



Dødeligheten til *Chlamydomonas reinhardtii* i forsuret vekstmedium

Forfattere: Nicholas Andrés Rodriguez, Adam Tvedt-Østereng og Tor Edvard Tingbø, Ullern videregående skole

Studien undersøker hvordan den encellede mikroalgen Chlamydomonas reinhardtii påvirkes av et forsuret vekstmedium. Testgruppen ble forsuret med eddiksyre til pH nådde 5. Deretter ble tettheten av både testgruppen og en urørt kontrollgruppe målt og sammenlignet. Resultatene viste at celletettheten i testgruppen var lavere enn i kontrollgruppen. På grunn av stor variasjon i datasettet ble ikke resultatene funnet statistisk signifikante. Tendensen i forsøket indikerer likevel at ferskvannsalgen C. reinhardtii kan bli påvirket i forsuret vekstmedium.

Introduksjon

Ferskvannforsuring forekommer når CO₂ og andre organiske eller uorganiske forbindelser direkte eller indirekte forsuret vannet (Gies, 2018). Dette kan ha stor betydning for ulike økosystem i naturen (Mills, 2017). Dette er fordi flere arter er spesialisert til å leve i et miljø med en bestemt pH-verdi (United States Environmental Protection Agency, 2022). Dersom organismer ikke klarer å tilpasse seg en endring av pH i sine omgivelser, kan det ende med at de dør ut (United States Environmental Protection Agency, 2022). Da vil det biologiske mangfoldet svekkes, og andre arter som er avhengig av denne arten vil kunne påvirkes negativt (Marris, 2011).

Flere rapporter viser at det kan skje en svak endring av pH i vannet på grunn av fritt CO₂ i lufta (Lauvset, 2021). Når fri CO₂-gass løses opp i H₂O, dannes det karbonsyre (H₂CO₃). Dette er den samme reaksjonen som skjer i havet, og som i stor grad bidrar til havforsuring (Hasler, et al., 2017). Ferskvannsøkosystemer, derimot, er ofte omgitt av vegetasjon som binder opp mye av menneskeskapt CO₂ (Lükewille & Alewell, 2018). I tillegg er vekstsesongen for omkringliggende vegetasjon forlenget på grunn av stigende temperaturer (Lükewille & Alewell, 2018). Dette gjør at plantene rundt vokser seg større og formerer seg mer, noe som øker mengden organisk karbon tilgjengelig når de etter hvert dør og brytes ned i jorda (Lükewille & Alewell, 2018). Organisk karbon vaskes ned i innsjøer ved hjelp av nedbør, og bidrar med å forsure vannkilden (Lükewille & Alewell, 2018; Hurd, Hepburn, Currie, Raven, & Hunter, 2009). Faktorer som bidrar mye til forsuring er utslipp av svoveldioksid og forskjellige nitrogenoksider som trekker opp i atmosfæren og fører til surt regn (Lükewille & Alewell, 2018). Disse utslippene stammer ofte fra menneskelig aktivitet, som fra fabrikkforbrenning og minedrenering (mineskylling). Det kan imidlertid også forekomme store spontane utslipp etter naturfenomener, som for eksempel et vulkanutbrudd (Simate & Ndlovu, 2014; Bhargava & Bhargava, 2013; Rice & Herman, 2011).

Alger er eksempler på organismer som er på bunnen av næringskjeden, hvilket betyr at de ikke spiser andre dyr (Algae Research and Supply, 2023). Alger inngår også i næringskjeden til mange dyr, og når de dør blir de næring til bakterier og sopp (Algae Research and Supply, 2023; Weiss, et al., 2018). Noen alger blir kalt økosystemingeniører siden de opprettholder et helt økosystem (Schubert, et al., 2020). Alger er også kritisk for at liv på jorda skal være mulig siden de står for over 50 prosent av all oksygenproduksjon (Chapman, 2010). Dersom de forsvinner, vil det kunne ha ødeleggende effekt på andre arter, men også hele verden (Micheal Schirber, 2010). I den verste masseutryddelsen noensinne var omtrent 95 prosent av livet i havet, og 35 prosent av landlivet, utdødd. Man vet lite om årsakene til masseutryddelsen for 252 millioner år siden mellom periodene Perm og Trias (P-T), men mye tyder på at utryddelsen kan ha blitt forårsaket av at algepopulasjoner døde (Micheal Schirber, 2010; Svensen, 2010). Det er derfor viktig å undersøke hva som vil skje med ulike alger dersom de vokser og formerer seg under krevende miljøbetingelser og stress, slik som et surt miljø.

Mikroalger er en samlebetegnelse for encellede alger. De er kjent for å produsere bioaktive forbindelser, men totalt har få arter blitt studert. Variasjonen mellom artene kan være stor, men de største fellestrekkene er at de utfører fotosyntese, har kort generasjonstid, og vokser fort og eksponentielt under riktige forhold (Vale & Gonçalves, 2010).

En av mikroalgeartene som har blitt forsket mye på er *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) (Rochaix J. D., 2010). *C. reinhardtii* kan vokse både fotoautotroft og heterotroft, og den kan dermed bruke både organisk og uorganisk karbon til fotosyntese (Grossmann, et al., 2003; Zhen Zhang, 2018; ; Rochaix J. D., 2010). Den forekommer i både ferskvann og i fuktig jord. Grunnen til at den forskes mye på er blant annet at den kan brukes til å produsere biodrivstoff og hydrogen (Christi, 2007; Scranton, Ostrand, Fields, & Mayfield, 2015; Xiaodong Deng, 2009; Randa Darwish, 2020). *C. reinhardtii* er hurtigvoksende og brukes som modellorganisme for forskning på grunnleggende spørsmål innen celle- og molekylærbiologi (Scranton, Ostrand, Fields, & Mayfield, 2015). Den er en god modellorganisme fordi den er både lett å kultivere, samt å manipulere genetisk (Grossmann, et al., 2003). Hensikten med studien er å vise hvilken effekt forurening har på *C. reinhardtii*, og om den klarer å tilpasse seg et surt miljø. Hypotesen er at forsuret vekstmedium av eddiksyre påvirker dødeligheten til *C. reinhardtii*. Nullhypotesen vil da være at det ikke blir noen signifikant forskjell mellom test- og kontrollgruppen etter forurening av eddiksyre.

Metode

For å undersøke hvordan forsuret vekstmedium påvirker dødeligheten til *C. reinhardtii* ble algekulturer dyrket i laboratoriet. 1 mL *C. reinhardtii* (NIVA-CHL 152) ble tilsatt med etanolsteriliserte pipetter (Capp Bravo B1000-1) i 20 autoklaverte erlenmeyerkolber (med volum 50 mL) med 50 ml Tris-Acetate-Phosphate medium (fra Thermo Fisher Scientific med PH 7.0). Mediet ble tilberedt med 1:9 TAP-dH₂O forhold (Burgess, 2016). For å teste hypotesen er det ikke nødvendig å ha algekulturer med mye volum og derfor ble 50 mL prøvevolumet, av praktiske grunner. Erlenmeyerkolbene ble dekket med aluminiumsfolie for å minimere luftutveksling og å holde kulturene sterile (USA Patentnr. US 2005O198925A1, 2005). Det er viktig at alt utstyret er sterilt for å unngå ytre faktorer som kan påvirke resultatet. Algene var i 28°C under periodisk lys (14 med lys hver dag) fra lysrør (Art. no. 44-774, 4200 K, Biltema). Periodisk lys ble brukt etter anbefaling og de ble ristet forsiktig hver tredje dag, slik at algene som hadde gått i dvale og klumpet seg sammen ble jevnt fordelt inn i mediet igjen (Hostyeva, 2023). Denne prosessen varte i tre uker for å gi algene tid til å få bæreevnen sin (Therien, Zadvornyy, Posewitz, Bryant, & Peters, 2014). Når algene nådde bæreevnen sin ble cellene telt ved bruk av en *Thoma Cell Counting Chamber* og et mikroskop (Gundlach mikroskop) for å kontrollere at test- og kontrollgruppen var like (Schulze & Tillich, N/A).

For å teste hypotesen ble det tilsatt 0,9 mL 0,1 mol/L eddiksyre (CH₃COOH) i testgruppen, som førte til at pH sank til rundt 4,8-4,9. Mengden eddiksyre som ble tilsatt i hver gruppe ble målt på forhånd med (PASCO Wireless pH sensor PS-3204) ved tilsetning av 0,1 mol/L eddiksyre i 50 mL 1:9 TAP medium

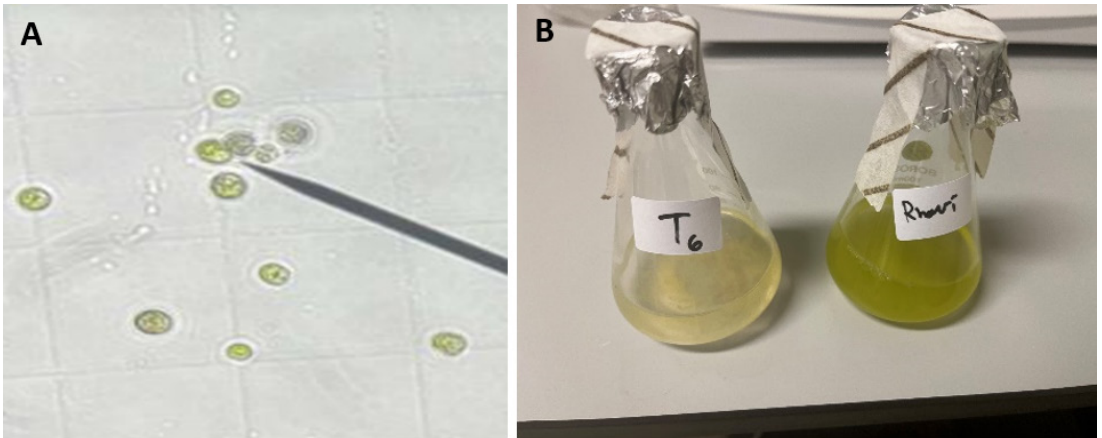
uten alger helt til mediet nådde pH 5. Det ble anbefalt å bruke eddiksyre til å regulere pH-verdien i mediet til *C. reinhardtii* (Mitra, 2020; Molino, 2020). TAP-mediet inneholder 0,1% eddiksyre, og det er den eneste kilden for karbon (Mitra, 2020). Grunnen til at spesifikt eddiksyre blir brukt i TAP-mediet er fordi *C. reinhardtii* er i stand til å utnytte eksogent acetat til netto biosyntese av sukker via glykolsylatsyklusen (Mitra, 2020). Glykolsylatsyklus er en biokjemisk omsetningsvei som tillater organismer å konvertere to-karbonforbindelser til sukker under forhold med begrenset karbon tilgjengelig (Aarnes, 2022). Denne syklusen er unik fordi den omgår de to trinnene i tricarboxylic acid (TCA) syklusen som frigjør CO₂, noe som resulterer i en netto syntese av sukker fra acetyl-CoA (Chandolias, 2018). *Chlamydomonas* kan vokse enten heterotroft eller foto-heterotroft ved å bruke acetat som en karbonkilde, og er ikke avhengig av fotosyntese for glukosebiosyntese. Eddiksyre har da flere roller i forsøket, da den både reduserer pH-verdien og er næringskilde for algene. Eddiksyre er da en trygg måte å redusere pH-verdien i *C. reinhardtii* kulturer. Celleprøvene ble tatt ved å riste test- og kontrollgruppe forsiktig og fra analyse av omtrent 0.1mL prøve tatt med steriliserte pipetter i tellekammer. Å riste kulturene bidrar til å fordele algene, og fører til mer presise målinger (Hostyeva, 2023). Kulturene fikk et lavere volum da det ble tatt ut prøver for å måle celletetthet og derfor er prøvene i så lavt volum som mulig. Det ble utført pH-målinger for å sjekke eventuell endring av pH-verdien ettersom *C. reinhardtii* har endret pH-en i mediet sitt i andre studier (Neumann & Levine, 1971). Målingene ble tatt to, fire og syv dager etter forsuring av mediet. Sju dager etter 0,9 mL 0.1 mol/L eddiksyre ble tilsatt i mediet ble det tilsatt lik mengde eddiksyre igjen i testgruppen. Målingene viste at pH-verdien gikk tilbake til sitt utgangspunkt til pH 7.0 seks dager etter andre forsuring ble celletettheten telt.

Det ble utført en Excel T-test av differansen mellom dataen samlet av celletettheten til kontroll- og testgruppen fra dag 0 til dag 6. Vi bruker en del av populasjonen og en paret T-test for å finne en signifikant forskjell mellom datasettene. For å utføre T-testen var nullhypotesen at eddiksyre i vekstmediet ikke hadde en påvirkning på gruppens dødelighet. Hypotesen var at eddiksyre påvirker dødeligheten. Signifikansverdien ble satt til $P < 0,05$ for å kunne forkaste nullhypotesen.

Denne fremgangsmåten ble valgt med utgangspunkt i det vi hadde av tilgjengelig utstyr fra Ullern vgs, OCC (Oslo Cancer Cluster) og *Thermo Fischer Scientific Inc.*, samt et budsjett på ca. 2000 kr.

Resultater

Resultatene viser at grønnfargen i testgruppen hadde blitt betydelig svakere enn kontrollgruppen, men kontrollgruppen hadde også mistet litt farge. Det ble observert at alger hadde festet seg til bunnen av e-kolbene til testgruppen. Testgruppen løste seg ikke opp på samme måte som kontrollgruppen da de ble ristet. Mikroskopi viste at algene i større grad hadde en tendens til å både klumpe seg sammen og å gå i oppløsning i testgruppen enn i kontrollgruppen.



Figur A: Mikroskopibilde fra testgruppen dag 6 viser noen forskjeller og abnormiteter i morfologien. Det ble observert uklare gråaktige celler (celler uten klorofyll) i testgruppen, men ikke i kontrollgruppen. Det er usikkert hvorvidt dette er celler i det hele tatt.

Figur B: Testgruppe (venstre) har svak farge og tydelige klumper på bunn. Kontrollgruppe (høyre) har sterkere farge. Begge hadde blitt ristet før bildet ble tatt (dag 6).

	Testkultur				Kontrollkultur		Differanse dag 0-6	
	Dag -7	Dag -5	Dag 0	Dag 6	Dag 0	Dag 6	Kontroll	Syre
Tetthet	16,6	16,2	19,2	11,8	8,6	15,2	6,6	-7,4
	12,4	13,2	9,8	10,2	14,6	18,4	3,8	0,4
	12,0	16,6	10,8	10,4	16,4	13,2	-3,2	-0,4
	9,4	18,4	15,6	11,2	17,6	14,4	-3,2	-4,4
	12,8	14,6	15,0	10,0	12,8	9,8	-3,0	-5,0
	17,8	13,6	14,6	13,0	18,8	12,8	-6,0	-1,6
	20,4	15,8	10,6	9,2	17,2	12,6	-4,6	-1,4
	16,0	19,0	12,0	8,4	17,6	13,2	-4,4	-3,6
	18,4	13,0	15,0	8,2	16,4	14,2	-2,2	-6,8
	15,0	20,0	15,6	10,0	15,0	12,2	-2,8	-5,6
Gjennomsnitt	15,08	16,04	13,82	10,24	15,50	13,60	-1,90	-3,58
Standardavvik	3,40	2,49	2,94	1,48	2,98	2,24	3,95	2,72
pH	4,88	7,47	4,79	7,34	7,53	7,61	-1,9	-3,58

Tabell 1. *C. reinhardtii* test resultater. Syre ble tilsatt 7 dager før forsøket i testgruppen. Lik mengde syre ble tilsatt dag 0.

Da syren ble tilsatt, ble det etter en stund gjennomsnittlig færre alger i testgruppen. Dataen viser at testgruppen gikk tilbake til sin opprinnelige pH-verdi begge gangene vi tilsatte syre. 2 dager etter første gang syren ble tilsatt var pH-verdien allerede tilbake til 7,47. Gjennomsnittlig var det 24,7% flere celler i kontrollgruppen enn i testgruppen på dag 6, da testgruppen hadde en tetthet på 10,24, og kontrollgruppen 13,6.

Diskusjon

Hensikten med studien var å finne ut hvordan et surt miljø påvirker *C. reinhardtii*, og om algen klarer å tilpasse seg forsuring av vekstmedium. Resultatene viser at *C. reinhardtii* blir påvirket av pH 4,9 på flere måter. Det at grønnfargen ble svakere i testgruppen etter tilsetningen av syre kan forklares ved at

konsentrasjonen av alger har avtatt, da det er algene som gjør løsningen grønn. Det kan også være at klorofyllproduksjonen til *C. reinhardtii* minker om den er utsatt for et surt miljø. Dette har blitt vist i tidligere forskning, da blant annet syre har blitt tilsatt i blader. Noe som har gjort at klorofyllnivået minket betydelig (Verónica M. Rodríguez-Sánchez, 2020).

Samtidig førte syren til at flere alger døde, noe som er tydelig både i tabell 2 og figur A og B. Resultatene er ikke statistisk signifikante da p-verdien er 0.288, men vi ser likevel tydelige tendenser i den retning. Mikroskopering viste at testgruppeene hadde mindre grønnfarge (klorofyll) enn kontrollkulturene. Færre alger kan være en mulig forklaring på at det ble mindre klorofyll. Dette betyr ikke nødvendigvis at syre hemmer fotosyntesen, men at netto klorofyll sank da det var færre alger som kunne produsere det. Det er mulig at de algene som overlevde utøvde en helt normal fotosyntese, upåvirket av syren, men siden de var færre ble grønnfargen svakere. Det at algene døde kan forklare bunnslammet i testgruppen, og at det muligens har skjedd en kjemisk reaksjon som hindrer de døde algene å løses opp i blandingen når den ristes. Sammen kan cellene ha reagert og blitt til et stoff som har lett for å klistre seg fast i og sedimentere i bunnen av kolbeglasset.

Eddiksyre brukes både som en næringskilde for algen, og for å redusere pH-verdien i mediet. Det var anbefalt å bruke eddiksyre for å regulere pH-verdien i Tap-medium. Dette var fordi det er en trygg måte å kontrollere pH-verdien i mediet, uten å skade *C. reinhardtii*. Siden algen klarer å overleve trygt i eddiksyre, så minimerer dette andre faktorer som kan påvirke studien. Men i et forsøk der to grupper av en kultur *C. reinhardtii* skal sammenlignes, der testgruppen skal ha redusert pH, er eddiksyre ikke den egnede syren å bruke. Ettersom testgruppen inneholder betydelig mer eddiksyre enn kontrollgruppen, vil den få betydelig mer tilgang til mer næring. Dette vil være en faktor som påvirker studien slik at en entydig konklusjon ikke kan trekkes.

Begge gangene testgruppen ble utsatt for eddiksyre gikk pH-verdien i vekstmediet tilbake til sitt utgangspunkt, sannsynligvis etter omkring en halv dag. En teori er at algene har klart å ta opp eddiksyren som ble tilsatt, og dermed balansert ut pH-verdien. En annen teori er at algene har evne til å utskille basiske eller bufferlignende stoffer som endret pH i vekstmediet. Hvilke mekanismer *C. reinhardtii* benytter seg av, er ukjent for oss. Det har også blitt vist at eddiksyre kan indukere programmert celledød for *C. reinhardtii* ved pH 5, men også hindre plantevekst (Zhaojiang, Yerong, Yanling, & Wang, 2011).

Det ble observert noen fragmenterte alger. Dette kan skyldes cellelysis. Cellelysis kan ha skjedd fordi cellemembranen til *C. reinhardtii* er sårbar for syre, og at det kan føre til skader på cellen (Zemke-White, Clements, & Harris, 2000). Dette har også blitt kjent da andre algearter har vært utsatt for lavere pH enn i forsøket vårt (Zemke-White, Clements, & Harris, 2000). Cellemembranen er en av de viktigste forsvarskomponentene til en celle, og den fungerer som en barriere mellom cytoplasma og cellekjernen, og utsiden av cellen (Harris & Stone, 1988; Zemke-White, Clements, & Harris, 2000; Keegstra, 2010). Den bidrar i stor grad til regulering av hvilke stoffer som skal inn og ut av cellen. Skader på denne kan være katastrofale fordi cellen mister evnen til å regulere flyten av stoffer gjennom membranen (Zemke-White, Clements, & Harris, 2000; Harris & Stone, 1988; Keegstra, 2010).

En mulig feilkilde som kan ha bidratt til å skape usikkerhet om resultatene, er kontaminasjon i algene. Det ble bare brukt en aluminiumsfolie for å dekke over toppen av erlenmeyerkolbene, men det er likevel sannsynlig at bakterier og andre mikroorganismer kan ha trengt inn. Det er også en fare for at rester av etanol fra desinfiseringen kan ha spilt en rolle og drept alger. En annen påvirkningsfaktor er feil i telling av algene. Det har vært mye presisjonsarbeid over lange perioder, og det kan ha skjedd noen unøyaktige tellinger av celler i hver rute. Det var også utfordrende å bestemme hvilke celler som skulle telles og ikke, altså hvilke som var døde eller levende. En mer standardisert metode for celledetelling ville trolig gitt bedre datagrunnlag. Unøyaktig dosering da komponentene ble blandet, kan også være en mulig negativ påvirkningsfaktor. I løpet av forsøket ble volumet av noen grupper mer redusert enn andre da flere prøver var nødvendig når det oppstod feilmålinger. Dermed ble noen av prøvene forkastet slik at noen grupper endte opp med to-

talvolum på mellom 40-45 mL, og andre beholdt et volum på nærmere 50 mL. Det ble tatt flest prøver fra testgruppen. Testgruppen hadde derfor gjennomsnittlig lavere volum enn kontrollgruppen.

Konklusjon

Denne studien har undersøkt effekten av hvordan et surt vekstmedium har påvirket dødeligheten til den encellede microalgen *C. reinhardtii*. Hovedfunnet er at tettheten til testgruppen minket da vi tilsatte eddiksyre. I tillegg viste studiet at vekstmediet som ble forsuret til en pH på 4.8-4.9 gikk tilbake til sin opprinnelige pH-verdi på omtrent 7.4 begge gangene eddiksyre ble tilsatt. Resultatene viser at *C. reinhardtii* har en større dødelighet i gruppen som ble forsuret enn i gruppen som levde under gunstige levekår. Resultatene viser også at *C. reinhardtii* kan overleve i et forsuret vekstmedium, da ikke alle algene døde i løpet av perioden på 13 dager da gruppen var utsatt for syre. Siden eddiksyre også er en næringskilde for *C. reinhardtii*, fikk testgruppen, i tillegg til redusert pH, mer næring enn kontrollgruppen. Likeså ble forsøket kun utført over en periode på bare 6 dager, der forskjellene mellom kontroll- og testgruppen ikke var statistisk signifikant. Dette påvirker studien slik at en entydig konklusjon ikke kan trekkes. Videre forskning er nødvendig for å kunne avdekke hva som endret pH-verdien tilbake til sitt utgangspunkt. I tillegg er det behov for mer tid til å finne ut av om algene kan overleve i et forsuret vekstmedium mer enn de 13 dagene forsøket varte, og om algene klarer å leve i et medium som holder en konstant forsuret pH verdi, der det er lik mengde næring mellom test- og kontrollgruppen.

Referanser

- Algae Research and Supply. (2023). *ECOLOGICAL IMPORTANCE OF ALGAE*. Retrieved from Algae Research and Supply: <https://algaeresearchsupply.com/pages/ecological-importance-of-algae>
- Bhargava, S., & Bhargava, S. (2013, Oktober). *Ecological Consequences of The Acid Rain: Dr. Sunita Bhargava, Sharad Bhargava*. Retrieved from SCRIBD: <https://www.scribd.com/document/480973839/DO541924-pdf>
- Burgess, S. J. (2016, Juli 23). *TRIS acetate phosphate (TAP) medium*. Retrieved from protocols.io: <https://www.protocols.io/view/TRIS-acetate-phosphate-TAP-medium-j8nlkwdwl5r7/v1>
- Chandolias, K. R. (2018, april 20). Chapter 5 - Combined Gasification-Fermentation Process in Waste Biorefinery. *Waste Biorefinery*, pp. 157-200. Retrieved from Waste Biorefinery.
- Chapman, R. L. (2010, September 1). *Algae: the world's most important "plants"—an introduction*. Retrieved from Springer Link: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11027-010-9255-9>
- Chlamydomonas Resource Center. (N/A, N/A N/A). *TAP and Tris-minimal*. Retrieved from Chlamycol-lection.org: <https://www.chlamycol-lection.org/methods/media-recipes/tap-and-tris-minimal/>
- Christi, Y. (2007, Februar 13). *Biodiesel from microalgae*. Retrieved from ScienceDirect: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0734975007000262>
- Gies, E. (2018, Januar 11). *Like Oceans, Freshwater Is Also Acidifying*. Retrieved from Scientific American: <https://www.scientificamerican.com/article/like-oceans-freshwater-is-also-acidifying/>
- Grossmann, A. R., Harris, E. E., Hauser, C., Lefebvre, P. A., Martinez, D., Rokhsar, D., . . . Zhang, Z. (2003, Desember 2003). *Chlamydomonas reinhardtii at the Crossroads of Genomics*. Retrieved from ASM Journals: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/EC.2.6.1137-1150.2003>
- Harris, P. J., & Stone, B. A. (1988). *Structure and function of plant cell walls*. London: Academic Press, Inc.
- Hasler, C. T., Jeffrey, J. D., Schneider, E. V., Hannan, K. D., Tix, J. A., & Suski, C. D. (2017, August 9). *Biological consequences of weak acidification caused by elevated carbon dioxide in freshwater ecosystems*. Retrieved from Springer Link: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10750-017-3332-y>
- Hostyeva, V. (2023, Januar 4). *C. reinhardtii*.

- Hurd, C. L., Hepburn, C. D., Currie, K. I., Raven, J. A., & Hunter, K. A. (2009, December 15). *TESTING THE EFFECTS OF OCEAN ACIDIFICATION ON ALGAL METABOLISM: CONSIDERATIONS FOR EXPERIMENTAL DESIGNS*. Retrieved from Journal of Phycology: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1529-8817.2009.00768.x>
- Keegstra, K. (2010, Oktober 6). Plant Cell Walls. *Plant Physiology*, volume 154, issue 2, pp. 483-486.
- Lauvset, S. (2021, april 27). *Havforsuring*. Retrieved from SNL: <https://snl.no/havforsuring>
- Lükewille, A., & Alewell, C. (2018, September 18). *Acidification*. Retrieved from Sciedirect: <https://www.sciencedirect.com/topics/earth-and-planetary-sciences/acidification>
- Marris, E. (2011, Januar 25). *Ecologists propose ousting species to save ecosystems*. Retrieved from Scientific American: <https://www.scientificamerican.com/article/ecologists-propose-oust/>
- Micheal Schirber. (2010, Desember 14). *The day the algae died*. Retrieved from PHYS ORG: <https://phys.org/news/2010-12-day-algae-died.html>
- Mills, A. (2017, Mars 9). *Volcano Breath: Measuring Sulfur Dioxide from Space*. Retrieved from Michigan Tech: <https://www.mtu.edu/news/2017/03/volcano-breath-measuring-sulfur-dioxide-space.html>
- Mitra, M. (2020, Juni 12). *A green micro-algal growth media modified for use as a stringent minimal media for bacteria*. Retrieved from Protocols.io: <https://www.protocols.io/view/a-green-micro-algal-growth-media-modified-for-use-bgzujx6w.pdf>
- Molino, J. V. (2020, september 2). *TAP media preparation V.2*. Retrieved from protocols.io: <https://www.protocols.io/private/3E11E4295FAA5B8ECD86E11E4B793955?step=1>
- Neumann, J., & Levine, R. P. (1971, Mai N/A). *Reversible pH Changes in Cells of Chlamydomonas reinhardtii Resulting from CO₂ Fixation in the Light and Its Evolution in the Dark*. Retrieved from National Library of Medicine: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC396754/>
- Perlman, D. (2005). *USA Patent No. US 20050198925A1*.
- Randa Darwish, M. A. (2020, September 26). *Chlamydomonas reinhardtii Is a Potential Food Supplement with the Capacity to Outperform Chlorella and Spirulina*. Retrieved from MPDI: <https://www.mdpi.com/2076-3417/10/19/6736>
- Rice, K. C., & Herman, J. S. (2011, September 9). *Acidification of Earth: An assessment across mechanisms and scales*. Retrieved from Sciedirect: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S088329271100391X>
- Rochaix, J. D. (2010, August 27). *Chapter Five - Mechanisms of Protein Kinase A Anchoring*. Retrieved from Sciedirect: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/chlamydomonas-reinhardtii>
- Rochaix, J.-D. (2001, Desember 1). Assembly, Function, and Dynamics of the Photosynthetic Machinery in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant physiology*, volume 127, issue 4, pp. 1394-1398. Retrieved from Plant Physiology, volume 127, issue 4: <https://academic.oup.com/plphys/article/127/4/1394/6103638>
- Schubert, N., Schoenrock, K. M., Aguirre, J., Silva, J., Kamenos, N. A., Horta, P. A., & Hofmann, L. C. (2020, Mai 25). *Editorial: Coralline Algae: Globally Distributed Ecosystem Engineers*. Retrieved from Frontiers: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2020.00352/full>
- Schulze, D. K., & Tillich, D. U. (N/A, N/A N/A). *THE PRINCIPLE OF MANUAL CELL COUNTING: THOMA VS NEUBAUER IMPROVED*. Retrieved from Oculyze: <https://www.oculyze.net/the-principle-of-manual-cell-counting-thoma-vs-neubauer-improved/>
- Scranton, M. A., Ostrand, J. T., Fields, F. J., & Mayfield, S. P. (2015, Februar 18). *Chlamydomonas as a model for biofuels and bio-products production*. Retrieved from National Library of Medicine: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25641390/>
- Simate, G. S., & Ndlovu, S. (2014, Juli 22). *Acid mine drainage: Challenges and opportunities*. Retrieved from Sciedirect: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2213343714001638>
- Svensen, H. (2010, Januar 30). *Kronikk: Masseutryddelsen fascinerende verden*. Retrieved from Forskning.no: <https://forskning.no/geofag-klima-kronikk/kronikk-masseutryddelsen-fascinerende-verden/1181712>

- Therien, J. B., Zadovorny, O. A., Posewitz, C. M., Bryant, D. A., & Peters, J. W. (2014, October 18). *Growth of Chlamydomonas reinhardtii in acetate-free medium when co-cultured with alginate-encapsulated, acetate-producing strains of Synechococcus sp. PCC 7002*. Retrieved from National Library of Medicine: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4216383/>
- United States Environmental Protection Agency. (2022, Mars 24). *pH*. Retrieved from United States Environmental Protection: <https://www.epa.gov/caddis-vol2/ph>
- Vale, M. A., & Gonçalves, A. L. (2010, Oktober). Bioenergy and the potential contribution of agricultural biotechnologies in developing countries. *Biomass and Bioenergy*, volume 34, issue 10, pp. 1427-1439. Retrieved from Scencedirect: <https://www.sciencedirect.com/topics/earth-and-planetary-sciences/microalgae>
- Verónica M. Rodríguez-Sánchez, U. R.-V.-Z. (2020, Juli 8). *Does Acid Rain Alter the Leaf Anatomy and Photosynthetic Pigments in Urban Trees?* Retrieved from National Library of Medicine: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7411892/>
- Weiss, L. C., Pötter, L., Steiger, A., Kruppert, S., Frost, U., & Tollrian, R. (2018, Januar 11). *Rising pCO₂ in Freshwater Ecosystems Has the Potential to Negatively Affect Predator-Induced Defenses in Daphnia*. Retrieved from Current Biology: <https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0960-9822%2817%2931655-X>
- Xiaodong Deng, Y. L. (2009, December). Microalgae: A promising feedstock for biodiesel. *African Journal of Microbiology Research*, p. http://www.academicjournals.org/app/webroot/article/article1380378013_Deng%20et%20al.pdf.
- Zemke-White, W., Clements, K., & Harris, P. (2000, Februar 2). *Acid lysis of macroalgae by marine herbivorous fishes: effects of acid pH on cell wall porosity*. Retrieved from scencedirect: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022098199001513>
- Zhaojiang, Z., Yerong, Z., Yanling, B., & Wang, Y. (2011, November 11). *Acetic acid-induced programmed cell death and release of volatile organic compounds in Chlamydomonas reinhardtii*. Retrieved from scencedirect: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0981942811003378>
- Zhen Zhang, Y. T. (2018, Oktober 25). *Efficient heterotrophic cultivation of Chlamydomonas reinhardtii*. Retrieved from link.springer.com: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10811-018-1666-0>
- Aarnes, H. (2022, september 19). *glyoksylatsyklus*. Retrieved from SNL: <https://snl.no/glyoksylatsyklus>