

Jani Strengell

# Elinympäristön suolapitoisuuden vaikutus Itämeren *Skeletonema marinoi* -piilevälajin kasvuun ja perustuotantoon

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioalan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

17.5.2015

Tekijä(t) Otsikko  Sivumäärä Aika	Jani Strengell Elinympäristön suolapitoisuuden vaikutus Itämeren <i>Skeletonema marinoi</i> -piilevälajin kasvuun ja perustuotantoon 30 sivua + 1 liite 17.5.2015
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioalan koulutusohjelma
Ohjaaja(t)	Erikoistutkija Anke Kremp Tutkija Conny Sjöqvist Tutkintovastaava Jarmo Palm
<p>Opinnäytetyö tehtiin Suomen ympäristökeskuksen (SYKE) merentutkimuslaboratoriossa Helsingin Kumpulassa osana laajempaa tutkimusta. Opinnäytetyössä käsiteltyjen tutkimusten lisäksi laajempi tutkimus sisälsi useaa eri leväkantaa sisältäneiden näytteiden kvantitatiivisen DNA-identifikaation.</p> <p>Työn tarkoituksena oli tutkia elinympäristön suolapitoisuuden vaikutusta Itämeressä elävään <i>Skeletonema marinoi</i> -piilevälajiin. Koko maapallolle levinnyt <i>S. marinoi</i> on tärkeä laji myös Itämeren ravinnekierron kannalta. Suolapitoisuudeltaan matala Itämeri on lähes suljettu murtovesiallas ja siksi mielenkiintoinen kohde levätutkimuksessa. Arviolta puolet kaikkien merien ja neljännes maapallon kaikkien eliöiden yhteenlasketusta perustuotannosta tulee piilevistä.</p> <p>Työn kokeellisessa osiossa kasvatettiin Itämerestä eristettyjä piileväkantoja kolmessa eri suolapitoisuudessa, jotka olivat 3, 5 ja 20 PSU. 5 PSU:n näytteet toimivat standardinäytteinä. Samalla tutkittiin diversiteetin mahdollista vaikutusta kasvattamalla näytteitä, jotka sisälsivät yhtä, viittä tai 20:tä eri <i>S. marinoi</i> -kantaa edellä mainituissa suolapitoisuuksissa. Piilevänäytteiden kasvua, ravinnepitoisuuksia ja yhteyttämistehokkuutta mitattiin yhteensä kahdeksan päivän ajan.</p> <p>Tutkimuksen tuloksena oli havainto matalimman 3 PSU:n suolapitoisuuden vaikuttavan kasvua, ravinnepitoisuuksia ja yhteyttämistehokkuutta rajoittavasti. Korkealla 15 PSU:n suolapitoisuudella ei havaittu selkeitä vaikutuksia. Myöskään diversiteetillä ei havaittu olevan selkeitä vaikutuksia.</p>	
Avainsanat	<i>Skeletonema marinoi</i> , piilevä, suolapitoisuus, PSU, Itämeri, perustuotanto

Author(s) Title Number of Pages Date	Jani Strengell Habitat salinity effect on the growth and primary production of <i>Skeletonema marinoi</i> diatom species in the Baltic Sea 30 pages + 1 appendice 17 May 2015
Degree	Bachelor of Laboratory Sciences
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructor(s)	Anke Kremp, PhD Conny Sjöqvist, MSc Jarmo Palm, MSc
<p>This thesis was made in the Marine Research Centre of Finnish Environment Institute (SYKE) at Kumpula, Helsinki. Analyses made for this thesis were a part of a wider research of <i>Skeletonema marinoi</i> diatom species of the Baltic sea. Data for the thesis was collected during an internship in SYKE.</p> <p>The objective of this thesis was to study the effect of changes in salinity on the <i>S. marinoi</i> diatom species growth and primary production in the Baltic sea. Globally distributed <i>S. marinoi</i> has also an important role in the nutrient cycle of the Baltic sea. The Baltic sea is a brackish sea, which means the salinity of the sea is low. As a nearly closed brackish water system with unique features, the Baltic sea is an interesting subject for diatom research. Diatoms are estimated to contribute to roughly a half of the global oceanic primary production and one fifth of the global total primary production of all species.</p> <p>The theoretical part of this thesis contains information about diatoms generally and the Baltic sea as an environment to diatoms. It also covers the most important nutrients to diatoms, which are carbon, nitrogen, phosphorus and silicate. Concepts of primary production and efficiency of photosynthesis are explained. The ANCA-MS method for measuring carbon and nitrogen concentrations is described.</p> <p>In the empirical part of this thesis, a setup was made in which different strains of <i>S. marinoi</i> isolated from the Baltic sea were grown in three different salinities. Salinities of 3, 5 and 20 PSU were used. Samples grown in 5 PSU were used as a standard. Also, the possible effect of diversity was studied by growing different numbers of <i>S. marinoi</i> strains in the salinities mentioned above. The number of strains used in samples were 1, 5 and 20 strains. Growth, nutrient concentration and efficiency of photosynthesis were measured for eight days.</p> <p>It was discovered that a low 3 PSU salinity clearly restricted growth, nutrient concentration and efficiency of photosynthesis in the studied samples. A high 15 PSU salinity and diversity were not discovered to have any significant effect on the <i>S. marinoi</i> diatoms.</p>	
Keywords	<i>Skeletonema marinoi</i> , diatom, salinity, PSU, the Baltic sea, primary production

# Sisällys

## Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Teoria	2
2.1	Piilevät	2
2.2	Itämeri ja piilevät	2
2.3	Ravinteet	4
2.4	Perustuotanto	7
3	Työn suoritus	9
3.1	Koesuunnitelma	9
3.2	Piileväkasvatusten valmistelu ja ylläpito	10
3.3	Näytteenotto ja mittaukset	11
3.3.1	Solulaskenta	11
3.3.2	Klorofylli a -pigmentti	12
3.3.3	Ravinteet	13
3.3.4	Perustuotanto	14
4	Tulokset ja niiden tulkinta	15
4.1	Solulaskenta	15
4.2	Klorofylli a	18
4.3	Ravinteet	21
4.4	Perustuotanto	26
5	Yhteenveto	28
	Lähteet	29
	Liitteet	
	Liite 1. F/2 kasvatuliuos	

## Lyhenteet

SYKE	Suomen ympäristökeskus
PSU	Practical salinity unit, veden suolapitoisuus. 1 PSU vastaa noin 0,1 %
POC	Particular organic carbon. Veteen liukenematon hiili.
PON	Particular organic nitrogen. Veteen liukenematon typpi.
POP	Particular organic phosphorus. Veteen liukenematon fosfori.
BSi	Biogenic silica. Piileville tärkeä silikaattimineraali.
DIC	Dissolved inorganic carbon. Veteen liuennut epäorgaaninen hiili
IR	Infrared. Sähkömagneettisen säteilyn infrapuna-alue.
<sup>14</sup> C	Hiili-14. Hiilen radioaktiivinen isotooppi.
<sup>15</sup> N	Typpi-15. Typen stabiili isotooppi.
<sup>13</sup> C	Hiili-13. Hiilen stabiili isotooppi.
ANCA-MS	Automated Nitrogen Carbon Analyser - Mass Spectrometer  Typpi- ja hiilianalyssaattori johon yhdistetty massaspektrometri

## 1 Johdanto

Tässä opinnäytetyössä tutkitaan suolapitoisuuden vaikutusta Itämeren *Skeletonema marinoi* -piilevälajin kasvuun ja kykyyn hyödyntää elinympäristönsä ravinteita. Työn tarkoituksena on havaita piilevissä muutoksia, joita elinympäristön suolapitoisuuden muuttuminen mahdollisesti niissä aiheuttaa. Mahdollisia muutoksia seurataan mittaamalla Itämerestä eristettyjen *S. marinoi* -piileväkantojen hiili-, typpi-, fosfori, silikaatti- ja klorofylli a -pitoisuuksia sekä yhteyttämistehokkuutta kahdeksan päivän ajan kolmessa eri suolapitoisuudessa. Osa suoritetuista analyyseistä lähetettiin analysoitavaksi Helsingin yliopiston Tvärminnen eläintieteelliselle asemalle Hangossa.

Meren suolapitoisuuden vaikutusta Itämeren *S. marinoi* -piilevälajiin tutkitaan tässä työssä kasvattamalla leviä laboratorio-olosuhteissa. Elinympäristön suolapitoisuus saattaa vaikuttaa ravinteiden sitoutumiseen ja piileväsolujen kasvuun. Piilevät tarvitsevat elinympäristöstään erityisesti hiiltä, typpeä ja happea yhteyttämiseen ja solun sisäisten biokemiallisten prosessien ylläpitämiseen. Silikaattia piilevät tarvitsevat suojaavan soluseinän rakentamiseen. Ympäristöstään sitomansa hiilidioksidin piilevät muuntavat niille käyttökelpoiseen muotoon klorofyllien avulla. Piilevien sitoman hiilen (POC) ja typen (PON) määrää voidaan mitata isotooppisuhde-massaspektrometrisesti. Klorofylli a:n, fosforin (POP) ja silikaatin (BSi) määrät mitataan spektrofotometrisesti. Perustuotantomittauksissa selvitetään kuinka tehokkaasti piilevät muuntavat ympäristöstään sidottua hiiltä energiakseen. Yhteyttämistehokkuuden määrittämiseksi piileviin annetaan sitoutua radioaktiivista hiilen isotooppia hiili-14:ää, jonka määriä soluissa voidaan mitata nesteuikelaskennalla. Yhteyttämistehokkuuden selvittämiseksi on määritettävä veteen sitoutuneen epäorgaanisen hiilen (DIC) määrä, jotka mitataan tässä työssä IR-spektrometriaa hyödyntävällä hiilianalysointilaitteella.

Opinnäytetyö on tehty Suomen ympäristökeskuksen merentutkimuslaboratoriossa, Helsingin Kumpulassa. SYKE on valtion ympäristöministeriön alainen tutkimus- ja asiantuntijalaitos. Työ on osa laajempaa tutkimusta, jonka tekemisessä avustin erikoistutkija Anke Krempiä ja tutkija Conny Sjöqvistiä työharjoitteluni aikana.

## 2 Teoria

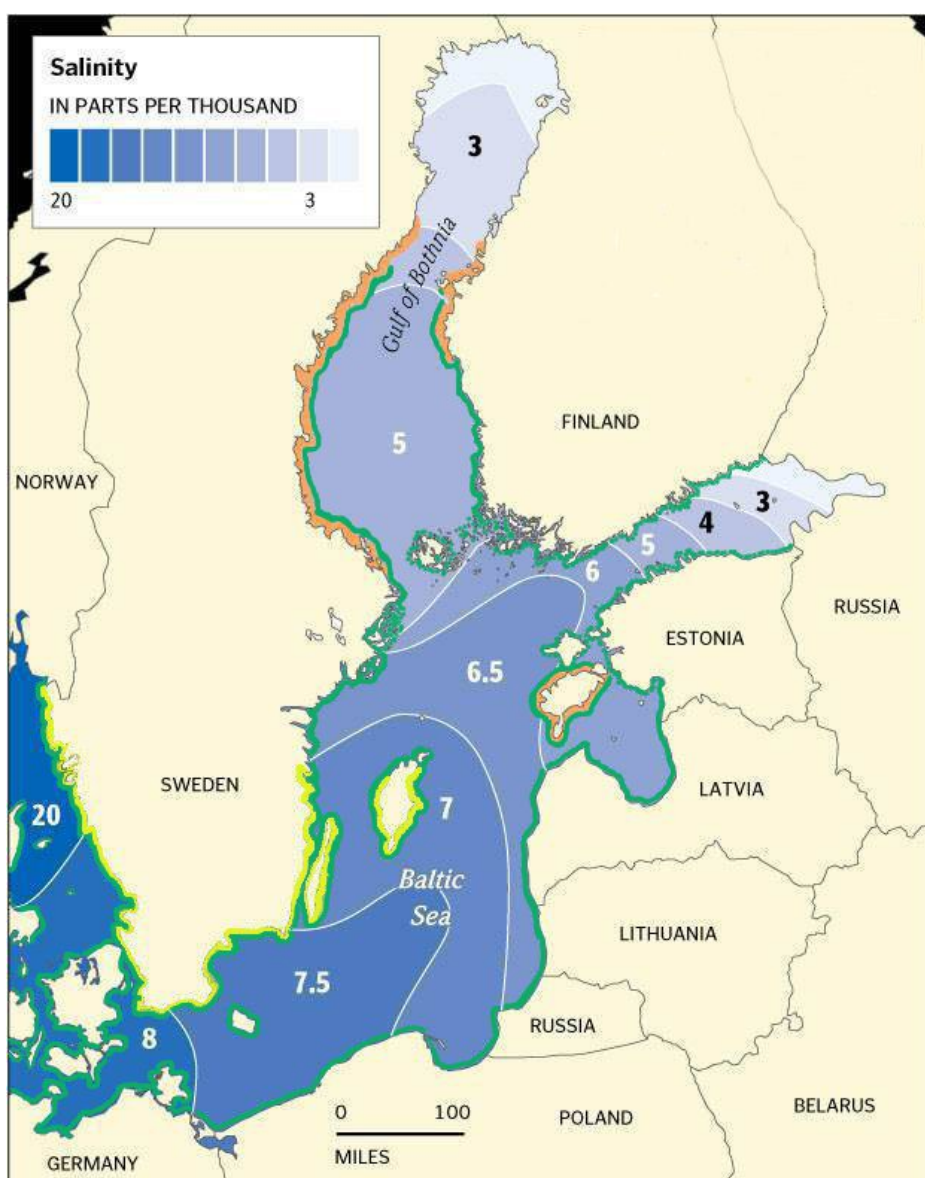
### 2.1 Piilevät

Piilevät (Bacillariophyta) ovat leväryhmä yksisoluisia eukaryootteja, jotka taksonomisesti luokitellaan ruskeisiin leviin (Heterokontophyta) kuuluviksi. Piilevät esiintyvät yksittäisinä soluina tai yhdyskuntina ja levinneisyys kattaa koko maapallon. Piilevien erityispiirteenä on niiden silmiinpistävä symmetrisyys. Nimitys piilevä (diatom) johtuu niiden kaksiosaisesta soluseinästä, frustulista, joka koostuu pääasiassa piidioksidista [1]. Soluseinät ovat kovia ja huokoisia, suojaen piilevää ja mahdollistaen vuorovaikutukset ympäristön kanssa. Soluseinien huokosten kautta piilevät ottavat ravinteita ympäristöstään ja poistavat aineenvaihduntatuotteita. Soluseinät koostuvat kahdesta samanmuotoisesta mutta hieman erikokoisesta soluseinän puolikkaasta (theca). Soluseinän puolikkaat ovat hieman sisäkkäin ja kiinnittyneitä toisiinsa piidioksidin eli silikaatin avulla. Soluseinän puolikkaista päälimmäistä ja hieman suurempaa puolikasta kutsutaan epithecaksi. Sisempää ja pienempää puolikasta hypothecaksi. Kaksiosainen soluseinä myös mahdollistaa suvuttoman lisääntymisen. Piilevien suvuttomassa lisääntymisessä solu jakaantuu kahdeksi soluksi, jotka kumpikin pitävät yhden soluseinän puolikkaan itsellään ja kasvattavat toisen puolikkaan. Pienemmän soluseinän puolikkaan, hypothecan, saanut solu muuttaa tämän vanhan puolikkaan ulommaiseksi puolikkaaksi, epithecaksi, ja kasvattaa uuden hypothecan. Tästä johtuen piilevien koko pienenee suvuttomassa lisääntymisessä jokaisella lisääntymiskerralla. Piilevät voivat myös lisääntyä suvullisesti ja tekevät niin muutaman kuukauden välein, kun ne ovat saavuttaneet minimikokonsa. Suvullisessa lisääntymisessä piilevät tuottavat itiöitä, joista kasvavat piilevät ovat jälleen saman kokoisia kuin alkuperäiset solut suurimmillaan [2].

### 2.2 Itämeri ja piilevät

Itämeri on murtovesiallas, joka tarkoittaa sitä että veden suolaisuus on keskimäärin korkeampi kuin makeissa vesissä mutta matalampi kuin valtamerissä. Itämeren suolapitoisuus on keskimäärin 7 PSU ja siksi verrattain matala kaikkien valtamerien keskisuolaisuuteen 35 PSU verrattuna [3]. Itämeri on myös hyvin matala, keskisyvyyden ollessa

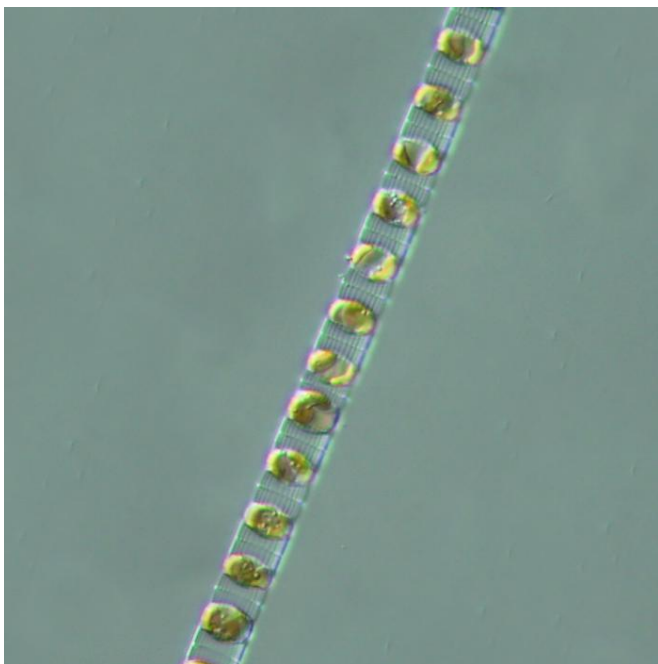
vain noin 54 metriä. Itämeren matala suolapitoisuus johtuu sen vähäisestä vesimäärästä verrattuna valuma-alueiden määrään. Valuma-alueilta virtaa makeaa jokivettä Itämereen laimentaan sen suolapitoisuutta ja tuoden mukanaan myös merta ja sen eliöstöä kuormittavia aineita. Suolapitoisuus Itämeressä ei ole kaikkialla sama, vaan vaihtelee suuresti alueittain välillä 1-20 PSU. Suolapitoisuuden vaihtelua Itämeressä on havainnollistettu kuvassa 1. Matalimmat suolaisuudet sijaitsevat Perämerellä ja Itäisellä Suomenlahdella. Korkein suolapitoisuus löytyy Tanskan salmista [4]. Itämeren suolapitoisuutta lisää paikallisesti ajoittain suolapulssit, joissa Atlantin suolaista merivettä työntyy Tanskan salmien kautta Itämereen [5].



Kuva 1. Itämeren suolapitoisuudet alueittain [6].



Itämeressä erilaisia piilevälajeja on noin 700-800 ja ne muodostavat merkittävän osan Itämeren kasviplanktonista. Itämeren piilevälajit ovat pääasiassa kylmissä vesissä viihtyviä aidosti planktonisia tai vesikasvien pinnalla sekä pohjassa eläviä lajeja [7]. Piileviä esiintyy Itämeressä ympäri vuoden, kukintamaksimien ajoittuessa keväeseen ja syksyyn. Kuvassa 2 näkyy *S.marinoi* –lajin yksilöitä, jotka ovat kiinnittyneet yhteen nauhamaiseksi rakenteeksi muodostamallaan filamenteilla.



Kuva 2. Toisiinsa kiinnittyneitä *S.marinoi* –piilevälajin yksilöitä.

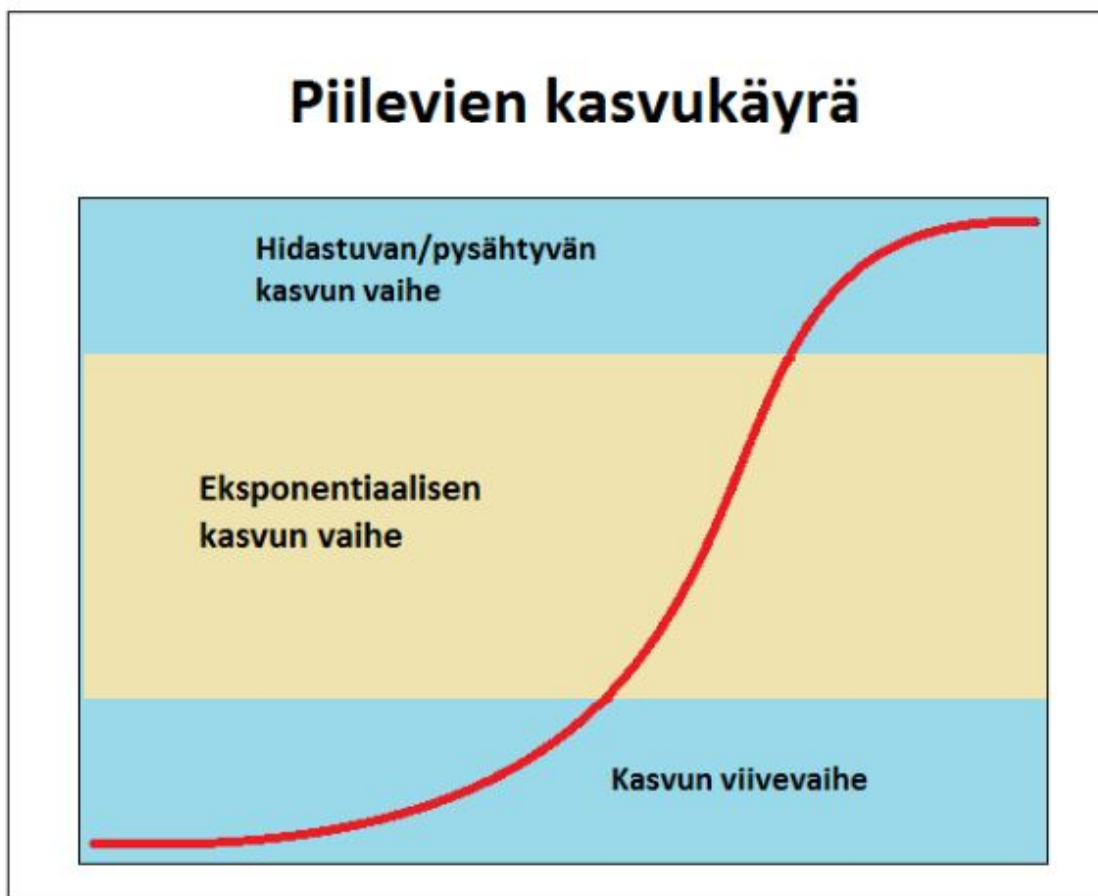
### 2.3 Ravinteet

Hiili, typpi, fosfori ja silikaatti ovat tärkeitä ravinteita piileville. Näistä hiili, typpi ja fosfori osallistuvat piileväsolujen biokemiallisiin prosesseihin ja ovat edellytys piileväpopulaation kasvulle. Silikaattia piilevät tarvitsevat frustulin muodostamiseen. Piilevillä on myös tärkeä rooli näiden ravinneaineiden luonollisessa kierrossa. Fosforia, typpeä ja hiiltä vapautuu meriin orgaanisen aineksen hajoamisen seurauksena. Erityisesti merten pohjasedimentissä tapahtuva hajoaminen vapauttaa ravinteita takaisin kierto. Silikaattimineraalit eli kvartsit ovat peräisin maaperästä, josta ne liukenevat meriin mm. vulkaanisen toiminnan seurauksena. Myös jokien mukana kulkeutuu silikaattimineraaleja meriin.

POC, PON ja POP eli particulate organic carbon, nitrogen ja phosphorus tarkoittavat vedessä olevaa hiiltä, typpeä ja fosforia, jotka eivät ole kokonaan liuenneina veteen vaan kelluvat hiukkasina veden seassa. Tarkemmin määriteltynä ne ovat hiukkasia, jotka eivät läpäise 0,7 µm:n suodatinta. [8]. POC, PON, POP ja BSi -ravinnemääritykset kertovat kuinka optimaalisesti piilevät kasvavat sekä onko jokin näistä ravinteista rajoittava tekijä populaation kasvuille. Mittaamalla piileväsolujen sisältämä hiili, typpi, fosfori ja silikaattipitoisuudet voidaan saada tietoa populaation hyvinvoinnista Redfield-Brzezinskin suhdeluvun avulla.

Redfieldin suhdeluku on Yhdysvaltalaisen meritutkijan, Alfred Redfieldin, kehittämä suhdeluku joka kuvaa hiilen, typen ja fosforin atomimäärien suhdetta kasviplanktoneissa. Redfieldin suhdeluvun mukaan hiilen, typen fosforin suhde kasviplanktoneilla on aina lähes sama. Piilevien kohdalla käytetään Redfieldin suhdeluvusta laajennettua Redfield-Brzezinskin suhdelukua, joka ottaa huomioon myös silikaatin. [9 s.96]. Redfield-Brzezinskin suhdeluku on  $C : Si : N : P = 106 : 15 : 16 : 1$ . Tämä Redfield-Brzezinskin suhdeluku pätee siis vain jos kasvuolosuhteet ovat optimit eikä mikään ravinne ole rajoittava tekijä. Kasvua rajoittava ravinne saadaan selville vertaamalla sitä muiden ravinteiden määriin. Tutkijat eivät ole yksimielisiä suhdeluvun absoluuttisuudesta, koska muuttujia eri lajien ja ympäristötekijöiden välillä on paljon.

Ravinteiden mittausta varten otetaan näytteet piileväkasvatuksista. Laboratoriossa piilevät kasvavat kuvassa 3 osoitetun kasvukäyrän mukaisesti. Eksponentiaalinen kasvu hidastuu ja loppuu elintilan ja/tai ravinteiden loppuessa. Tärkeää on ottaa näytteet silloin kun piilevät ovat optimaalisimmassa kasvuvaiheessaan eli eksponentiaalisen kasvuvaiheen lopulla, koska silloin myös ravinteiden tarve on suurimmillan. Tässä opinnäytetyössä eksponentiaalisen kasvuvaiheen loppu ja optimaalisin POC/PON/POP/BSi näytteenottopäivä määritettiin kasvatuskokeella kasvattamalla piileviä kahdeksan päivän ajan ja laskemalla solut joka päivä.



Kuva 3. Piilevien kasvukäyrä

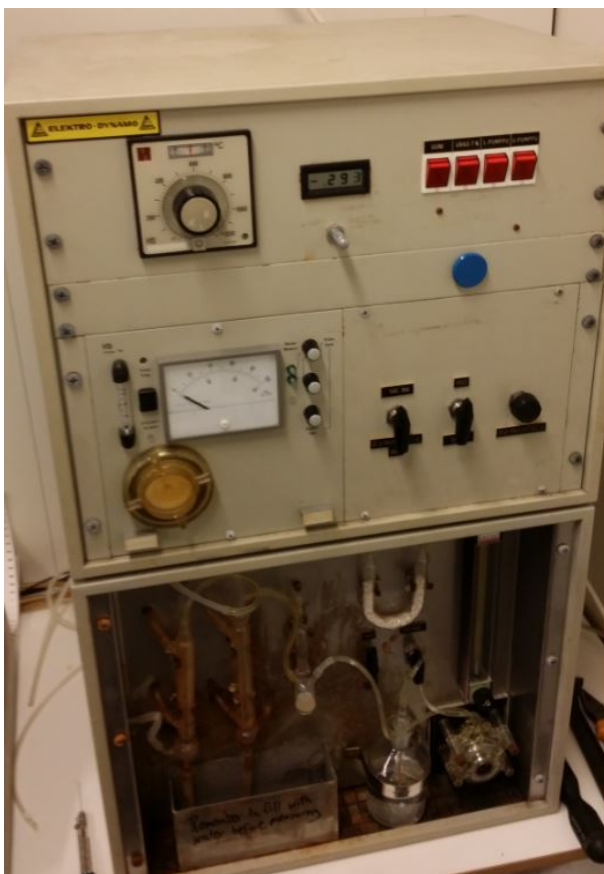
POC ja PON -pitoisuudet näytteissä voidaan määrittää tarkasti hyödyntäen massaspektrometrisiä menetelmiä. ANCA-MS typpi- ja hiilianalysointilaitteilla voidaan mitata typen ja hiilen määriä ilman manuaalista näytteiden esikäsittelyvaihetta [10, s.43-46]. Mittaukset voidaan suorittaa suoraan kiinteistä tai nestemäisistä näytteistä kuten esimerkiksi leväkasvustosta. Menetelmä koostuu kolmivaiheisesta prosessista. Ensin mitattavien aineiden erottaminen tapahtuu höyrystämällä näyte korkeassa lämpötilassa kaasuksi, joka ohjataan inertin kantokaasun avulla kaasukromatografiin. Kaasukromatografissa näytteen eri molekyylit erottuvat ja ANCA-laitteisto ohjaa halutut molekyylit jatkoanalyysiin massaspektrometrille. Massaspektrometrissä analysoidut molekyylit ensin pilkotaan fragmenteiksi ja ionisoidaan. Ionisoidut fragmentit ohjataan magneettikentän läpi, jolloin eri massa/varaus-suhteen omaavat fragmentit saavat magneettikentässä hieman toisistaan poikkeavan lentoradan. Tämän lentoradan muutoksen ansiosta saadaan selville millaisia eri fragmentteja alkuperäinen molekyyli sisältää [11, s.122]. ANCA-MS Lait-

teisto on niin herkkä että se havaitsee alkuaineiden isotooppien muutokset fragmenteissa koska saman alkuaineen isotoopit eroavat toisistaan niiden massaltaan. ANCA-MS -laitteistossa näyte kaasuuntuu puhtaaksi typpikaasuksi ( $N_2$ ) ja hiilidioksidiksi ( $CO_2$ ), joista voidaan määrittää typpi-15, hiili-13, kokonaistyyppi ja kokonaishiilimäärät [10, s.43-46].

## 2.4 Perustuotanto

Perustuotanto tarkoittaa yhteyttävien eliöiden sitomien ravinteiden muuntamista auringon valon avulla eliön ravinnoksi tai hyödynnettäväksi esimerkiksi solun rakennusaineina. Auringon säteilyenergiaa hyödyntävät piilevät vastaavat arviolta noin puolet maapallon merien ja noin viidenneksestä maapallon organismien yhteenlasketusta perustuotannosta [12]. Kasvien tavoin piilevät käyttävät kloroplasteja yhteyttämiseen. Fotosynteesissä tuotetun energian piilevät varastoivat krysolaminariini polysakkaridiksi sekä lipideiksi, jonka takia piileviä tutkitaan erityisesti biopolttoaineiden mahdollisina tuottajina [1]. Perustuotannon polttoaineena toimii hiilidioksidi, jota piilevät sitovat ympäristöstään. Valoisalla tapahtuvan yhteyttämisen lisäksi piilevät käyttävät hiiltä myös solun sisäisiin toimintoihin myös pimeässä jolloin yhteyttämistä ei tapahdu.

Perustuotantomittauksissa selvitetään kuinka tehokkaasti piileväsolut hyödyntävät kasvuympäristönsä hiiltä (DIC). Piilevät leimataan radioaktiivisella hiilen isotoopilla C-14, jolloin solujen käyttämän hiilen määrää voidaan inkuboinnin jälkeen analysoida nestetuikelaskurilla [13]. Piileviä inkuboidaan sekä valossa että pimeässä, jolloin solujen pimeätoimintoihin käyttämän hiilen määrä voidaan huomioida. Perustuotannon mittaamiseksi on myös tiedettävä piilevien kasvuympäristössä luonnostaan esiintyvän hiilen määrä (DIC), joka tässä opinnäytetyössä mitattiin kuvassa 4 näkyvällä Unicarb Universal Carbon Analyzer -hiilianalysoitsijalla (Elektro Dynamo). Unicarb Universal Carbon Analyzer -laite höyrystää näytteen korkeassa lämpötilassa ja kuljettaa kaasuuntuneen hiilidioksidin kantokaasun avulla infrapunadetektorille. Detektorina laitteessa toimii potentiometrinen URAS-3E IR-detektori [14].



Kuva 4. Unicarb Universal Carbon Analyzer –hiilianalysointilaitteisto

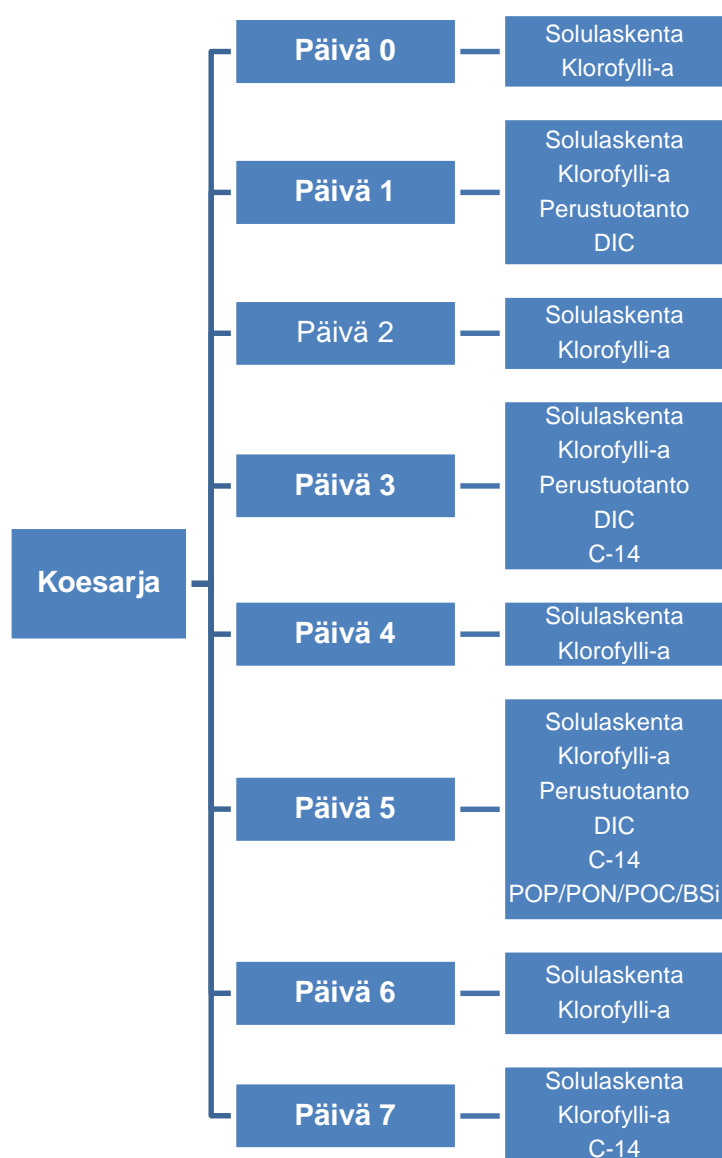
Piileväsolujen yhteyttämistehokkuus voidaan laskea kaavalla  $\frac{DIC \times {}^{14}C - POC \times 1,05}{Lisätty {}^{14}C}$  [13].

Kaavassa DIC on kasvuympäristön hiilen määrä.  ${}^{14}C$ -POC -nestetuikelaskennalla määritetty solujen sitoman hiili-14:n radioaktiivisten hajoamisten määrä tunnetun inkubointiajan lopussa. Kaavassa kerroin 1,05 korjaa hiilien isotooppien epätasapainoa solussa, koska piilevät suosivat hiilen tavallisista isotooppia  ${}^{12}C$  sitomalla sitä suhteessa enemmän kuin hiilen isotooppia  ${}^{14}C$ . Perustuotanto ilmoitetaan piilevien käyttämän hiilen määränä tietyssä ajassa ja tilavuudessa.

### 3 Työn suoritus

#### 3.1 Koesuunnitelma

Työn suoritusosaa varten tehtiin kuvassa 4 kaaviona havainnollistettu koesuunnitelma. Koesuunnitelman mittauspäivien suunnittelun avuksi suoritettiin ensin pilottikoe, jossa määritettiin piilevien eksponentiaalisen kasvun vaiheen olevan suurimmillaan mittauspäivänä viisi.



Kuva 4. Opinnäytetyön kokeellisen osuuden koesuunnitelma

### 3.2 Piileväkasvatusten valmistus ja hoito

Opinnäytetyön kokeellista osuutta varten valmistettiin seuraavanlainen näytesarja. Valmiiksi eristettyjä *S. marinoi*-lajin erilaisia kantoja oli käytössä yhteensä 20 kpl eri puolilta Itämeren. Näytteitä kasvatettiin laboratoriossa kolmessa eri suolapitoisuudessa: 3 PSU, 5 PSU ja 15 PSU. 5 PSU:n suolapitoisuudessa kasvatetut näytteet toimivat kontrollinäytteinä koska solukannat olivat eristetty merialueilta, joissa suolapitoisuus oli noin 5 PSU:a. Näytteitä valmistettiin siten että 1/3 näytteistä sisälsi vain yhtä kantaa, 1/3 sisälsi viittä kantaa ja 1/3 sisälsi kaikkia 20 eri kantaa. Jokaisesta näytteestä tehtiin 3 rinnakkaisnäytettä. Kasvatuksia oli siis yhteensä 27 kpl, taulukon 1 mukaisesti.

Taulukko 1. koesarjan näytteet

	1 kanta	5 kantaa	20 kantaa
Kontrolli, 5 PSU	x3	x3	x3
Stressi, 3 PSU	x3	x3	x3
Stressi, 15 PSU	x3	x3	x3

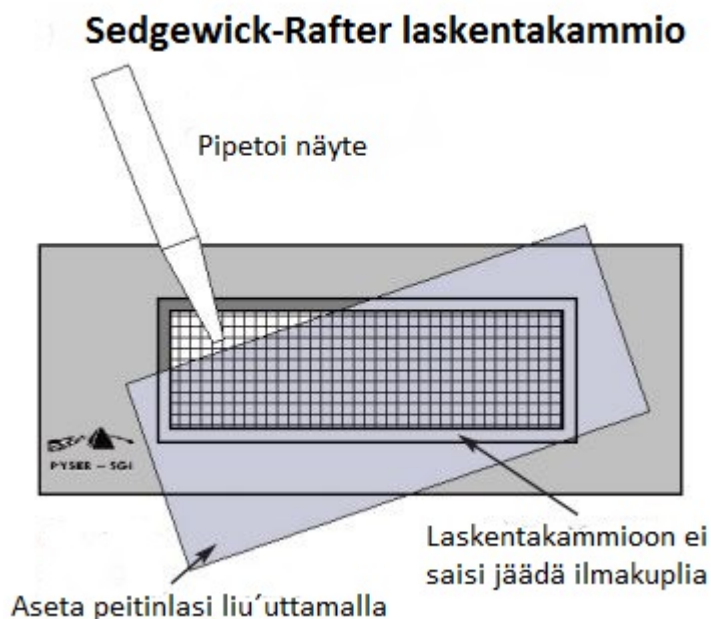
Levien kasvatusliuos f/2+Si (Liite 1) valmistettiin suodattamalla 40 litraa 6 PSU merivettä 0,45 µm + 0,2 µm suodattimen läpi, jonka jälkeen vesi autoklavoitiin. Autoklavoinnin jälkeen 6 PSU meriveteen lisättiin ravinteet. Leväkasvatuksia varten kasvatusliuoksia valmistettiin kolmella eri suolapitoisuudella: 2 PSU, 5 PSU ja 15 PSU. Levät siirrostettiin kasvatuspulloihin joissa oli kasvatusliuosta 500 ml/pullo. Siirrostettava solumäärä oli vakio 10 000 l<sup>-1</sup> kaikissa kasvatuksissa.

Kaikkia solukasvatuksia inkuboitiin 10°C lämpötilassa ja tasaisessa ympärivuorokautisessa valaistuksessa. Solukasvatuksia sekoitettiin päivittäin hellävaroen kääntelemällä näytteenoton yhteydessä.

### 3.3 Näytteenotto ja mittaukset

#### 3.3.1 Solulaskenta

Solulaskenta on rutiinitoimenpide leväkasvatuksessa. Solulaskennan tarkoitus on seurata kasvatettavien leväsolujen määrää ja samalla myös niiden hyvinvointia silmämääräisesti. Solulaskenta toteutetaan käyttämällä kuvassa 5 esitettyä solulaskentakammiota ja käänteisfaasimikroskooppia. Kasvatuspulloa täytyy varoen käännellä ennen näytteenottoa, jotta solut sekoittuisivat tasaisesti koko kasvatusliuokseen. Näyte pipetoidaan erilliseen putkeen ja värjätään Lugolin jodiliuoksella, joka samalla myös tappaa mikroskopoitavan näytteen kasviplanktonsolut. Lugolia tarvitaan vain 1-2 tippaa, jonka jälkeen näytettä sekoitetaan varovasti käännellen jotta lugol sekoittuisi tasaisesti koko näytteesseen.



kuva 5. Sedgewick-Rafter -laskentakammio. Muokattu lähteestä [15].

Näyte voidaan mitata laimentamattomana tai laimennettuna. Laimennus tapahtuu samaan kasvatusliuokseen jossa tutkittavat levät kasvavat, jotta laskettavan näytteen leväsolut eivät vaurioituisi ympäristön muutoksesta. Laimennettaessa huomioidaan lai-



mennuskerroin solumääriä laskettaessa. Laskentakammion tilavuus on 1 ml mutta näyttöä on hyvä pipetoida hieman enemmän ilmakuplien välttämiseksi. Samalla laskentakammion päälle asetetaan peitinlasi. Värjätty ja valmisteltu näyte on nyt valmis laskettavaksi. Näytteestä lasketaan vähintään noin 300 solua, jonka jälkeen voidaan tehdä arvio koko näytteen solumäärästä. Laskentakammio on jaettu tuhanteen yhtä suureen neliönmuotoiseen alueeseen ja siksi näytteestä voidaan laskea kuinka monta solua on keskimääräisesti yhdellä laskentakammion ruudulla. Solujen keskiarvo yhdellä neliöllä kerrotaan koko laskentakammion neliöiden lukumäärällä ja tulokseksi saadaan arvio soluista per millilitra. Esimerkki: soluja lasketaan 325 kappaletta. Nämä solut ovat laskettu yhteensä 15 ruudusta. Soluja on siis keskimäärin  $325/15$  eli 21,7 kappaletta/ruutu.  $21,7 \text{ solua} * 1000 \text{ ruutua}$  laskentakammiossa tarkoittaa siis yhteensä 21700 kpl soluja koko laskentakammiossa. Koska laskentakammion tilavuus on 1ml, niin voidaan sanoa että näytteessä on soluja noin 21700/ml. Jos kasvatuspullossa on ollut 50 ml leväkasvatusta, niin voidaan arvioida että koko pullossa on  $21700 * 50$  eli 1 085 000 solua. On huomiotava, että solulaskut ovat kuitenkin aina vain arvioita todellisesta määrästä.

### 3.3.2 Klorofylli a -pigmentti

Klorofyllit ovat biomolekyylejä, joita kasvit ja muut yhteyttävät organismit tarvitsevat muuntaessaan auringonvaloa kemialliseksi energiaksi. Klorofyllejä on kuutta eri tyyppiä, jotka hieman eroavat toisistaan kemialliselta rakenteeltaan [16]. Klorofylleistä yleisin on klorofylli a, joka ainoana klorofyllityypinä esiintyy kaikissa yhteyttävissä organismeissa. Mittaamalla piileväkasvatusten klorofylli a pitoisuutta, saadaan tietoa piileväsolujen lukumäärästä ja hyvinvoinnista. Klorofylli a -pitoisuudet voidaan selvittää spektrofotometrisesti vertaamalla näytteen absorptiota standardisuoran absorptioihin. Klorofylli a -standardit valmistetaan lähes puhtaasta klorofylli a -jauheesta, joka laimennetaan eri pitoisuuksiin. Luonnosta tai leväkasvatuksista otetuissa näytteissä on usein niin paljon mitausta häiritseviä epäpuhtauksia, että näytteet on suodatettava ja laimennettava sopivalle mittausalueelle.

Laboratoriossa kasvatetuista piilevistä otetaan näyte klorofyllimittausta varten joka päivä koejärjestelyn ajan. Näin voidaan seurata levien kasvua, joka on suoraan suhteessa mitattavan klorofylli a:n määrään. Näytteet otetaan pipetoimalla varovasti sekoitettua leväkasvatusta falcon-putkeen. Näytteet on suodatettava mahdollisimman pian näytteenoton jälkeen jo saman päivän aikana klorofyllien hajoamisen takia. Klorofyllit hajoavat valon

vaikutuksesta, joten näytteitä tulisi suojata valolta näytteenoton jokaisessa vaiheessa. Klorofyllinäytteiden suodatus toteutetaan imusuodatusmenetelmällä, jolloin klorofylliä sisältävät solut jäävät suodatinkalvolle. Suodatuksen jälkeen suodattimet siirretään puhtaisiin falcon-putkiin ja näytteet voidaan varastoida pakastimeen odottamaan mittauksia. Ennen varastoimista putkiin lisätään ensin puhdasta etanolia ja suojataan näytteet valolta. Etanoli hajottaa solut ja klorofylli vapautuu etanoliin. Ennen varastointia että mittauksia tehostetaan klorofyllien liukenemista etanoliin vorteksoimalla näytteet ennen seuraavaa suodatusta. Näytteet suodatetaan uudelleen ennen mittauksia käyttäen ruiskua. Klorofyllit absorboivat valoa hieman eri aallonpituuksilla johtuen niiden kemiallisen rakenteen eroavaisuuksista. Klorofylli a:n absorptiomaksimit ovat aallonpituuksilla 430 nm ja 662 nm.

Näytteet pakastettiin  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  odottamaan mittauksia. Ennen mittauksia otettiin klorofylli a -näytteet sekä standardit huoneenlämpöön noin tunniksi. Ennen mittausta näytteet vorteksoitiin ja suodatettiin uudelleen puhtaisiin koeputkiin käyttäen ruiskua ja  $0,7\text{ }\mu\text{m}$  GF/F laatusuodattimia. Näytteet sekä standardit pipetoitiin 96-kuoppalevylle ja mitattiin yhdellä mittauksella.

### 3.3.3 Ravinteet

Näytteenottoa varten  $0,7\text{ }\mu\text{m}$  suodattimet (Whatman GF/F, lot. 1825-025) happopestiin 1 M suolahapossa noin 5 tuntia. Seuraavaksi suodattimia pidettiin  $450\text{ }^{\circ}\text{C}$  uunissa 6 tuntia. Näytteitä varten otettiin jokaisesta piileväkasvatuksesta 50 ml leväkasvatusta/näyte. POC, PON ja POP -näytteet imusuodatettiin happopestyille ja poltetuille suodattimille siten, että jokaisesta näytteestä tuli 2 rinnakkaisnäytettä eli  $2 \times 25\text{ ml}$ . POP -näytteet huuhdottiin lisäksi natriumsulfaattilla ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). BSi -näytteet otettiin suodattamalla  $2 \times 13\text{ ml}$  leväkasvatusta. Kaikki suodatetut näytteet varastoitiin petrimaljoille ja lähetettiin analysoitavaksi Helsingin yliopiston Tvärminnen eläintieteelliselle asemalle [17].

### 3.3.4 Perustuotanto

#### DIC

3-pisteinen standardisuora tehtiin punnitsemalla natriumvetykarbonaattia 0,011 g, 0,022 g ja 0,031 g ja liuottamalla jokainen standardi 100 ml MilliQ –vettä. Näytteet otettiin piileväkasvatuksista ja DIC -pitoisuus mitattiin Unicarb Universal Carbon Analyzer (Elektro Dynamo OY, Helsinki) IR-spektrometrillä. Käytetty näytetilavuus oli 300 µl. Jokaisesta näytteestä tehtiin kolme rinnakkaismäärittystä.

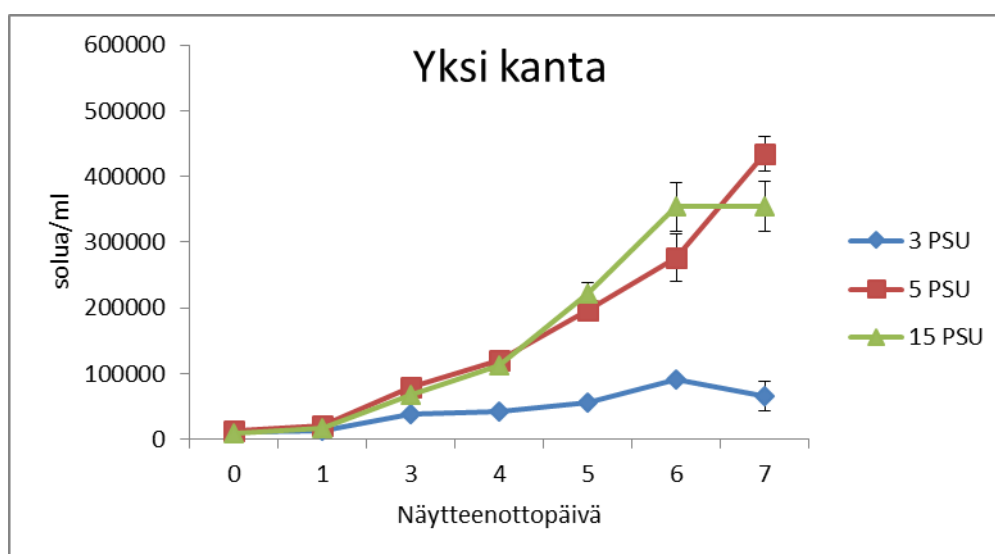
#### <sup>14</sup>C

Mittauksia varten happopestiin 20 ml tuikepulloja. Piileväkasvatuksista otettiin näytteet siten, että jokaisesta kasvatuksesta otettiin 2 näytettä valossa ja 1 näyte pimeässä inkubointia varten. Näytetilavuus oli 4 ml/näyte. Ennen inkubointia näytteisiin lisättiin hiilen isotooppia <sup>14</sup>C (DHI LAB, NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub>, 740000 Bq, Product ID: AMP-20-CI-1). Näytteitä inkuboitii 2h. Näytteisiin lisättiin 2-3 tippaa 1 M HCl ja 7 ml tuikenestettä (Perkin Elmer, Insta-Gel Plus, product. number:6013391). Näytteet mitattiin nestetuikelaskurilla (Wallac 1414 Win Spectral).

## 4 Tulokset ja niiden tulkinta

### 4.1 Solulaskenta

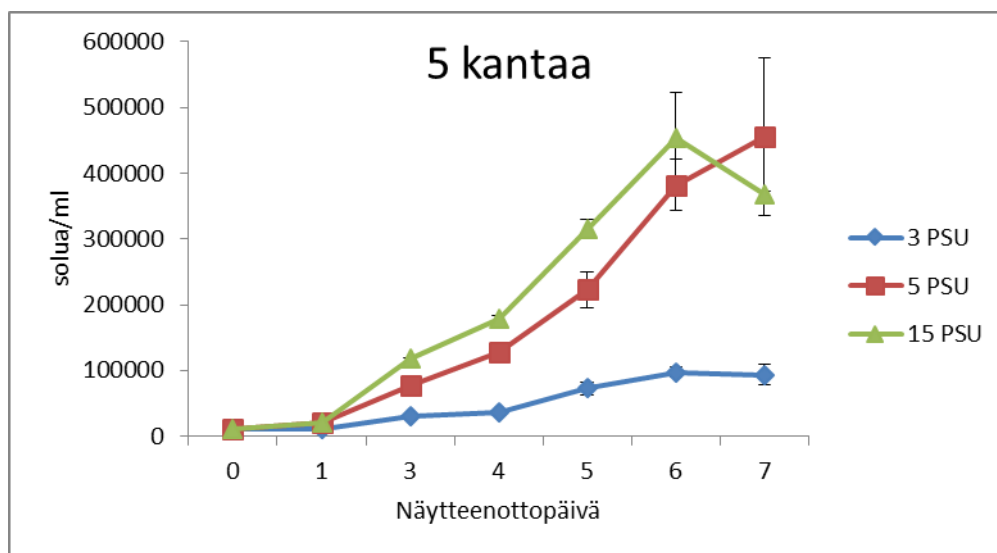
Koesarjan yhtä solukantaa sisältäneiden näytteiden solulaskennat eri suolapitoisuuksissa on esitetty kaaviona kuvassa 6. Jokainen mittauspiste on kolmen rinnakkaisnäytteen keskiarvo. Keskihajonnat on lasketty mittauspistekohtaisesti.



Kuva 6. Yksittäisen solukannan määrät eri suolapitoisuuksissa

3 PSU:n suolapitoisuudessa vain yhtä piileväkantaa sisältäneen näytteen kasvu jäi selkeästi vähäisemmäksi kuin 5 PSU:n ja 15 PSU:n suolapitoisuuksissa. 15 PSU:n suolapitoisuudessa kasvu oli nopeampaa kuin 5 PSU:n suolapitoisuudessa mutta kasvu myös pysähtyi aikaisemmin. Populaation lopullinen koko näytteenottopäivänä 7 jäi 15 PSU:ssa kasvaneilla soluilla pienemmäksi kuin 5 PSU:ssa kasvaneille.

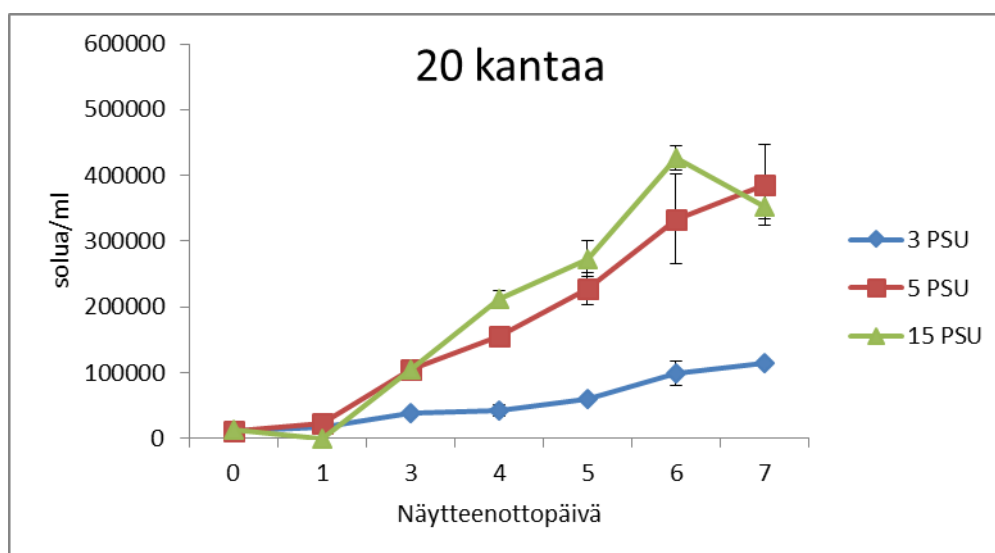
Koesarjan viittä solukantaa sisältäneiden näytteiden solulaskennat eri suolapitoisuuksissa on esitetty kaaviona kuvassa 7. Jokainen mittauspiste on kolmen rinnakkaisnäytteen keskiarvo. Keskihajonnat on lasketty mittauspistekohtaisesti.



Kuva 7. Viiden yhdistetyn solukannan määrät eri suolapitoisuuksissa

3 PSU:n suolapitoisuudessa viisi piileväkantaa sisältäneen näytteen kasvu jäi myös selkeästi vähäisemmäksi kuin 5 PSU:n ja 15 PSU:n suolapitoisuuksissa. 15 PSU:n suolapitoisuudessa kasvu oli nopeampaa kuin 5 PSU:n suolapitoisuudessa mutta kasvu myös pysähtyi aikaisemmin ja solujen määrä kääntyi laskuun näytteenottopäivän kuusi jälkeen. Populaation lopullinen koko näytteenottopäivänä seitsemän jäi 15 PSU:ssa kasvaneilla soluilla pienemmäksi kuin 5 PSU:ssa kasvaneille.

Koesarjan viittätoista solukantaa sisältäneiden näytteiden solulaskennat eri suolapitoisuuksissa on esitetty kaaviona kuvassa 6. Jokainen mittauspiste on kolmen rinnakkaisnäytteen keskiarvo. Keskihajonnat on lasketty mittauspistekohtaisesti.

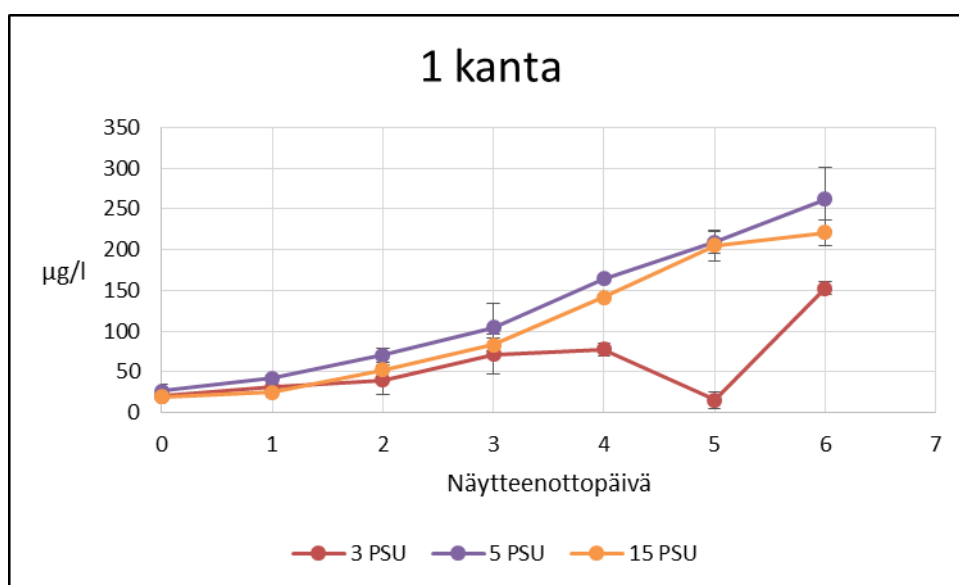


Kuva 8. 20:n yhdistetyn solukannan määrät eri suolapitoisuuksissa

Myös 20 kantaa sisältäneiden näytteiden kasvu 3 PSU:n suolapitoisuudessa jäi selkeästi vähäisemmäksi kuin 5 PSU:n ja 15 PSU:n suolapitoisuuksissa. 15 PSU:n suolapitoisuudessa kasvu oli nopeampaa kuin 5 PSU:n suolapitoisuudessa mutta kasvu myös pysähtyi aikaisemmin ja solujen määrä kääntyi laskuun päivän kuusi jälkeen. Populaation lopullinen koko näytteenottopäivänä seitsemän jäi 15 PSU:ssa kasvaneilla soluilla pienemmäksi kuin 5 PSU:ssa kasvaneille.

## 4.2 Klorofylli a

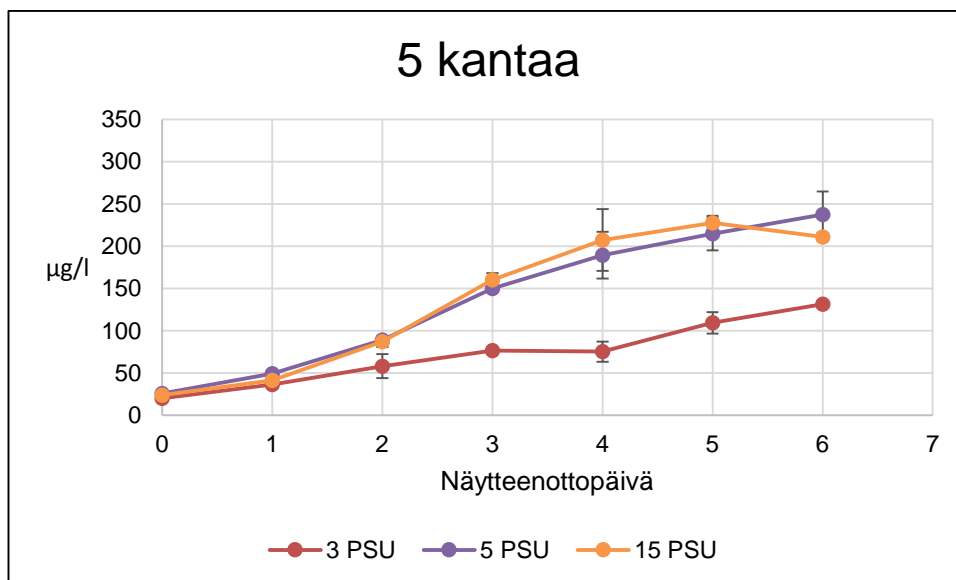
Koesarjan yhtä solukantaa sisältäneiden näytteiden klorofylli a pitoisuudet eri suolapitoisuuksissa on esitetty kaaviona kuvassa 9. Jokainen mittauspiste on kolmen rinnakkaisnäytteen keskiarvo. Keskihajonnat on laskettu mittauspistekohtaisesti. Kaikkien näytteenottopäivänä seitsemän otettujen näytteiden mittaukset epäonnistuivat niiden suuren solutiheyden takia, jonka vuoksi mittaustulokset eivät pysyneet luotettavalla mittausalueella.



Kuva 9. Yhtä kantaa sisältäneiden näytteiden klorofylli a:n määrät eri suolapitoisuuksissa

3 PSU:n suolapitoisuudessa kasvaneet näytteet tuottivat selkeästi vähemmän klorofylli a:ta. 5 PSU:n suolapitoisuudessa kasvaneet levät tuottivat hieman enemmän klorofylli a:ta kuin 15 PSU:n suolapitoisuudessa kasvaneet, paitsi eksponentiaalisen kasvun loppulla, näytteenottopäivänä viisi. Lisäksi näytteenottopäivänä viisi nähdään 3 PSU:n suolapitoisuudessa kasvaneiden levien kohdalla hyvin alhainen tulos, joka saattaa johtua virheestä näytteiden käsittelyssä tai mittausvaiheessa. Muuten tulokset ovat melko hyvin linjassa solulaskennasta saatujen tulosten kanssa.

Koesarjan viittä solukantaa sisältäneiden näytteiden eri suolapitoisuuksissa on esitetty kaaviona kuvassa 10. Jokainen mittauspiste on kolmen rinnakkaisnäytteen keskiarvo. Keskihajonnat on lasketty mittauspistekohtaisesti.

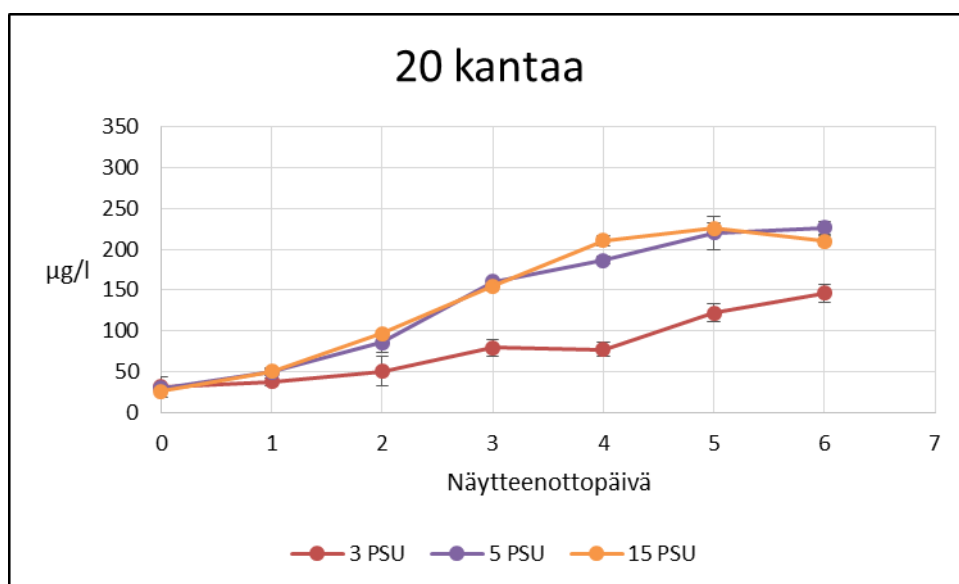


Kuva 10. Viittä kantaa sisältäneiden näytteiden klorofylli a:n määrät eri suolapitoisuuksissa.

Myös viittä kantaa sisältäneiden näytteiden kohdalla 3 PSU:n suolapitoisuudessa kasvaneet näytteet tuottivat selkeästi vähemmän klorofylli a:ta koko mittausjakson ajan. 15 PSU:n suolapitoisuudessa kasvaneiden levien klorofylli a:n tuotto näyttäisi kasvavan hie-man nopeammin mutta myös kääntyvän laskuun aikaisemmin, kuin 5 PSU:n suolapitoisuudessa kasvaneilla levillä.



Koesarjan 20 solukantaa sisältäneiden näytteiden klorofylli a pitoisuudet eri suolapitoisuuksissa on esitetty kaaviona kuvassa 11. Jokainen mittauspiste on kolmen rinnakkaisnäytteen keskiarvo. Keskihajonnat on lasketty mittauspistekohtaisesti.

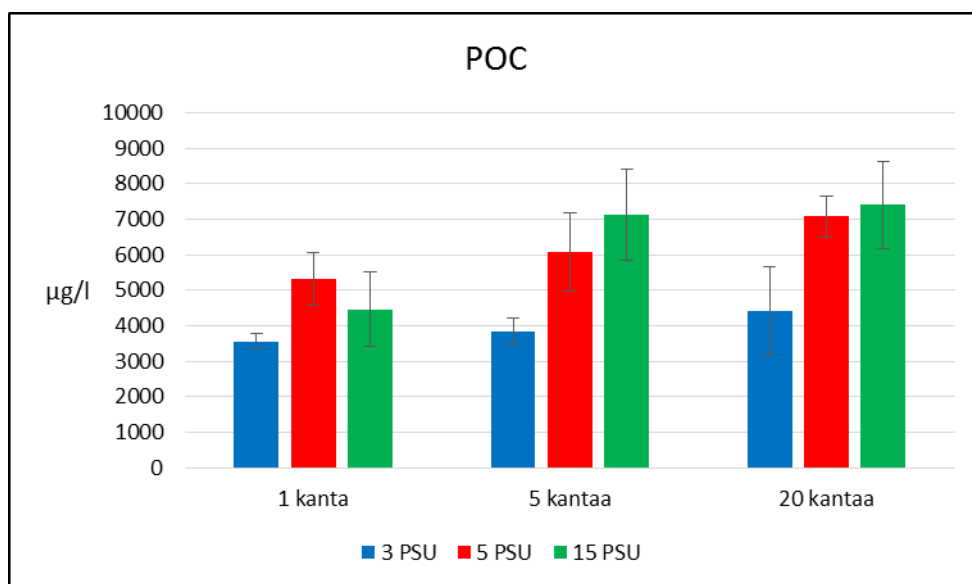


Kuva 11. 20 kantaa sisältäneiden näytteiden klorofylli a:n määrät eri suolapitoisuuksissa

Myös 20 kantaa sisältäneiden näytteiden kohdalla 3 PSU:n suolapitoisuudessa kasvatetut näytteet tuottivat selkeästi vähemmän klorofylli a:ta koko mittausjakson ajan. Myös 5 PSU:n ja 15 PSU:n suolapitoisuuksissa kasvatettujen näytteiden tulokset ovat samankaltaiset kuin viisi kantaa sisältäneillä näytteillä. Kaikkia klorofylli a mittaustuloksia vertailtaessa vain yhtä kantaa sisältäneiden, 5 PSU:n ja 15 PSU:n suolapitoisuuksissa kasvatettujen näytteiden klorofylli a pitoisuus näyttäisi olevan alussa hieman matalampi kuin useita kantoja sisältäneiden näytteiden pitoisuudet mutta tasoittui näytteenottopäivän viisi näytteiden kohdalla.

### 4.3 Ravinteet

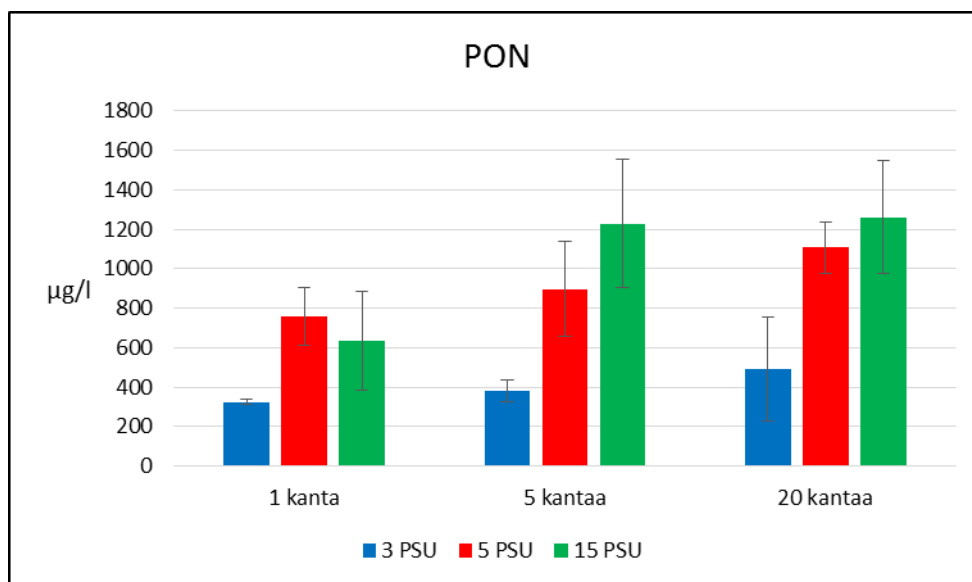
POC -mittaukset suoritettiin solujen eksponentiaalisen kasvuvaiheen lopulla, näytteenottopäivänä viisi. POC –pitoisuudet eriteltynä diversiteetin mukaan eri suolapitoisuuksissa on esitetty kaaviona kuvassa 12. Jokainen tulos on kolmen rinnakkaisnäytteen keskiarvo. Kuvaajien virhepylväät ovat näytekohtaisia keskihajontoja.



Kuva 12. POC – pitoisuudet eri suolapitoisuuksissa

POC – pitoisuudet ovat selkeästi pienemmät 3 PSU:n suolapitoisuudessa jokaisen näytteen kohdalla. Viisi ja 20 kanta sisältävissä näytteissä pitoisuudet ovat kuitenkin suurempia kaikissa suolapitoisuuksissa, joka mahdollisesti viittaa siihen että suuremman diversiteetin omaavat populaatiot menestyisivät paremmin kuin diversiteetiltään yksipuoliset populaatiot.

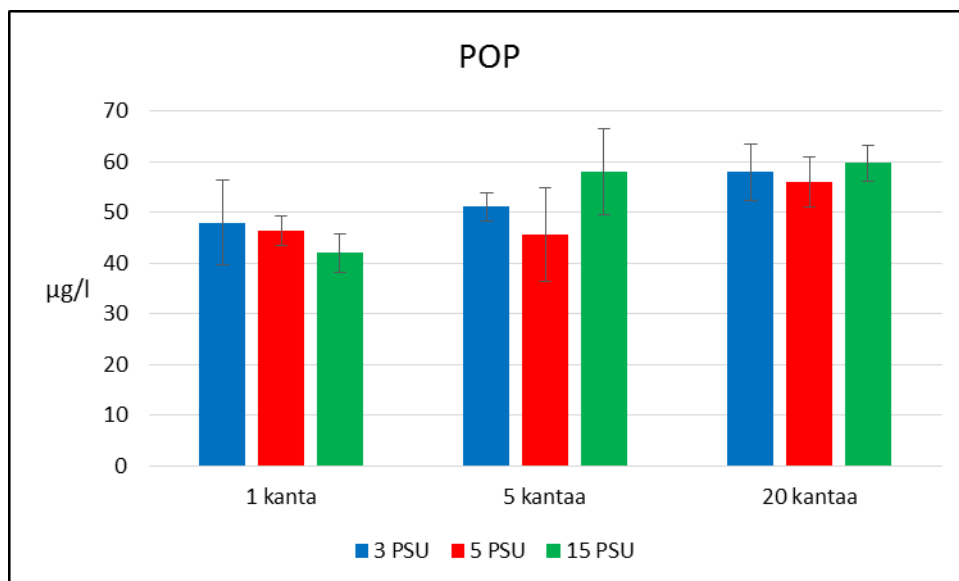
PON - mittaukset suoritettiin solujen eksponentiaalisen kasvuvaiheen lopulla, näytteenottopäivänä viisi. PON –pitoisuudet eriteltynä diversiteetin mukaan eri suolapitoisuuksissa on esitetty kaaviona kuvassa 13. Jokainen tulos on kolmen rinnakkaisnäytteen keskiarvo. Kuvaajien virhepylväät ovat näytekohtaisia keskihajontoja.



Kuva 13. PON – pitoisuudet eri suolapitoisuuksissa

PON – pitoisuuksien kohdalla tulokset ovat yhtenevät POC – pitoisuuksien kanssa. 3 PSU:n suolapitoisuudessa pitoisuudet ovat selkeästi pienemmät, joka selittyy ainakin solujen pienemmällä lukumäärillä näytteenottopäivänä viisi. Myös PON – näytteissä voi havaita suurempien diversiteettien positiivisen vaikutuksen populaatioihin.

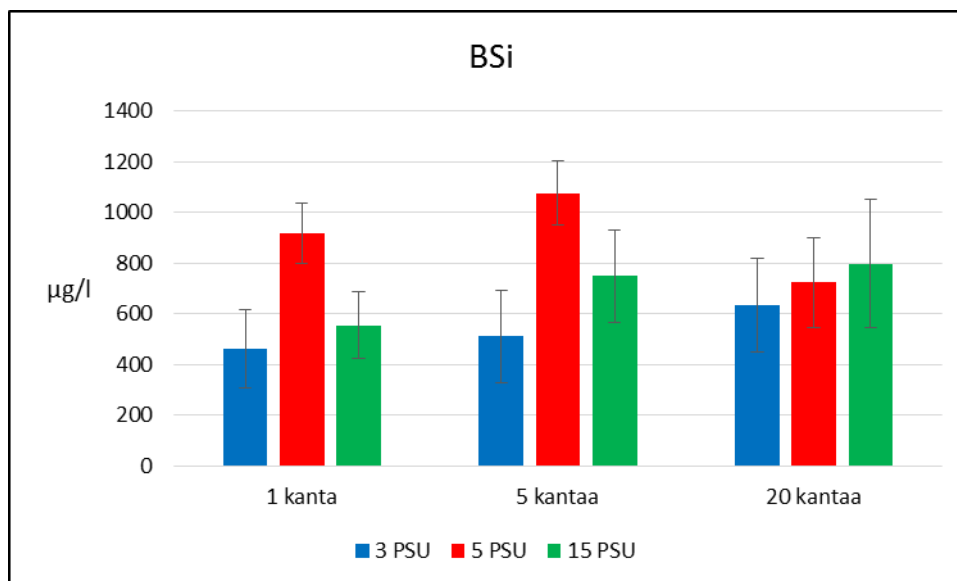
POP - mittaukset suoritettiin solujen eksponentiaalisen kasvuvaiheen lopulla, näytteenottopäivänä viisi. PON –pitoisuudet eriteltynä diversiteetin mukaan eri suolapitoisuuksissa on esitetty kaaviona kuvassa 14. Jokainen tulos on kolmen rinnakkaisnäytteen keskiarvo. Kuvaajien virhepylväät ovat näytekohtaisia keskihajontoja.



Kuva 14. POP – pitoisuudet eri suolapitoisuuksissa

POP – pitoisuuksien kohdalla ei ole nähtävissä kovin suuria eroavaisuuksia eri suolapitoisuuksien kohdalla. Populaation diversiteetillä näyttäisi kuitenkin olevan pieni positiivinen vaikutus POP – pitoisuuksiin, mutta selviä päätelmiä ei kuitenkaan voi tehdä tämän opinnäytetyön otannan perusteella.

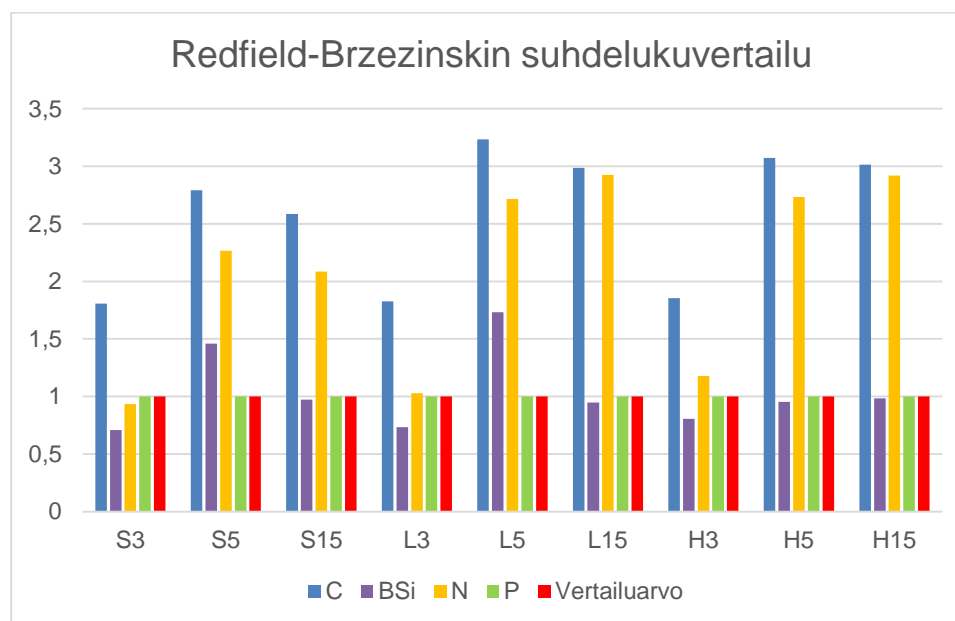
BSi - mittaukset suoritettiin solujen eksponentiaalisen kasvuvaiheen lopulla, näytteenotopäivänä viisi. BSi –pitoisuudet eriteltynä diversiteetin mukaan eri suolapitoisuuksissa on esitetty kaaviona kuvassa 15. Jokainen tulos on kolmen rinnakkaisnäytteen keskiarvo. Kuvaajien virhepylväät ovat näytekohtaisia keskihajontoja.



Kuva 15. BSi – pitoisuudet eri suolapitoisuuksissa

BSi – pitoisuudet ovat selkeästi korkeimmat 5 PSU suolapitoisuudessa näytteissä jotka sisälsivät yksi ja viisi kanta. 20 kanta sisältävien näytteiden kohdalla erot eivät ole yhtä suuria. Kaikkien näytteiden kohdalla kuitenkin matalimmat BSi pitoisuudet mitattiin 3 PSU:n suolapitoisuuksilla.

Ravinteiden atomaarisia suhteita vertailtiin Redfield-Brzezinskin suhdeluvun avulla (C : Si : N : P = 106 : 15 : 16 : 1). Ainemäärät laskettiin ravinnemittausten tulosten perusteella. Kaikki näytteen tulokset jaettiin POP-mittauksen tuloksella, jotta luvut olisivat verrattavissa Redfield-Brzezinskin suhdelukuun. Suhteet vielä normalisoitiin toisiinsa verrannollisiksi jakamalla jokainen mittaustulos Redfield-Brzezinskin suhdelukua vastaavan ravinteen luvulla. Toisinsanoen jokaisen ravinteen kohdalla Redfield-Brzezinskin suhdeluku saa arvon 1, joka on myös lisätty kuvaajaan vertailuarvona. Esimerkiksi jos jokin ravinne saa kuvaajalla arvon 2 niin siinä on kaksinkertainen määrä kyseistä ravinnetta kuin Redfield-Brzezinskin suhdeluvun mukaisesti pitäisi olla. Ravinnevertailu esitetty kuvaajana kuvassa 16.



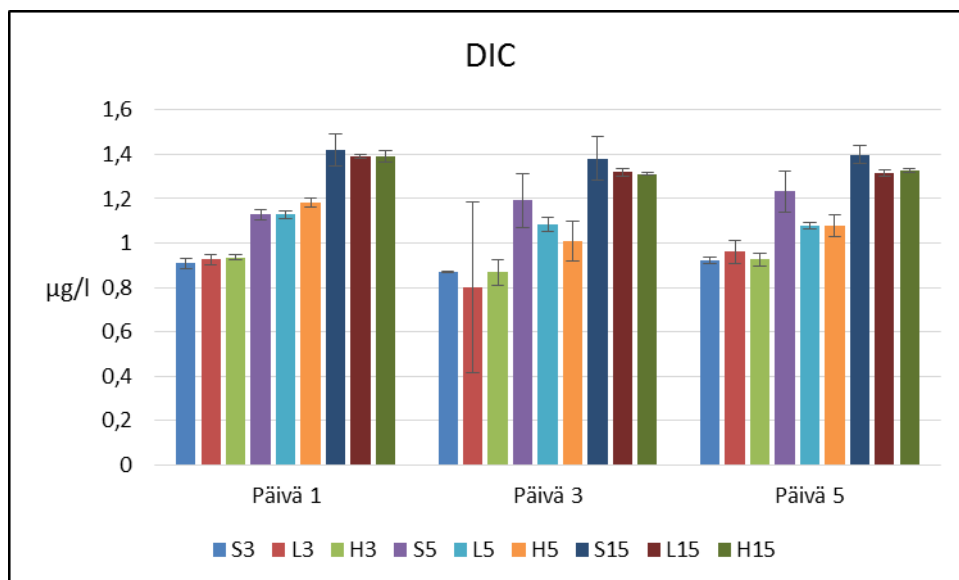
Kuva 16. Ravinnemittausten tulosten vertailu Redfield-Brzezinskin suhdeluvun avulla.

Hiilipitoisuudet ovat jokaisessa näytteessä korkeimmat kuin vertailuarvo. Kaikissa 3 PSU:n suolapitoisuuden näytteissä arvot ovat noin 1,75 kertaiset vertailuarvoon nähden. 5 PSU:n ja 15 PSU:n suolapitoisuuksien näytteiden pitoisuudet ovat 2,5 - 3,5 kertaiset. Myös typpipitoisuudet ovat samaa tasoa hiilipitoisuuksien kanssa, lukuunottamatta kaikkia 3 PSU:n näytteitä, joissa typpipitoisuudet ovat hyvin lähellä vertailuarvoa. Silikapitoisuudet ovat näytteissä S5 ja L5 noin 1,5 kertaiset. Kaikissa 3 PSU:n näytteissä taas silikapitoisuudet jäävät hieman alle vertailuarvon. Fosforipitoisuus on kaikkien näytteiden kohdalla luonnollisesti sama kuin vertailuarvo, koska fosforinäytteet toimivat yhteisenä jakajana muiden näytteiden pitoisuuksille.

#### 4.4 Perustuotanto

Perustuotantomittaukset suoritettiin koesarjan näytteenottopäivinä yksi, kolme ja viisi. DIC –mittausten tulokset järjestettynä näytteenottopäivän mukaan esitetty kuvaajana kuvassa 16. Näytteiden tunnuksissa kirjain ”S” tarkoittaa yhtä kantaa, ”L” viittä kantaa ja ”H” 20:tä kantaa sisältäviä näytteitä. Numero kirjaimen perässä tarkoittaa suolapitoisuutta, jossa näyte on kasvatettu. Esimerkiksi kuvaajassa vasemmalta ensimmäinen

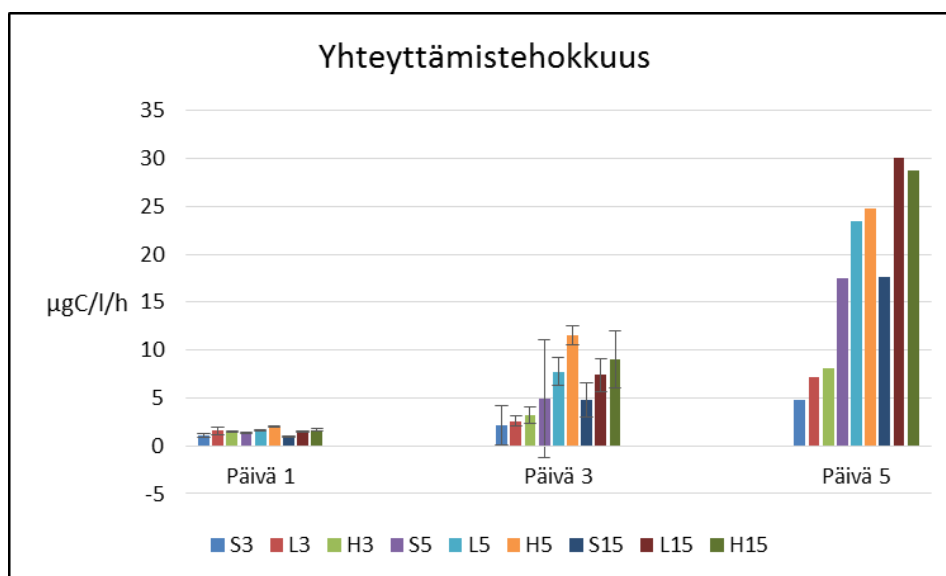
näyte "S3" sisältää yhden solukannan ja on kasvatettu 3 PSU:n suolapitoisuudessa. Jokainen tulos on kolmen rinnakkaisnäytteen keskiarvo. Kuvaajien virhepylväät ovat näytekohtaisia keskihajontoja.



Kuva 16. Kaikkien näytteiden DIC –pitoisuuden

DIC – pitoisuuksissa ei ole havaittavissa merkittäviä eroja eri näytteenottopäivien välillä. Eri suolapitoisuuksien välillä DIC – pitoisuudet ovat jokaisena näytteenottopäivänä alhaimmat 3 PSU:n suolapitoisuuden kasvatuksissa ja suurimmat 15 PSU:n suolapitoisuuden kasvatuksissa. Leväkasvatuksien diversiteetillä ei näyttäisi olevan merkitystä, paitsi S5 näytteen kohdalla johtuen mahdollisesti yksittäisen kannan ominaisuuksista, joiden vaikutukset tasoittuvat suuremmilla diversiteeteillä. DIC – pitoisuuksia tarvitaan laskettaessa solujen yhteyttämistehokkuutta.

$^{14}\text{C}$  ja DIC mittaustulosten pohjalta lasketut yhteyttämistehokkuudet esitetty kuvaajana kuvassa 17. Jokainen tulos on kolmen rinnakkaisnäytteen keskiarvo. Kuvaajien virhepylväät ovat näytekohtaisia keskihajontoja.



Kuva 17. Kaikkien näytteiden yhteyttämistehokkuudet.

Yhteyttämistehokkuuksissa erot eivät ensimmäisenä näytteenottopäivänä ole merkittäviä johtuen siitä että piilevien kasvu oli vielä viivevaiheessa. Näytteenottopäivänä kolme on jo havaittavissa kahdenlaisia eroja. Ensinnäkin tehokkuus on suurempi 5 PSU:n ja 15 PSU:n suolapitoisuuksilla verrattuna 3 PSU:n suolapitoisuuteen. Lisäksi näytepopulaatioiden diversiteetti näyttäisi kasvattavan tehokkuutta verrattuna vain yhtä kantaa sisältäviin näytteisiin. Suurin yhteyttämistehokkuus vaikuttaisi olevan 20 kantaa sisältävissä näytteissä.

Näytteenottopäivänä viisi erot yhteyttämistehokkuuksissa ovat selkeimmät. Havaittavissa on samanlaiset erot eri suolapitoisuuksien ja diversiteettien välillä kuin päivänä kolme, paitsi viisi ja 20 kantaa sisältävien näytteiden välillä ero ei ole kovin suuri. Vain yhtä kantaa sisältävien näytteiden alhaisempi tehokkuus verrattuna suurempien diversiteettien näytteisiin saattaisi selittyä tämän yhden kannan yksilöllisillä ominaisuuksilla. Näytteenottopäivänä viisi keskihajonnat olivat niin vähäisiä, että niitä ei kuvaajasta erota. Tämä saattaa kertoa levien yhteyttämistehokkuuden stabiloitumisesta eksponentiaalisen kasvuvaiheen lopulla ja myös mittausmenetelmien tarkkuudesta.



## 5 Yhteenveto

Työssä haluttiin selvittää elinympäristön suolapitoisuuden vaikutusta Itämeren *Skeletonema marinoi* -piilevälajin kasvuun ja perustuotantoon. Työssä käytetyillä mittausmenetelmillä onnistuttiin selkeästi osoittamaan että standardisuolapitoisuutena käytettyä 5 PSU:ta vain kaksi yksikköä alhaisempi 3 PSU:n suolapitoisuus vaikutti ainakin työssä tutkittuihin leväkantoihin kasvua, ravinteiden ottoa ja perustuotantoa alentavasti. Näytepopulaatioiden diversiteetillä ei havaittu selkeää vaikutusta tuloksiin.

Toinen rasisympäristö yritettiin luoda standardipitoisuutta suuremmalla 15 PSU:n suolapitoisuudella. Suolapitoisuuden nostamisella ei muuten tuntunut olevan selkeää vaikutusta leviin, paitsi yhteyttämistehokkuuden ja DIC –pitoisuuden kohdalla oli havaittavissa hieman suurempia tuloksia standardisuolapitoisuuden näytteisiin verrattuna. Tämä on melko yllättävä tulos, koska tarkoituksena oli luoda leville ympäristö jossa niiden ei oletettu viihtyvän kovin hyvin. Tarkempia syitä ilmiöön ei tässä opinnäytetyössä selvitetty. Mahdollisia selityksiä voisi olla lajin siirtyminen Itämereen jostakin Itämeren suolapitoisuudeltaan suuremmasta merestä, esimerkiksi Atlantilta tai voi myös olla mahdollista että suolapitoisuuden lisäämisellä ei yksinkertaisesti ole havaittavaa vaikutusta leviin mittauksia suoritettulla aikavälillä.

Populaatioiden diversiteetillä saattaisi olla vaikutusta, joka näkyy ainakin suurempana yhteyttämistehokkuutena vertailtaessa useaa kantaa ja vain yhtä kantaa sisältäneisiin näytteisiin. Eroavaisuudet yhteyttämistehokkuudessa voivat myös selittyä eri kantojen yksilöllisillä eroilla, joten tämän työn puitteissa merkittäviä johtopäätöksiä ei voi tehdä. Laboratoriossa kasvaneilla näytteillä on ollut kaikkia tarvittavia ravinteita riittävästi, joten kasvatusolosuhteet voivat osaltaan vaikuttaa suuriin hiili- ja typpipitoisuus -suhteisiin vertailtaessa tuloksia Redfield-Brzezinskin suhdeluvun avulla.

## Lähteet

1. Hildebrand, M.; Davis, A.; Smith, S.; Traller, J.; Abbriano, R. The place of diatoms in the biofuels industry. *Biofuels* [Verkkolehti]. 9.4.2014. Saatavissa <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.4155/bfs.11.157>. Luettu 15.5.2015.
2. University College London. 2002. Piilevät. Verkkodokumentti. <http://www.ucl.ac.uk/GeolSci/micropal/diatom.html>. Luettu 15.5.2015.
3. Stockholm University. Stockholm Resilience Center. 2013. Verkkodokumentti. [http://www.stockholmresilience.org/download/18.416c425f13e06f977b14a55/1381790136304/BalticS-TERN\\_State+of+the+Baltic+Sea.pdf](http://www.stockholmresilience.org/download/18.416c425f13e06f977b14a55/1381790136304/BalticS-TERN_State+of+the+Baltic+Sea.pdf). Luettu 19.4.2015.
4. Suomen ympäristökeskus. Itämeri – ympäristö ja ekologia. 2014. Verkkojulkaisu. [http://www.syke.fi/fi-FI/Julkaisut/Esitteet/Itameri\\_\\_ymparisto\\_ja\\_ekologia\\_tietopakke%2828801%29](http://www.syke.fi/fi-FI/Julkaisut/Esitteet/Itameri__ymparisto_ja_ekologia_tietopakke%2828801%29). Luettu 12.5.2015
5. Ilmatieteen laitos. Suolapulssit. Verkkojulkaisu. <http://ilmatieteenlaitos.fi/suolapulssit>. Luettu 12.5.2015.
6. Stockholm University, Department of Ecology, Environment and Plant Sciences. Baltic Sea Weed Blog. 2013. Kuva Itämeren alueellisista suolapitoisuuksista. <http://balticseaweed.com/2013/01/24/the-baltic-sea/>. Kuva haettu 10.4.2015.
7. Luontoportti. Piilevät. 2015. Verkkojulkaisu. <http://www.luontoportti.com/suomi/fi/itameri/piilevat>. Luettu 23.4.2015.

8. Microbial Life Educational Resources. POC/DOC. 2012. Verkkojulkaisu. [http://serc.carleton.edu/microbelife/research\\_methods/biogeochemical/organic\\_carbon.html](http://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/biogeochemical/organic_carbon.html). Luettu. 24.4.2015.
9. Mischke, C. 2012. Aquaculture Pond Fertilization: Impacts of Nutrient Input on Production. Wiley-Blackwell Publishing.
10. Ahmad, N. 1996. Nitrogen Economy in Tropical Soils. Kluwer Academic Publishers.
11. Jaarinen, S.; Niiranen, J. 2008. Laboratorion analyysitekniikka. Edita Publishing OY, Helsinki.
12. Tree of Life Project. Diatoms. 2004. Verkkojulkaisu. <http://tolweb.org/Diatoms/21810>. Luettu 25.4.2015.
13. Microbial Life Educational Resources. Perustuotanto. 2012. Verkkojulkaisu. [http://serc.carleton.edu/microbelife/research\\_methods/biogeochemical/productivity.html](http://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/biogeochemical/productivity.html) Luettu. 27.4.2015.
14. Salonen, K. 1979. A versatile method for the rapid and accurate determination of carbon by high temperature combustion. Verkkojulkaisu. [http://www.aslo.org/lo/toc/vol\\_24/issue\\_1/0177.pdf](http://www.aslo.org/lo/toc/vol_24/issue_1/0177.pdf). Luettu 10.4.2015
15. Pyser-SGI. 2015. Kuva Sedgewick-Rafter laskentakammista. <http://www.pyser-sgi.com/images/added/pdf/Graticules/Sedgewick-Rafter.pdf>. Kuva haettu 10.4.2015
16. Jäntschi, L.; Bolboaca, S.; Balan, M.; R, Sestras. 2011. Chlorophylls - natural solar cells. Verkkojulkaisu. <http://arxiv.org/ftp/arxiv/papers/1107/1107.5880.pdf>. Luettu 15.5.2015.
17. Helsingin yliopisto, Bio- ja ympäristötieteellinen tiedekunta, Tvärminnen eläintieteellinen asema. 2015. Tvärminnen eläintieteellisen aseman laboratoriopalvelut. Verkkosivu. <http://luoto.tvarminne.helsinki.fi/laboratorio/laboratorio.html>. Sivulla käyty 15.5.2015.

**F/2 kasvatusliuos****f/2 Medium** (Guillard and Ryther 1962, Guillard 1975)

Component	Molar Concentration in Final Medium
NaNO <sub>3</sub>	8.82 x 10 <sup>-4</sup> M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	3.62 x 10 <sup>-5</sup> M
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> 9H <sub>2</sub> O	1.06 x 10 <sup>-4</sup> M
trace metal solution	---
vitamin solution	---

**f/2 Trace Metal Solution**

Component	Molar Concentration in Final Medium
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	1.17 x 10 <sup>-5</sup> M
Na <sub>2</sub> EDTA 2H <sub>2</sub> O	1.17 x 10 <sup>-5</sup> M
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	3.93 x 10 <sup>-8</sup> M
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	2.60 x 10 <sup>-8</sup> M
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	7.65 x 10 <sup>-8</sup> M
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	4.20 x 10 <sup>-8</sup> M
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	9.10 x 10 <sup>-7</sup> M

**f/2 Vitamin Solution**

Component	Molar Concentration in Final Medium
thiamine HCl (vit. B <sub>1</sub> )	2.96 x 10 <sup>-7</sup> M
biotin (vit. H)	2.05 x 10 <sup>-9</sup> M
cyanocobalamin (vit. B <sub>12</sub> )	3.69 x 10 <sup>-10</sup> M

Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. pp 26-60. In Smith W.L. and Chanley M.H (Eds.) *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York, USA.

Guillard, R.R.L. and Ryther, J.H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can. J. Microbiol.* **8**: 229-239.