



Lysintensitetsoptimum for mikroalgen *Rhodomonas salina*

Forfattere: Olivia Corneliussen, Bendik Stangebye Larsen og Noah Ruphael Asmelash
Ullern videregående skole

Studien undersøker om det er en sammenheng mellom lysintensitet og formering av mikroalgen *Rhodomonas salina*. Hvis det kan påvises en sammenheng, kan mikroalgen bidra til å løse klimakrisen gjennom karbonfiksering. En startkultur ble laget og fordelt i kolber, satt i separate hyller med blått lys i 12 timer og 12 timer uten lys. Det ble satt opp seks paralleller med lysintensitet fra 0 til 281 LUX. Målingene ble utført ved hjelp av flowcytometri ved Ullevål universitetssykehus 4 ganger i løpet av 10 dager. Resultatene viste et lysintensitetsoptimum i forhold til vekst på rundt 107 LUX.

Introduksjon

Klimakrisen er en av de største utfordringene vi står overfor i dag. For å bremse utviklingen av global oppvarming og redusere utslippene av klimagasser, må vi finne nye effektive løsninger. En av de mest lovende tilnærmingene er karbonfiksering, som kan bidra med å fjerne CO₂ fra atmosfæren (Aarnes, 2023). For å lykkes med dette, er vi avhengig av å finne mer bærekraftige metoder og ressurser, og det er her naturen kan gi oss viktige svar.

En alge som kan være en del av løsningen, er *Rhodomonas salina*. *R. salina* er en mikroskopisk planktonisk alge som tilhører gruppen kryptomonader (Wikipedia, 2023). Den finnes hovedsakelig i marine og brakkvannsområder, der den spiller en viktig rolle i næringskjeden som en primærprodusent (Halvorsen, 2020). Den har sitt naturlige habitat på 10 -14 meters dyp (Halstvedt, 2007). Som mange fotoautotrofe organismer, har *R. salina* et lysintensitetsoptimum for vekst. Når algen utsettes for lysintensiteter som strekker seg langt over det algen er tilpasset, kan det føre til stress, som kan skade cellene (Gervais, 2007). Ved ekstremt høy lysintensitet kan det oppstå fotoinhibisjon, hvor fotosynteseprosessen blir hemmet (Wikipedia, 2023). I alvorlige tilfeller kan cellene lide av oksidativt stress, noe som kan føre til at cellemembraner og cellestruktur skades (Frivoll, 2022). Dette kan føre til celledøds, eller at cellene «sprekker» (Smith & Johnson, 2023). På den andre siden reduseres fotosynteseaktiviteten ved lave lysintensiteter, som begrenser algens vekst (Callieri et al., 2007).

Redusert lysgjennomtrengelighet i havet vil ha stor påvirkning på veksten til fotosyntetiske organismer som *R. salina*. Hvor mye lys som når ulike dyp avhenger vanligvis av solinnstråling og vannets klarhet. I mer næringsrike og grumsete kystområder reduseres denne betraktelig, noe som kan påvirke marine organismer som er avhengige av stabile lysforhold. Oslofjorden har blant annet blitt mørkere, og dette skyldes i stor grad eutrofiering (Hauge, 2020). Eutrofiering oppstår når næringsstoffer som nitrogen og fosfor tilføres havet fra kilder som landbruk. Dette kan føre til en oppblomstring av alger og plankton, som igjen

reduserer siktdybden og begrenser mengden lys som når ned til dypere vannlag (Kjensmo, 2022). Endrede lysforhold påvirker hele det marine økosystemet, inkludert vekstvilkårene for mikroalger som *R. salina*. Ved å undersøke hvilken lysintensitet som er gunstig for formering av *R. salina*, kan vi bedre forstå hvordan miljøendringer påvirker mikroalgens vekstvilkår. Dette gir også verdifull innsikt i hvordan endrede lysforhold påvirker karbonfiksering i havet, og i hvor stor grad alger kan brukes som en del av løsningen på klimakrisen.

Samtidig som algene vil få en tydelig endret vekst med økende lysintensitet, vil vi anta at det vil forekomme en stagnering og/eller en nedgang hvis økt lysintensitet fører til fotoinhibisjon. Dette forskningsprosjektet har til hensikt å finne lysintensitetsoptimumet for *R. salina*. Ved å undersøke hvordan algen reagerer på forskjellige lysintensiteter, kan vi få innsikt i hvilket vekstvilkår som er mest hensiktsmessig.

Metode

For å undersøke hvordan lysintensitet påvirker veksten til dypvannsalgen *R. salina*, ble den dyrket ved seks ulike lysintensiteter over en periode på 10 dager. En startkultur med 20 ml med alger av typen *R. salina* fra NORCCA ble dyrket opp i to 500 ml begerglass. Hvert av begerglassene ble tilsatt 300 ml av vekstmediet 20 % Z8SW+Vit NORCCA. Etter å ha latt kulturene vokse i tre dager, ble væsken fra de to begerglassene blandet sammen, og 20 ml av algekulturen ble tilsatt i autoklaverte 100 ml erlenmeyerkolber. Erlenmeyerkolbene ble videre tilført 18 ml vekstmedium, dekket med lokk av aluminiumsfolie og plassert i hver sin hylle på et mørkt rom med mørke laken som blokkerte annet forstyrrende lys. De ble belyst med blått lys (420-490 nm, Round Clip LED Plant Grow Light (LED-GCZD004-11)) i de ulike lysintensitetene (0, 9, 37, 107, 173 og 281 LUX). Antall lysintensiteter ble valgt siden det var ti alternativer ved innstilling av lyskilden, så annenhver intensitet ble brukt for å få størst spredning i mengde lys. Lysintensiteten ble målt med appen *lux light meter (Nipakul Buttua)*, og ble lagt opp med såpass stor forskjell i lysintensitet for å kunne se et lysintensitetsoptimum. De ble plassert som vist i figur 1A. Algene fikk lys i 12 sammenhengende timer i døgnet. For hver lysintensitet var det 5 paralleller, med unntak av kontrollen uten lys, hvor det var tre paralleller. Algene i erlenmeyerkolbene sto under lyskilden i 3 dager før andre måling ble tatt. Måling tre ble gjennomført etter dag 7, og måling fire ble gjennomført etter dag 10.

Resten av kulturen ble analysert med flowcytometri på dag 0, for å vite startkonsentrasjonen til algekulturen, og for å validere instrumentet *BD Accuri C6 (Bec)*. Flowcytometri fungerer ved at lys fra en lyskilde treffer rett på cellene som blir undersøkt, og blir spredt 90 grader. Det lyset som blir absorbert hos de fluorescerende algene blir emittert og fortsetter i samme retning forover (forward scatter), mens annet lys blir spredt i sideretning. Dette gjør at man kan gi et estimat på antall fluorescerende alger i kulturen. Gjennom en økning i forward scatter kan man se en tilsvarende økning i algepopulasjonen i væsken.

Lyset som spres i forover retning vil si noe om formen og størrelsen på populasjonen, og programmet etterlater seg dermed verdier for antall single mikroalger i væsken instrumentet har undersøkt (Aas, 2025). På denne måten er flowcytometri et nyttig instrument for å kunne kartlegge antallet små organismer i en populasjon.

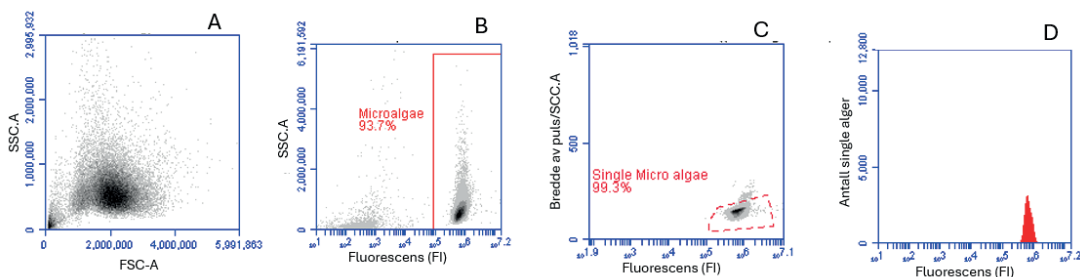
Antall alger ble undersøkt ved hjelp av flowcytometri. *R. salina* er veldig spesifikt fluorescerende som gjør at flowcytometri egnet seg godt til denne type analyse. Flowcytometriinstrumentet *BD Accuri C6 (Bec)* gir antall single mikroalger i en prøve. Algekulturene ble gjennom instrumentet truffet med FL2 laser (Figur 1D), og lysspredningen i sideretning (SSC-A) og foroverretning (FSC-A) ble registrert. Lysspredningen gir en oversikt over alle de fluorescerende algene og annet debris (Figur 2A). For å skille de fluorescerende algene fra debris, ble det gjort en avgrensning (Figur 2B). Dette ble gjort ved å se på den homologe og spesifikke evnen *R. Salina*. har til å fluorescere, som gjør at de lett kan skilles fra annet lite fluorescerende debris. Dette ble gjort ved å pipettere ut 100 µl av hver av de 28 kolbene til eppendorfrør (trucount 50959). Dubletter ble også adskilt fra resultatene, dette ble gjort ved å se på pulsen til fluorescensen, da den er dobbelt så stor for dubletter enn single alger (Figur 2C). En fluoriserende puls viser hvor bredt algene fluo-

rescerer. Siden *R. salina* fluorescerer så spesifikt, egner flowcytometri seg usedvanlig svært godt til denne type analyse. Av analysen kunne man se hvor mange som fluorescerte og da få et svar på antall single alger i prøven (Figur 2D). Åpenbare feilmålinger ble fjernet i resultatene, da det i kolbe C5 og F4 ble observert at bortimot alle algene hadde dødd. Antall single mikroalger per mikroliter vil bli betegnet som «SMU» videre i oppgaven.

For å estimere volumet til prøvene korrekt ble det også gjennomført volumtester, med omvendt pipettering, for å validere instrumentet. I tillegg ble det gjennomført målinger med en standardløsning med kuler og kjent tetthet (truecount 50161), for ekstra validering av resultatene fra flowcytometri.



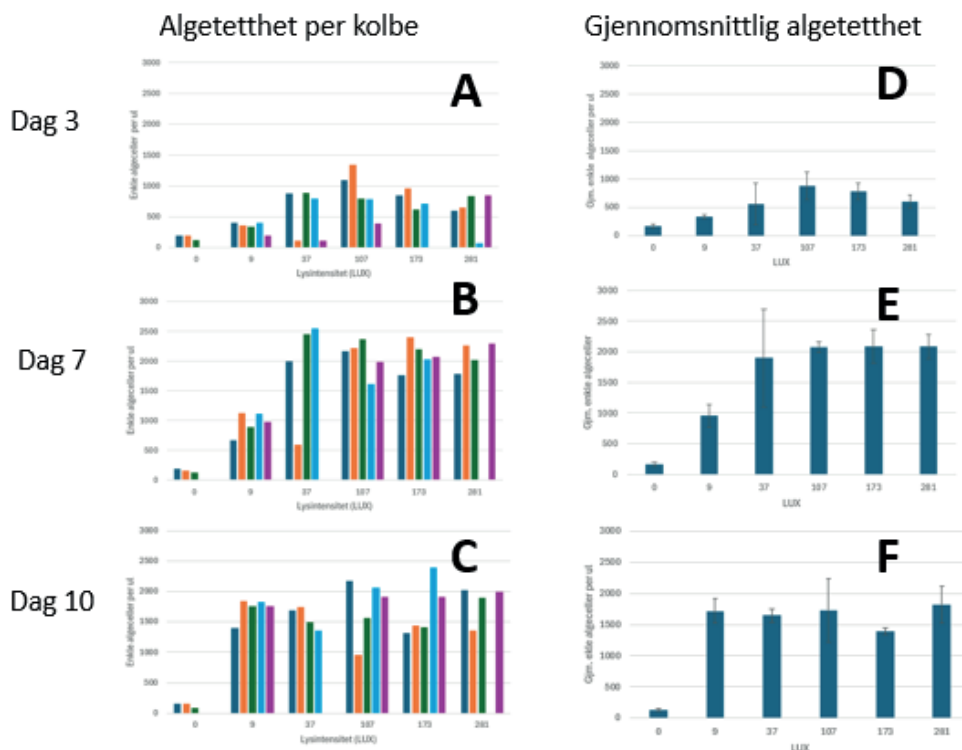
Figur 1: (A) Oppsettet for vekst for de seks lysintensitetene, der hver lysintensitet er plassert i egen hylle. (B) Lysoppsettet med de 5 parallellene. (C) Flowcytometriinstrumentet og prøverørerne. (D) Lasersystemet inni flowcytometriinstrumentet. (E) Mikroalgen *R. salina*. Sett i mikroskop.



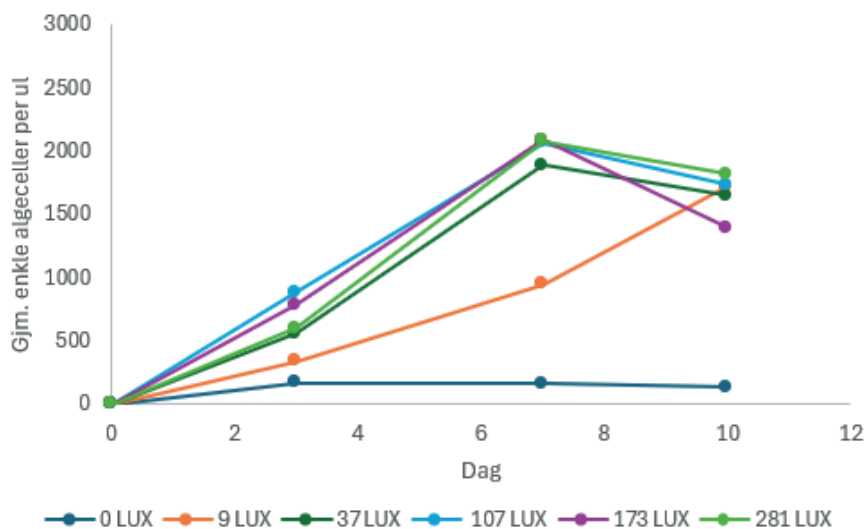
Figur 2: Analysen gjort med flowcytometri i fire ulike steg for én lysintensitet. (A) De sorte prikkene er alger og debris. FSC-A er et mål på lysspredning i foroverretning, mens SSC-A er et mål på lysspredning i sideretning. (B) Det ble gjort en avgrensning, representert ved den røde boksen, for å skille de fluorescerende algene mot signaler fra cellefragmenter og annet debris. (C) For å skille de single algene med dubletter, ser man på bredden av pulsen for fluorescensen. 99,3 % av alle algene var single i denne målingen. (D) Den spisse toppen viser fluorescensen til algene, mens man på y-aksen kan se antall alger i prøven.

Resultater

Mikroalgetettheten etter 3, 7 og 10 dager tyder på et lysintensitetsoptimum på omtrent 107 LUX. Ved dag 0 var gjennomsnittlig algetetthet på 182 SMU. Ved 0 LUX sank tettheten gradvis til dag 10. Alle algekulturene med unntak av lysintensiteten utsatt for 0 LUX, hadde en maksimal algetetthet på rundt 2000 SMU, men denne tettheten ble oppnådd på ulikt tidspunkt for de ulike lysintensitetene (figur 4). Etter tre dager var 107 LUX lysintensitetsverdien der toppunktet befant seg (figur 3D). 7 og 10 dagersmålingene viste ikke et klart lysintensitetsoptimum fordi alle lysintensitetsprøvene nådde bæreevne på omtrent 2000 SMU. (figur 3E og 4). Resultatene viser at prosentandelen SMU mot antall doble mikroalger per mikroliter holder seg stabilt rundt 95 %, bortsett fra de høyeste lysintensitetsgruppene på dag 10, der prosentandelen synker til 55 % (tabell 2).



Figur 3: Målinger av SMU etter 3, 7 og 10 dager i forhold til lysintensitetene forsøket tar for seg. Videre følger målingsintervallene som følger; (A) 3 dager (B) 7 dager og (C) 10 dager. Gjennomsnittlig SMU fra de ulike lysintensitetene etter 3, 7 og 10 dager. Med tilhørende standardavvik. Videre følger målingsintervallene som følger; (D) 3 dager (E) 7 dager og (F) 10 dager. Noen målinger er tatt ut på grunn av feilkilder, se beskrivelse i metod delen.



Figur 4: Dataen over gjennomsnittlig SMU med punkter etter dag 0, 3, 7 og 10, for alle lysintensitetene.

Tabell 2. Oversikt over gjennomsnittlig prosentandel av talte mikroalger som er single i flowcytometrinstrumentets opptaksvolum per måling av samtlige 28 prøver.

Gjennomsnittlig prosent	0 LUX	9 LUX	37 LUX	107 LUX	173 LUX	281 LUX
Måling etter 3 dager	99	98	98	98	98	98
Måling etter 7 dager	100	99	97	93	92	95
Måling etter 10 dager	99	98	98	60	54	62

Diskusjon

I denne studien har hvilken lysintensitet som egner seg best for vekst av dyphavsalgen *R. Salina* blitt undersøkt. Resultatene er forskjellige i forhold til antall dager, men de viser at alger vokser best i en lysintensitet på omtrent 107 LUX.

Målingen som ble gjennomført etter dag 3 (figur 3A og 3D), viser et spesielt tydelig mønster for dataen, der lysintensitetsoptimumet ligger på rundt 107 LUX. På en annen side viser figur 3E ikke et lysintensitetsoptimum rundt, fordi lysintensitetene 37 LUX og over nådde bæreevnen. Det er verdt å bemerke seg at figur 3E viser et svært høyt standardavvik på målingene for lysintensiteten 37 LUX, noe som kan påvirke hva som er det reelle lysintensitetsoptimumet. Allikevel er standardavviket nokså lavt for de andre lysintensitetene, som gjør at vi kan se bort ifra 37 LUX målingen. På flere av stolpediagrammene i figur 3 kan man tydelig se at noen av parallellene er svært lave i forhold til resten. Dette medfører et lavere gjennomsnitt enn hva man kan tenke seg er reelt, noe som direkte kan påvirke resultattolkningen. Konkret vil det bety at lysoptimumet kan ligge lavere enn 107, selv om figur 3D viser et lysoptimum på omkring 107 LUX.

På en annen side er det viktig å bemerke seg at vekstraten begynner å stagnere på rundt 2000 SMU, som man tydelig kan se på figur 4 og figur 3E. Dette kan tyde på at *R. Salina* når sin bæreevne i denne vekstkulturen. Årsaker til dette kan skyldes tetthetsavhengige faktorer i form av plass, mangel på næring, stress, sykdom, opphopning av avfallsstoffer og tilgang på lys og vann. Det er vanskelig å si hvilke konkrete tetthetsavhengige faktorer som har ført til bæreevnen for populasjonen, men det har utvilsomt gjort det vanskeligere å kunne bruke målingene fra dag 7 og 10 til å konkludere med et lysintensitetsoptimum for forsøket. For å kunne bekrefte resultatene i større grad kan det være lurt å repetere forsøkene videre, ved å enten starte med en betydelig større mengde vekstmedium, eller tilsette vekstmedium underveis. Et annet alternativ for videre forskning kunne vært å endre målingsintervallene, ved å gjennomføre hyppigere målinger. Dette kan man spesielt tenke seg at kan være lurt på grunnlag av at SMU nådde en såpass høy verdi etter kun 3 dager. Figur 4 illustrerer også dette på en god måte ved at lysintensitetene 107, 173 og 281 LUX faller likt sammen etter målingen for dag 7. I tillegg viser figur 4 hvordan lysintensitetene endrer plassering med tanke på høyest antall SMU. I forhold til de nevnte observasjonene, kan det derfor være interessant å inkludere målinger for dag 3, 4, 5 og 6. Dersom forsøket skulle blitt gjennomført på nytt, kunne det og være hensiktsmessig å inkludere flere lysintensiteter mellom 37 og 173 LUX, for å få en mer spesifikk lysintensitet. Selv om resultatene peker på en lysintensitet på 107 LUX, er det altså vanskelig å vite om dette er lysintensitetsoptimum eller kun den nærmeste lysintensiteten.

Siden *R. salina* fluorescerer så spesifikt og homogent, blir resultatene fra flowcytometri veldig nøyaktige. Dette øker validiteten til resultatene og forsøket.

Selv om man fra resultatene kan observere og anta et lysintensitetsoptimum, er det likevel flere feilkilder som er verdt å se i sammenheng med disse resultatene. Da prøvene ble analysert med flowcytometri, ble dubletter selektert bort til fordel for en oversikt over antall single mikroalger. Det kan hende at dublettene var i vekstfase og dermed skulle skilles til å bli to nye alger som vist på figur 2D. Dermed kan det reelle antall mikroalger vært høyere enn det fremsettes i resultatene. Dette vil derimot ikke ha så stor påvirkning om antall dubletter var omtrent konstant gjennom de fire målingene, med unntak av målingen etter dag

10. Som man kan se i tabell 2 er antall single mikroalger svært lave i målingen for dag 10 ved lysintensitetsgruppene 107, 173 og 281 LUX. Dette kan skyldes tetthetsavhengige faktorer som har forstyrret målingene, som man kan se på stolpediagrammene figur 3C.

En annen systematisk feil som kan ha påvirket forsøket er selve oppsettet av lysene. Figur 1B viser hvordan lysene var plassert i forhold til kolbene. Kolbene med *R. salina* kan, som man ser på bildet, får ulik mengde lys, og i noen tilfeller ingen mengde lys dersom plasseringen blir feil. Denne feilplasseringen kan føre til at mikroalgen ikke får nok lys til å reproducere seg slik resten av parallellene gjør og har kapasitet til. Dette kan ha vært en direkte eller medvirkende årsak til hvorfor C5 og F4 viste bortimot 0 SMU som man kan se på standardavviket til figur 3D, samt figur 3A. På en annen side gjorde testing med de andre mer presise truecount 50161 rørene at dataen fikk mer validitet, siden resultatene var forholdsvis like som målingene med truecount 50959 rørene.

For videre forskning kan det være interessant å se på andre biologiske faktorer som påvirker vekstvilkårene til algen *R. salina*. Tilgang på næringsstoffer, endring i salinitet eller temperatur kan påvirke algen. Derfor kan det være gunstig å undersøke de gunstige vekstvilkårene også her, for å kunne effektivisere veksten og dermed også bidra til en raskere bærekraftig fremtid.

Anerkjennelser

Vi vil gi en spesiell takk til Hans Christian Aas som er forsker og leder ved avdeling for kjernefasiliteten flowcytometri ved Ullevål Sykehus for den fremragende veiledningen og hjelpen, og ikke minst muligheten til å bruke flowcytometriinstrumentet ved fasiliteten.

Referanseliste

- Aarnes, H. (2023). *Karbonfiksering*. Hentet den 12.02.2025 fra: <https://snl.no/karbonfiksering>
- Aarnes, H. (u.å.). *Cryptomonader*. Hentet den 8.2.2025 fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/c/cryptomon.html>
- Benestad, R., Mamen, J., Harstveit, K., & Fuglestad, J. S. (2020). *Klimaendringer*. Hentet den 15.1.2025 fra: <https://snl.no/klimaendringer>
- Bjørnson, E. jr., & Aarnes, H. (2021). *Fotosyntese*. Hentet den 10.02.2025 fra: <https://snl.no/fotosyntese>
- Fichtbauer, A., Ralph, P. J., & La Russa, M. (2023). Controlling the nitrogen environment for optimal *Rhodomonas salina* production. *Journal of Applied Phycology*, 35(4), 1565–1574. Hentet den 7.2.2025 fra: <https://doi.org/10.1007/s10811-023-03020-0>
- Føyn, L., Von Quillfeldt, C., & Olsen, E. (2002). *Miljø- og ressursbeskrivelse av området Lofoten–Barentshavet*. Hentet den 13.02.2025 fra: https://www.hi.no/resources/publikasjoner/fisken-og-havet/74737/nr.6-2002_miljo-_og_ressursbeskrivelse_av_barentshavet.pdf
- Frivall, Å. (2022). *Oksidativt stress*. Hentet den 5.02.2025 fra: https://sml.snl.no/oksidativt_stress
- Halstvedt, C., Rohrlack, T., Andersen, T., Skulberg, O., & Edvardsen, B. (2025). *Seasonal dynamics and depth distribution of Planktothrix spp. in Lake Steinsfjorden (Norway) related to environmental factors*. *Journal of Plankton Research*, 29(5), 471–482. Hentet den 25.1.2025 fra: <https://doi.org/10.1093/plankt/fbm036>
- Hauge, I. K. (2020). *Tare kan redde Oslofjorden*. Bellona. Hentet den 17.1.2025 fra: <https://bellona.no/nyheter/havbruk/2020-02-miljostatus-i-oslofjorden>
- Hyka, P., Lickova, S., Přibyl, P., Melzoch, K., & Kovar, K. (2013). *Flow cytometry for the development of biotechnological processes with microalgae*. *Biotechnology Advances*, 31(1), 2–16. Hentet den 14.2.2025 fra: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.04.007>
- Jenssen, E. (2024). *Hvor lyst må det være før alger kan vokse?* Hentet den 14.1.2025 fra: <https://www.npolar.no/nyhet/hvor-lyst-maa-det-vare-for-alger-kan-vokse/>
- Kirkeng, E. (2025). *Analyserer alger på Ullevål sykehus*. Hentet den 3.2.2025 fra: <https://skolesamarbeid.oslocancercluster.no/analyserer-alger-pa-ulleva-sykehus/>
- Kjensmo, J., & Hongve, D. (2022). *Eutrofiering*. Hentet den 27.01.2025 fra: <https://snl.no/eutrofiering>

- Latsos, C., Wassenaar, E., Moerdijk, T., Coleman, B., Robbens, J., Roy, S., Bastiaens, L., van Houcke, J., & Timmermans, K. R. (2022). *Effect of pH on Rhodomonas salina* growth, biochemical composition, and taste, produced in semi-large scale under sunlight conditions. *Journal of Applied Phycology*, 34(3), 1215–1226. Hentet den 20.01.2025 fra: <https://doi.org/10.1007/s10811-022-02730-1>
- Oostlander, P. C., Latsos, C., van Houcke, J., Wijffels, R. H., & Barbosa, M. J. (2020). Production of *Rhodomonas* sp. at pilot scale under sunlight conditions. *Algal Research*, 48, 101934. Hentet den 1.2.2025 fra: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101934>
- Oostlander, P. C., van Houcke, J., Wijffels, R. H., & Barbosa, M. J. (2020). Optimization of *Rhodomonas* sp. under continuous cultivation for industrial applications in aquaculture. *Algal Research*, 47, 101889. Hentet den 30.1.2025 fra: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101889>
- Samuelsen, O., Hannisdal, R., Parsons, A., Escobar, R., & Agnalt, A.-L. (2024). *Kunnskapsstatus – legemidler i fiskeoppdrett (2024)*. Hentet den 6.1.2025 fra: <https://www.hi.no/en/hi/nettrapporter/rapport-fra-havforskningen-2024-25>
- Scrol.net. (2024). *The Norwegian Culture Collection of Algae | NORCCA*. Hentet den 4.1.2025 fra: <https://norcca.scrol.net/>
- Thrive Agritech. (2020). *Algae growth with LED lighting*. Hentet den 10.11.2025 fra: <https://www.thriveagritech.com/algae-growth-with-led-lighting/>
- Trafton, A. (2017). *Harnessing the right amount of sunshine*. Hentet den 11.1.2025 fra: <https://news.mit.edu/2017/protein-moss-algae-defend-against-sunlight-0717>
- UiO Realfagsbiblioteket. (2017, 15. november). *Bente Edvardsen: Symbiose og havets alger (BIO-konferansen 2017)* [Video]. Hentet den 7.11.2025 fra: <https://www.youtube.com/watch?v=fBOu73bTU94>
- Vu, M. T. T., Douëtto, C., Rayner, T. A., Thoisen, C., Nielsen, S. L., & Hansen, B. W. (2015). Optimization of photosynthesis, growth, and biochemical composition of the microalga *Rhodomonas salina*—an established diet for live feed copepods in aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, 28(3), 1485–1500. Hentet den 9.2.2025 fra: <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0722-2>
- Wikipedia contributors. (2006, 11. august). *Fotoinhibering*. Hentet den 6.2.2025 fra: <https://no.wikipedia.org/wiki/Fotoinhibering>
- Wikipedia contributors. (2024). *Rhodomonas*. Hentet den 17.2.2025 fra: <https://en.wikipedia.org/wiki/Rhodomonas>
- Wimalasekera, R. (2019). *Effect of light intensity on photosynthesis. I Photosynthesis, productivity and environmental stress (Vol. 1, s. 65–73)*. Hentet den 2.2.2025 fra: <https://doi.org/10.1002/9781119501800.ch4>