløsning (koncentration på 1000 µg Cd pr mL) med pH-værdi 6.8. Opløsningen omrystes i 40 min, hvorefter biomassen frafiltreret og den tilbageværende vandprøve på 10 mL gemmes til tungmetals-analyse på med maskinen ICP-

MS. Samples til tungmetals-analyse samles slutteligt, så de kan blive analyseret samtidig af økonomiske hensyn. Tungmetals-analysen vil måle, hvor mange μg tungmetal pr. L, der tilbage i vandprøven. Ud fra dette tal, kan vi derefter beregne hvor mange μg tungmetal biosorbenten har optaget, og derefter bestemme adsorptionskapaciteten.¹⁰

3 PROJEKTETS UDFØRSEL

3.5 FORSØGSBESKRIVELSE

Forsøget går ud på at observere ændringer i koncentrationen af polysakkarider i *Ectocarpus siliculosus*, og bestemme hvorvidt det øger adsorptionskapaciteten af samme tungmetal. Først skal der opdyrkes en passende mængde, for at kunne lave en tungmetals-analyse, der angiver initial adsorptionskapaciteten samt polysakkarid-ekstraktion der angiver initial mængde af polysakkarider.

Herefter udføres et pilotforsøg, eftersom det ikke vides om *Ectocarpus siliculosus* overhovedet vil tilpasse sig, eller hvor hurtigt det i så fald vil gå.

3.5.1 Pilotforsøg

Efter at have opdyrket en passende mængde af *Ectocarpus siliculosus* udtages en lille kultur, som flyttes til vækstmedie med omkring $1000 \mu\text{g}$ Cd pr. ml. Der udtages tre polysakkarid-ekstraktioner på forskellige tidspunkter, for at give et indblik i hvor lang tid det vil tage at udføre det egentlige forsøg, og hvilken udvikling jeg kan regne med at se. Hvornår polysakkarid-ekstraktion 2 og 3 udtages, kommer an på om der er set nogle ændringer ved forrige polysakkarid-ekstraktioner. Det foreløbige noterede i tabellen er, hvornår jeg regner med at kunne se ændringer, på baggrund af hvor hurtigt *Ectocarpus siliculosus* vokser, og cellerne deler sig.¹⁵

Polysakkarid-ekstraktioner ved pilotforsøg	
Ekstraktion 1	Efter 1 time
Ekstraktion 2	Efter 7 dage
Ekstraktion 3	Efter 1 måned

3.5.2 Forsøg

Hvis der observeres ændringer i pilotforsøget, påbegyndes det egentlige forsøg. Den tidligere kultur af *Ectocarpus siliculosus* deles nu i to separate kulturer i hver sin beholder. Kultur 1 vil blive udsat for Cd (1000 µg pr. ml), som er valgt, eftersom det er blandt de giftigste tungmetaller, der bruges i industrien.⁷ Kultur 2 vil ikke blive udsat for tungmetaller under vækst. Vækstmediet vil blive skiftet ca. én gang hver 14. dag for at sikre vækst og udvikling.

På baggrund af hvor hurtigt der skete ændringer af polysakkariderne i pilotforsøget, vil der blive udtaget samples fra kultur 1 til polysakkarid-ekstraktioner på forskellige tidspunkter. Hvis der sker ændringer hurtigt, tages der polysakkarid-ekstraktioner oftere. Slutteligt tages der også en polysakkarid-ekstraktion fra kultur 2 som kontrol.

Til sidst bestemmes adsorptionskapaciteten af biomasse fra kultur 1 og 2, som beskrevet tidligere. Dog skal kultur 1, der har været udsat for Cd under vækst, behandles først så de adsorberede tungmetaller desorberes efter samme fremgangsmåde som beskrevet i Winter, C. et al (1994). Herefter er de klar til at blive frysetørret, pulveriseret og få målt adsorptionskapaciteten. Slutresultaterne sammenlignes med initial-værdierne.

3.6 TIDSPLAN

Det, der kommer til at være afgørende for, hvor lang tid forsøget tager, er primært hvor hurtigt *Ectocarpus siliculosus* udvikler sig. Således kan der først gives konkret bud på tidslængden af forsøget, når pilotforsøget er udført. Den nuværende tidsplan er udarbejdet efter, hvor lang tid jeg højst forventer, at forsøget vil vare.

Forventede tidsplan		
Forarbejde	Indkøb af materialer	1 uge
	Opdyrkning af kultur	1 uge
	Initial Polysakkarid-ekstraktion + forsøg til bestemmelse af adsorptionskapacitet	2 dage
Pilotforsøg	Udvikling af polysakkarider + ekstraktioner undervejs	Max 1 måned

Forsøg med Cd og Pb	Udvikling af polysakkarider + ekstraktioner undervejs	Max 3 måneder
Tungmetals-analyser	Ventetid	Op til 1 måned
Udarbejdning af artikel		1 måned
I ALT		7 måneder og 16 dage

3.7 BUDGET

Forsøget vil finde sted på Københavns Universitet, som kan stille udstyr samt lokale til rådighed. Udstyr til dyrkning af *Ectocarpus siliculosus* såsom selve startkulturen, reagensglas og kolber samt diverse udstyr, der skal bruges til polysakkarid-ekstraktionen såsom rystemaskine, centrifuge m.m., vil derfor ikke indgå i budgettet. Til tungmetals-analyser bruges maskinen ICP-MS, som er på Aarhus Universitet i Roskilde. Næringsmedie laves efter opskrift fra SCCAP's hjemmeside¹³.

Forventede udgifter		Pris
Næringsmedie (priser beregnet ud fra oplysninger fra sigmaaldrich.com ¹⁴)	NaNO ₃	700 kr.
	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	500 kr.
	Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	400 kr.
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	2900 kr.
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	970 kr.
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	3000 kr.
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	500 kr.
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	1240 kr.
	H ₂ SeO ₃	460 kr.
	NiSO ₄ · 6H ₂ O	800 kr.
	Na ₃ VO ₄	1000 kr.
	K ₂ CrO ₄	200 kr.
Polysakkarid-ekstraktioner (omkring 6):	Papain	900 kr.
	Sodium acetate	300 kr.
	EDTA	300 kr.
	Cysteine	110 kr.
	DEAE-cellulose-søjler	900 kr.

Tungmetals-analyser	Pris for fire vandprøver (for initial adsorptionskapacitet, Kultur 1 og 2) analyseret for Cd	4900 kr.
I ALT		20.080 kr.

Eftersom studiet overskrider budgettet med 80 kr., må uforudsete udgifter blive af egenbetaling. I tilfælde af større uforudsete udgifter, kan det blive nødvendigt at søge økonomisk støtte. Budgettet er beregnet, ud fra hvad de forskellige udgifter vil koste for en privatperson. Sandsynligvis er det muligt at få rabat ved at købe igennem et universitet, hvilket ville lette på budgettet.

4 KONKLUSION OG PERSPEKTIVERING

Uanset hvad forsøget resulterer i, vil det give anledning til videre forskning inden for området.

Hvis der ikke ses nogen udvikling af polysakkariderne hos *Ectocarpus siliculosus*, må man konkludere, at det enten er en udvikling, der tager meget lang tid, at det ikke har været tungmetaller, der i studiet af *Padina gymnospora*⁸ var årsag til den høje koncentration af polysakkarider, eller at *Ectocarpus siliculosus* ikke har samme forsvarsmekanisme som *Padina gymnospora*. I den forbindelse vil det være interessant at undersøge, om der er andre brunalger end *Padina gymnospora*, som har samme forsvarsmekanisme, og hvordan den helt præcist fungerer.

I tilfælde af at *Ectocarpus siliculosus* bliver modificeret til at producere flere polysakkarider, og at det efter al forventning vil øge adsorptionskapaciteten betydeligt, vil det være relevant at undersøge nærmere, hvorvidt det kan bruges til at udvikle en metode, der kan modificere fremtidige biosorbenter på samme vis, og om dette kan betale sig omkostnings- og ressourcemæssigt.

5 KONTAKTER

Øjvind Moestrup – Officielle forskerkontakt

Professor og emeritus

Marine Biological Section, Københavns Universitet

Per Møller

Projektleder

Udviklingsstaben, Kalundborg Kommune

Susse Wegeberg

Seniorrådgiver

Institut for Bioscience – Arktisk miljø, Aarhus Universitet

Gert Asmund

Seniorforsker

Institut for Bioscience – Arktisk miljø, Aarhus Universitet

Kim Gustavson

Seniorforsker

Institut for Bioscience – Arktisk miljø, Aarhus Universitet

6 EN STOR TAK

Tusinde tak til jer forskere, som har taget sig tid til mails, skype-samtaler og møder. Det har været utrolig spændende og berigende for mig og afgørende i forhold til dette projekt. Tak til Øjvind Moestrup, for at dele din viden og erfaring, som har været med til at danne overblik og træffe valg. Tak til Per Møller, for at bruge tid på møder og dele din viden om spildevandsrensingsanlæg med mikroalger og sætte mig i kontakt med andre forskere, jeg ikke selv havde fundet frem til. Tak til Susse Wegeberg og Kim Gustavson, et spændende møde, som gav en mere nuanceret og kritisk synsvinkel på mine idéer, som fik indflydelse på argumentation og problemformulering. Tak Gert Asmund, for at have besvaret et væld af spørgsmål over mail og delt vigtige informationer om tungmetals-analyser.

7 LITTERATURLISTE

1. Fogh Pedersen, Lise og Erik Hansen et al. 1995: *Redegørelse fra miljøstyrelsen - Tungmetaller*, Bind Nr. 1. udg. Miljø- og energiministeriet Miljøstyrelsen, s. 5-15. (Bog)
2. Ben Chekroun, Kaoutar og Mourad Baghour, 2013: *The role of algae in phytoremediation of heavy metals: A review*: J. Mater. Environ. Sci. 4 (6), s. 873-878
3. A. Davis, Thomas et al. 2003: *A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae*: Water research 37, s. 4311-4330
4. Wang, Jianlong og Can Chen, 2008: *Biosorbents for heavy metals removal and their future*. I: Biotechnology Advances 27, s. 208-222
5. Metha, S. K. og J.P. Gauer, 2005: *Use of Algae for Removing Heavy Metal Ions From Wastewater: Progress and Prospects*. I: Critical Reviews in Biotechnology nr. 25, s. 113-152
6. Bulgariu, Laura og Maria Gavrilescu, 2015: *Chapter 30 – Bioremediation of Heavy Metals by Microalgae*: Handbook of Marine Microalgae. 1. udg. Academic Press, s. 457-469. (Afsnit i bog)
7. B. Tchounwou, Paul et al. 2012: *Heavy Metals Toxicity and the Environment*. I: EXC nr. 101, s. 133-164
8. R. Andrade, Leonardo et al. 2010: *Brown algae overproduce cell wall polysaccharides as a protection mechanism against the heavy metal toxicity*. I: Marine Pollution Bulletin nr. 60, s. 1482-1488
9. Cock, J. Mark et al. 2010: *The Ectocarpus genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae*. I: Nature nr. 465, s. 617-621
10. Winter, C. et al. 1994: *Cadmium adsorption by non-living biomass of the semi-macroscopic brown alga, Ectocarpus siliculosus, grown in axenic mass culture and localisation of the adsorbed Cd by transmission electron microscopy*. I: Journal of Applied Phycology nr. 6, s. 479-487
11. Farndale, R.W. et al. 1986: *Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue*. I: Volume 883 nr. Issues 2, s. 173-177
12. Dubois, Michel et al. (1956): *Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances*. I: vol. 28 nr. 3, s. 350-356

Websider:

13. <http://www.sccap.dk/media/marine/2.asp>
14. <http://www.sigmaaldrich.com/denmark.html>

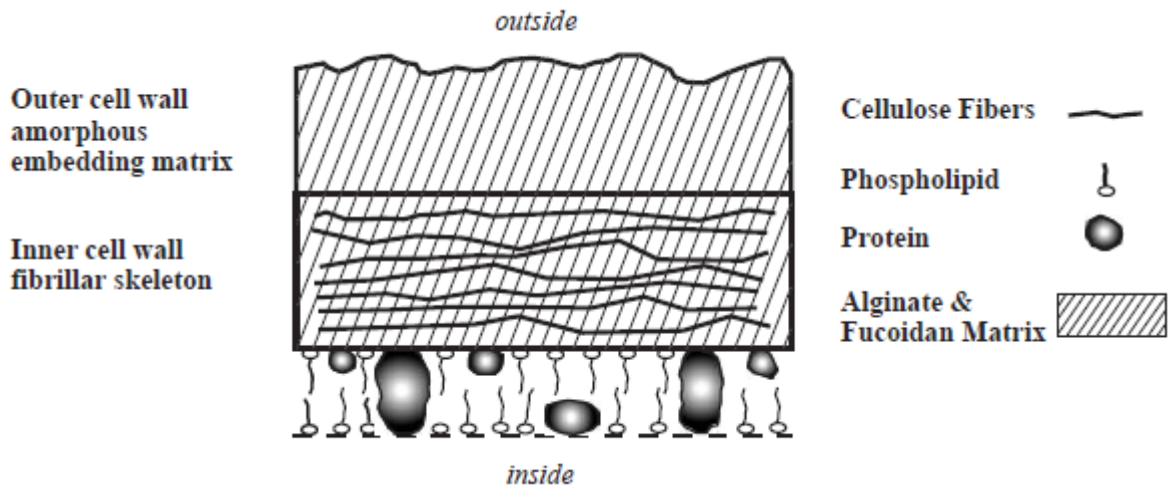
15. Privat korrespondance fra Øjvind Moestrup

Forsidebillede fra følgende kilde: Winter, C. et al. 1994: *Cadmium adsorption by non-living biomass of the semi-macroscopic brown alga, Ectocarpus Siliculosus, grown in axenic mass culture and localisation of the adsorbed Cd by transmission electron microscopy*. I: Journal of Applied Phycology 6, s. 479-487

8 BILAG

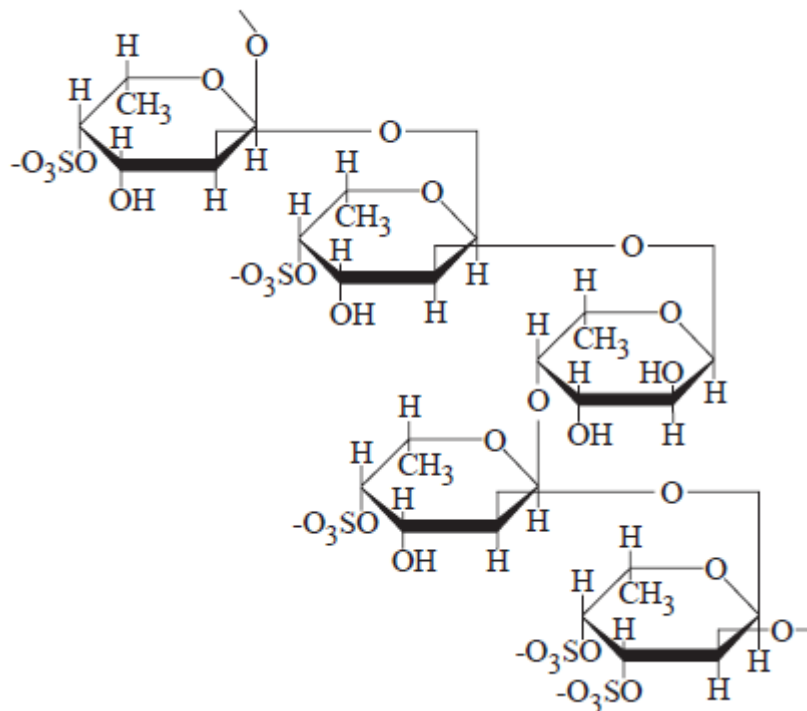
Bilag 1: En typisk cellevægs struktur hos brunalger.

Kilde: A. Davis, Thomas *et al.* 2003: *A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae*³



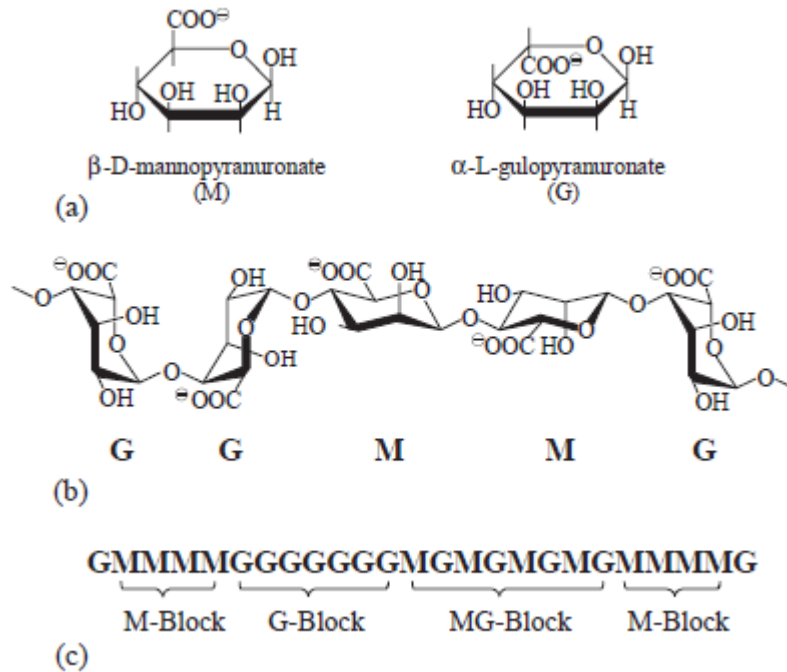
Bilag 2: Illustration af fucoidaners strukturformel.

Kilde: A. Davis, Thomas *et al.* 2003: *A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae*³



Bilag 3: Strukturformlen for alginat, som består af mannuronsyre (M) og glucuronsyre (G). (a) alginat monomere. (b) alginat polymere (c) kædesekvenser af alginatpolymere.

Kilde: A. Davis, Thomas *et al.* 2003: *A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae*³



Bilag 4: Massen og samlede sukkerkoncentrationer fundet i opløsninger skaffet fra fire sekventielle ekstraktioner af 100 g tørrede alger. Resultaterne for den samlede masse er i gram tørvægt; og for samlede sukkerkoncentrationer udtrykt i mg % (mg sammenlagt hexoser i 100 g tørre alger). *Indikerer betydelig forskel.

Kilde: R. Andrade, Leonardo et al. 2010: *Brown algae overproduce cell wall polysaccharides as a protection mechanism against the heavy metal toxicity*⁸

	Total mass	Total sugar
RB 25 °C	7.14	4.43 ± 0.7
SB 25 °C	11.5*	9.22 ± 0.8*
RB 60 °C	12.45	28.27 ± 3.5
SB 60 °C	19.14*	39.67 ± 5.2*
RB pH 2	1.12	14.67 ± 2.3
SB pH 2	2.25	19.4 ± 3.2*
RB pH 10	11.24	11.6 ± 2.1
SB pH 10	16.3*	20.35 ± 4.4*
RB total	31.95	58.97 ± 5.8
SB total	49.19*	88.64 ± 8.3*

Bilag 5: Tabel over koncentrationer af proteiner, sulfatgrupper og uronsyre (omfatter alginat) fundet i fire sekventielle vandige ekstraktioner af alger fra de to studerede bugter. Resultaterne er udtrykt i mg (mg samlet hexose i 100 g tørret alge). *Indikerer betydelig forskel

Kilde: R. Andrade, Leonardo et al. 2010: *Brown algae overproduce cell wall polysaccharides as a protection mechanism against the heavy metal toxicity*⁸

	Protein	Sulfate	Uronic acid
RB 25 °C	3.18 ± 0.7	12.22 ± 0.6	3.1 ± 0.6
SB 25 °C	5.17 ± 0.8	29.11 ± 4.9*	9.12 ± 0.9*
RB 60 °C	22.41 ± 3.5	10.05 ± 3.3	11.47 ± 1.3
SB 60 °C	22.6 ± 3.2	19.41 ± 2.8*	11.49 ± 1.8
RB pH 2	17.58 ± 2.3	11.46 ± 2.8	7.86 ± 0.5
SB pH 2	21.02 ± 3.2	14.03 ± 2.1	13.15 ± 1.1*
RB pH 10	10.08 ± 2.1	2.13 ± 0.3	25.32 ± 4.8
SB pH 10	8.9 ± 1.4	5.75 ± 0.9*	37.11 ± 5.2*
RB total	53.25 ± 5.8	35.86 ± 4.9	47.75 ± 5.1
SB total	57.69 ± 6.3	68.3 ± 5.2*	70.87 ± 9.2*