



Betydelsen av genetisk diversitet hos
marina kiselalgen *Skeletonema marinoi*
under och efter antibiotikastress

Janni Heikkinen
Pro gradu-avhandling i miljö- och marinbiologi, 30 sp
Handledare: Conny Sjöqvist
Fakulteten för naturvetenskaper och teknik
Åbo Akademi
Våren 2021

Åbo Akademi

Fakulteten för naturvetenskaper och teknik
Miljö- och marinbiologi
Heikkinen, Janni 2021

Betydelsen av genetisk diversitet hos marina kiselalgen *Skeletonema marinoi* under och efter antibiotikastress

Pro gradu-avhandling, 63 s. (+ bilagor)

ABSTRAKT

Växtplankton har många viktiga funktioner för både marina ekosystem och det globala klimatet. De spelar en viktig roll i globala biogeokemiska cykler, och de är grunden för näringsväven i marina ekosystem. Specifikt kiselalger dominerar den produktiva vårbloomingen i Östersjön. Både abrupta störningar och långsiktiga förändringar kan utsätta växtplankton för direkt och indirekt stress, vilket kan ha konsekvenser för hela ekosystemet. Därför är det viktigt att utreda vilka faktorer som påverkar växtplanktons tillväxt under och efter exponering till olika stressfaktorer. Tidigare studier tyder på att genetisk diversitet hos växtplankton buffrar de negativa effekterna orsakade av bland annat nedsatt salinitet, förhöjd temperatur och betning. Betydelsen av den genetiska diversiteten har dock inte undersökts under stress orsakat av att bakteriesamhället associerat med växtplankton rubbas. Forskning tyder på att växtplankton, speciellt kiselalger har unika bakteriesamhällen associerat med dem. Det finns tecken på att det associerade bakteriesamhället hos flera kiselalger är fördelaktiga, eller till och med livsviktiga för kiselalgernas tillväxt. För att undersöka rollen av det associerade bakteriesamhället och den genetiska diversiteten hos växtplankton, utfördes laboratorieexperiment. Som modellorganism användes kiselalgen *Skeletonema marinoi* som dominerar vårbloomingen i Östersjön. För att undersöka betydelsen av det associerade bakteriesamhället hos *S. marinoi*, användes två stressbehandlingar bestående av en kombination av antibiotika. För att undersöka rollen av den genetiska diversiteten under, efter och utan antibiotikastress, jämfördes responsen av kulturer med och utan genetisk diversitet. Samtidigt undersöktes ifall de olika genotyperna hade fenotypiska skillnader i de mätta tillväxtparametrarna. En tillsättning av antibiotika hade en stark negativ effekt på tillväxten av *S. marinoi*. Genetiskt diversa kulturer återhämtade sig betydligt bättre från antibiotikastress i jämförelse med kulturer bestående av endast en genotyp. Genotyperna påvisade även fenotypiska skillnader i en del av de mätta tillväxtparametrarna i enlighet med tidigare studier. De erhållna resultaten understryker betydelsen av den genetiska diversiteten hos växtplankton vid olika stressfaktorer. Resultaten visar också att det krävs fler studier som undersöker betydelsen av interaktioner mellan växtplankton och andra mikroorganismer i marina habitat. Forskning kring ämnet är grundläggande för att förutspå responsen av växtplanktonssamhällen i Östersjön till miljöförändringarna som klimatförändringen kommer att orsaka.

Nyckelord: växtplankton, genetisk diversitet, associerat bakteriesamhälle, fykosfär, *Skeletonema marinoi*, stress, antibiotika, Östersjön

Åbo Akademi University

Faculty of Science and Engineering
Environmental and Marine Biology
Heikkinen, Janni 2021

The importance of genetic diversity in the marine diatom *Skeletonema marinoi* during and after antibiotic stress

Master's thesis, 63 pp. (+ appendices)

ABSTRACT

Phytoplankton have many important functions for both marine ecosystems and the global climate. Phytoplankton play a big role in global biogeochemical cycles and are the foundation of marine food webs. Moreover, diatoms dominate the productive spring bloom in the Baltic Sea. Both abrupt disturbances and long-term changes can subject phytoplankton to direct and indirect stress, which may lead to consequences for the entire ecosystem. Therefore, it is vital to investigate which factors affect phytoplankton growth during and after different stress factors. Previous studies suggest that genetic diversity in phytoplankton buffers against negative effects from stressors, such as reduced salinity, elevated temperatures, and grazing. However, the importance of genetic diversity has not been investigated during stress caused by a disruption of the bacterial community associated with phytoplankton. Studies suggest that phytoplankton, especially diatoms, harbor unique bacterial communities. There are indications of the bacterial communities associated with several diatoms being beneficial or even crucial for the diatom growth. Laboratory experiments were conducted to investigate the role of the associated bacterial community and genetic diversity in phytoplankton. The diatom *Skeletonema marinoi*, which dominates the spring bloom in the Baltic Sea, was used as a model organism. To study the importance of the bacterial community associated with *S. marinoi*, two stress treatments consisting of a combination of antibiotics were used. To investigate the role of genetic diversity during, after and without antibiotic stress, the response of cultures with and without genetic diversity were compared. Whether or not the different genotypes possessed phenotypic differences in the measured growth parameters was also investigated. The addition of antibiotics resulted in a strong negative effect on the growth of *S. marinoi*. Genetically diverse cultures showed significantly better recovery from antibiotic stress compared to cultures consisting of only one genotype. The different genotypes also showed phenotypic differences in some of the measured growth parameters in accordance with previous studies. The results obtained in this study emphasize the importance of genetic diversity in phytoplankton during different stressors. The results also highlight the need for more studies investigating the importance of interactions between phytoplankton and other microorganisms in marine habitats. Research of this subject is fundamental to predicting the response of phytoplankton communities in the Baltic Sea to the environmental changes that occur in conjunction with climate change.

Key words: phytoplankton, genetic diversity, associated bacterial community, phycosphere, *Skeletonema marinoi*, stress, antibiotics, The Baltic Sea

Innehållsförteckning

1 Introduktion	1
1.1 Genetisk diversitet hos växtplankton	2
1.2 Interaktioner mellan växtplankton och bakterier	3
1.3 <i>Skeletonema marinoi</i> i Östersjön	6
1.4 Målsättningar och frågeställningar.....	9
2 Material och metoder	10
2.1 Förberedelser och experiment.....	11
2.1.1 Grundande av klonala stammar	11
2.1.2 Antibiotika.....	15
2.1.3 Bestämning av antibiotikabehandlingarna med pilottest	16
2.1.4 Kulturernas förberedelse innan experiment.....	18
2.1.5 Experimentupplägg.....	20
2.2 Provtagning och provanalys.....	22
2.2.1 Biomassa	23
2.2.2 Klorofyll <i>a</i>	26
2.3 Statistiska analyser.....	26
3 Resultat	27
3.1 Biomassa.....	27
3.2 Tillväxthastighet	30
3.3 Klorofyll <i>a</i>	36
3.4 Pilottest	41
4 Diskussion	43
4.1 Effekten av antibiotika på tillväxt hos <i>S. marinoi</i>	43
4.1.1 Antibiotikas negativa effekt - direkt eller indirekt?.....	44
4.2 Betydelsen av genetisk diversitet.....	46
4.2.1 Under och efter stress	46
4.2.2 Utan stress	48
4.3 Skillnader mellan olika genotyper	50
4.4 Utvecklingsförslag och metodernas begränsningar.....	52
4.4.1 Genetisk diversitet	52
4.4.2 Semikontinuerlig tillväxt	53
4.4.3 Rollen av det associerade bakteriesamhället	54
4.4.4 Data och dataanalys.....	55
5 Slutsatser	58
6 Tillkännagivande	59
7 Referenser	60
8 Bilagor	64

1 Introduktion

Växtplankton är encelliga, mikroskopiskt små autotrofa organismer. Den funktionella gruppen omfattar bland annat grönalger, cyanobakterier, flagellater och kiselalger. Växtplankton är grunden för näringsväven i akvatiska ekosystem (Kyewalyanga, 2016), och bidrar med omkring hälften av nettoprimärproduktionen globalt (Field *et al.*, 1998). Växtplankton utgör endast 1–2 % av det totala kolet bundet i växtbiomassa på jorden (Falkowski, 1994), men står ändå för nästan hälften av den globala syreproduktionen (Treguer och Pondaven, 2000) och ungefär 40 % av den årliga fixeringen av kol (Falkowski, 1994). Växtplankton har med andra ord flera viktiga funktioner för både klimatet och akvatiska ekosystem. Både kortvariga abrupta störningar, och långvariga förändringar orsakade av klimatförändringen kan utsätta växtplankton för stress och påverka deras funktion. Klimatförändringen kommer att ha negativa effekter på marina ekosystem globalt, men speciellt Östersjön som ett isolerat hav med tung antropogen belastning har förutspåtts vara extra sårbar (HELCOM, 2013). I Östersjön kommer klimatförändringen att orsaka förhöjda luft- och vattentemperaturer, samt en ökad nederbörd. Dessa förändringar kommer att dessutom leda till bland annat temporal och spatial minskning av isens täckgrad, nedsatt salinitet och ökad eutrofiering i Östersjön (HELCOM, 2013). Dessa förändringar kunde potentiellt ha både direkta och indirekta effekter på växtplanktonbeståndet i Östersjön, vilket oundvikligen skulle innebära konsekvenser för hela ekosystemet. Därför är det viktigt att utreda vilka faktorer som potentiellt har en inverkan på olika växtplanktons fortlevnad, samt vilka faktorer som påverkar deras respons vid olika typer av stress.

Växtplankton utövar många slags interaktioner med andra marina mikroorganismer (Seymour *et al.*, 2017), och därmed kan en störning av dessa ha en indirekt påverkan på växtplankton. Interaktioner som är fördelaktiga för båda parterna är vanligt förekommande speciellt mellan växtplankton och bakterier i marina habitat (Seymour *et al.*, 2017). En störning av bakteriesamhället i Östersjön kunde alltså indirekt utsätta växtplankton för stress, påverka deras funktion, och således påverka hela ekosystemet. Det är många faktorer som påverkar organismers och ekosystemens respons vid stress,

och många studier har fokuserat på biodiversitetens roll. Allt fler studier visar att en minskning av biodiversitet i marina ekosystem leder till nedsatt återhämtningsförmåga, stabilitet och vattenkvalitet i ekosystemen (Worm *et al.*, 2006). Hos sjögräs har det dessutom påvisats att genetisk diversitet buffrar mot abrupta störningar, och att genetisk diversitet hos en art kan ersätta artmångfaldens funktion i artfattiga ekosystem (Reusch *et al.*, 2005). Ofta ligger fokus i studierna dock på habitat- eller artmångfald, och den genetiska diversitetens roll är ofta förbisedd, speciellt hos mikroorganismer.

Under de senaste åren har det allmänna intresset för genetisk diversitet hos växtplankton ökat, men studier som undersökt rollen av den genetiska diversiteten hos växtplankton är ännu få. Studierna som har undersökt betydelsen av den genetiska diversiteten hos växtplankton har studerat betydelsen under endast en handfull olika scenarier. Ett av scenarierna som dock inte har studerats än är: vad är betydelsen av den genetiska diversiteten hos växtplankton då bakteriesamhället associerat med växtplanktonen rubbas? Detta är en av kunskapsluckorna som försöker fyllas i denna avhandling.

1.1 Genetisk diversitet hos växtplankton

Genetisk diversitet innebär att individer av samma art skiljer sig genetisk från varandra; att det förekommer intraspecifik variation. Olika genotyper kan ha särskilda egenskaper eller karakteristiska drag, vilket innebär fenotypisk variation hos arten. Genetisk diversitet är en förutsättning för anpassning till olika selektionstryck, och därmed kan graden av genetisk diversitet ha en avgörande roll för en arts överlevnad vid naturliga och antropogena störningar (Allendorf, Hohenlohe och Luikart, 2010). Genetisk diversitet är speciellt viktig för ekosystem med fluktuerande miljöförhållanden (Laikre *et al.*, 2016), och för ekosystem med låg artmångfald (Reusch *et al.*, 2005; Cook-Patton *et al.*, 2011). Miljöförhållandena i Östersjön fluktuerar i hög grad, eftersom brackvattensystemet har både horisontella och vertikala gradienter av bland annat salinitet, temperatur och näringsämnen (Leppäkoski, Olenin och Gollasch, 2002). Östersjön har dessutom naturligt låg biodiversitet (Johannesson

och André, 2006). Således är det mycket välmotiverat att studera och bevara genetisk diversitet hos arter i Östersjön (Laikre *et al.*, 2016).

Den genetiska diversiteten och dess roll är välutforskat hos många marina organismer så som sjögräs (Reusch *et al.*, 2005; Salo, Reusch och Boström, 2015) och evertebrater (Gamfeldt och Källström, 2007), men få studier har fokuserat på mikroorganismer. Studier som har fokuserat på mikroorganismer har bevisat att genetisk diversitet förekommer hos gruppen i åtminstone marina habitat; både hos växt- (Iglesias-Rodriguez *et al.*, 2006; Alpermann *et al.*, 2010; Sjöqvist *et al.*, 2015; Kremp *et al.*, 2016; Sassenhagen *et al.*, 2021) och bakterieplankton (Sjöqvist *et al.*, 2021). Till exempel kiselalgen *Skeletonema marinoi* i Östersjön påvisar exceptionellt hög genetisk diversitet (Sassenhagen *et al.*, 2021). *S. marinoi*-individer i olika delar av Östersjön är genetisk olika, och Östersjöns population skiljer sig genetiskt från den i Nordsjön (Sjöqvist *et al.*, 2015). Forskning tyder på att olika genotyper hos flera växtplankton har även fenotypiska skillnader (Roger, Godhe och Gamfeldt, 2012; Sjöqvist *et al.*, 2014; Sjöqvist och Kremp, 2016; Wolf *et al.*, 2019).

Förekomsten av genetisk diversitet hos flera växtplankton väcker frågan om dess roll. Buffrar genetisk diversitet hos växtplankton den negativa effekten av externa störningar så som hos sjögräs (Reusch *et al.*, 2005)? I en del studier har man försökt besvara frågan genom att jämföra responsen av kulturer med och utan genetisk diversitet vid exponering för stress (Roger, Godhe och Gamfeldt, 2012; John *et al.*, 2015; Sjöqvist och Kremp, 2016; Wolf *et al.*, 2019). Mer studier krävs eftersom resultaten inte är entydiga, och endast ett fåtal stressfaktorer är undersökta.

1.2 Interaktioner mellan växtplankton och bakterier

Interaktioner som sker mellan terrestriska växter och bakterier i den så kallade rhizosfären (Jones *et al.*, 2007) är bekanta för många, men interaktioner mellan växtplankton och bakterier i akvatiska habitat är inte lika omtalade. Växtplankton i vattenkolumnen utsöndrar olika organiska substrat som attraherar en del bakterier

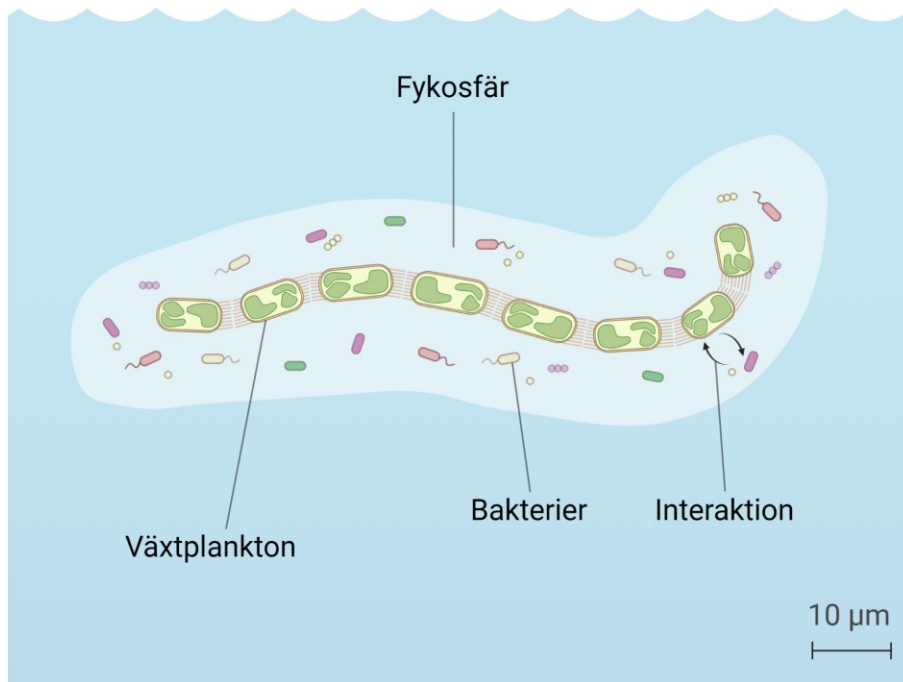
(Seymour *et al.*, 2017). Runt växtplanktonceller bildas på detta sätt ett mikrohabitat för bakterier som kallas fykosfären (eng. phycosphere) (Figur 1) (Bell och Mitchell, 1972). I fykosfären har bakterier många olika slags interaktioner med växtplankton; interaktioner förekommer i form av bland annat mutualism, kommensalism, antagonism, parasitism och konkurrens (Amin, Parker och Armbrust, 2012; Seymour *et al.*, 2017). En av de mest framträdande interaktionerna är sådana som är fördelaktiga för båda parterna (Seymour *et al.*, 2017), vilket har kunnat bevisats med experimentella studier (Jauffrais *et al.*, 2017).

Forskning tyder på att bakteriesammansättningen i kiselalgers fykosfär skiljer sig från bakteriesammansättningen i resten av vattenkolumnen (Grossart *et al.*, 2005), och att bakteriesammansättningarna är olika mellan olika kiselalger (Schäfer *et al.*, 2002; Grossart *et al.*, 2005; Behringer *et al.*, 2018). Det finns dock också bevis för att bakteriesammansättningen mellan olika arter av växtplankton inom samma släkte har likartad bakteriesammansättning (Ajani *et al.*, 2018). Att olika växtplankton har unika sammansättningar av bakterier associerat med dem, stöds bland annat av en studie var en förändring av växtplanktonsammansättningen (från små växtflagellater till kiselalger) ledde till förändringar även i sammansättningen av bakterier (Pinhassi *et al.*, 2004). Interaktionerna mellan kiselalger och bakterier associerade med dem har bevisats vara robusta av Behringer *et al.* (2018), som i sin studie med två kiselalger visade att endast små förändringar skedde i algernas unika bakteriesammansättningar under ett år i laboratorieförhållanden. Alla dessa observationer indikerar att det förekommer specifika interaktioner mellan specifika arter eller specifika släkten, som inte är slumpmässiga. Förutom att bakteriesammansättningen varierar mellan olika växtplankton, har det bevisats att bakteriesammansättningen kan naturligt variera även mellan olika tillväxtfaser hos en och samma kiselalg (observerat hos *Skeletonema marinoi (costatum)*, *Thalassiosira rotula* och *Skeletonema dohrnii*) (Grossart *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2021). Dessutom finns det bevis för att bakteriesammansättningen hos en och samma art kan variera både spatialt och temporalt i marina miljöer (Ajani *et al.*, 2018).

Det finns flera möjliga förklaringar till varför bakterier är associerade med växtplankton. Det har varit känt sedan länge att B₁₂ som produceras av många bakterier korrelerar med växtplanktons tillväxt (Haines & Guillard 1974). Många

växtplankton är beroende av B₁ och B₇ (Tang, Koch och Gobler, 2010), men precis som med B₁₂ kan algerna inte producera dessa själv, utan är beroende av externa källor. En del marina bakterier producerar också organiska föreningar som har visat sig underlätta växtplanktons upptagning av järn (Amin *et al.*, 2009). Bakterier antas i gengäld dra fördel av bland annat organiskt kol (Fouilland *et al.*, 2014) och specifika polysackarider (Piontek *et al.*, 2011) som växtplankton utsöndrar. Det är dock oklart varför specifika bakterier är associerad med specifika växtplankton. Dessutom är det oklart vad den konkreta betydelsen av det associerade bakteriesamhället är hos flera växtplankton beträffande till exempel olika tillväxtparametrar. En del studier har redan bevisat att vissa bakterier främjar tillväxten hos vissa grön- (Chevanton *et al.*, 2013), och kiselalger (Jauffrais *et al.*, 2017; Behringer *et al.*, 2018; Johansson *et al.*, 2019).

Bakterier kan rubbas av externa faktorer som växtplankton inte direkt påverkas av, så som antibiotikautsläpp från avlopp och fiskodlingar. Bakterier kunde också ha en annan respons till en del externa störningar än växtplankton. Således är det mycket viktigt att utreda betydelsen av det associerade bakteriesamhället för växtplankton med viktig funktion, speciellt i sårbara ekosystem så som Östersjön. Studier som undersökt betydelsen av det associerade bakteriesamhället hos enskilda arter är få, och antalet studier som har inkluderat arter med relevans för Östersjön är ännu färre.



Figur 1. Fykosfären är ett bakteriekoloniserat område tätt intill växtplankton, var det sker interaktioner mellan växtplankton och olika bakterier.

1.3 *Skeletonema marinoi* i Östersjön

Kiselalger är en grupp mikroalger som utgör en stor del av växtplanktonbeståndet i de tempererade områdenas hav. I Östersjön förekommer kiselalger i stora mängder under våren, då de tillsammans med dinoflagellater dominerar den årliga vårbloomingen av växtplankton (Wasmund och Uhlig, 2003). Kraftiga vindar under vintern orsakar uppvällning av näringsämnen från havsbotten, och tillsammans med en ökad mängd solljus utlöses en bloming av växtplankton på våren (Neumann *et al.*, 2012). Vårbloomingen är en av de mest produktiva tidsperioderna på året i Östersjön, eftersom omkring 50 % av den årliga fixeringen av kol sker under ungefär en månad (Lignell *et al.*, 1993; Heiskanen, 1998). Vårbloomingen spelar alltså en central roll för hela Östersjön genom att stå för en stor del av den årliga energiproduktionen som högre trofiska nivåer är beroende av. En av arterna som dominerar vårbloomingen i Östersjöns är kiselalgen *Skeletonema marinoi* (Figur 2), som kan på vissa ställen stå för upp till 60 % av primärproduktionen (Jochem, 1989).

Skeletonema-släktet består av ett flertal arter som förekommer jorden runt i både tempererade och tropiska områden (Kooistra *et al.*, 2008). I södra Östersjön vid danska sunden kan man påträffa flera arter av *Skeletonema*, men i resten av Östersjön påträffas främst *S. marinoi* (Kooistra *et al.*, 2008). Trots att *S. marinoi* är en marin art (Kooistra *et al.*, 2008), har arten anpassat sig till hela den nord-sydliga salinitetsgradienten i Östersjön (Sjöqvist *et al.*, 2015). Artens goda anpassning till de fluktuerande salinitetsförhållandena kunde förknippas med att arten påvisar exceptionellt hög genetisk diversitet i Östersjön; mycket högre än många andra växtplankton (Sassenhagen *et al.*, 2021). Tidigare forskning tyder på att det finns åtminstone hundratals olika genotyper av *S. marinoi* längs hela Östersjön (Sjöqvist *et al.*, 2015), men en nyare studie har med hjälp av modellering uppskattat att populationen i Östersjön kan ha närmare 200 000 olika genotyper (Sassenhagen *et al.*, 2021). Olika genotyper av *S. marinoi* har även påvisats ha fenotypiska skillnader (Roger, Godhe och Gamfeldt, 2012; Sjöqvist *et al.*, 2014; Sjöqvist och Kremp, 2016).

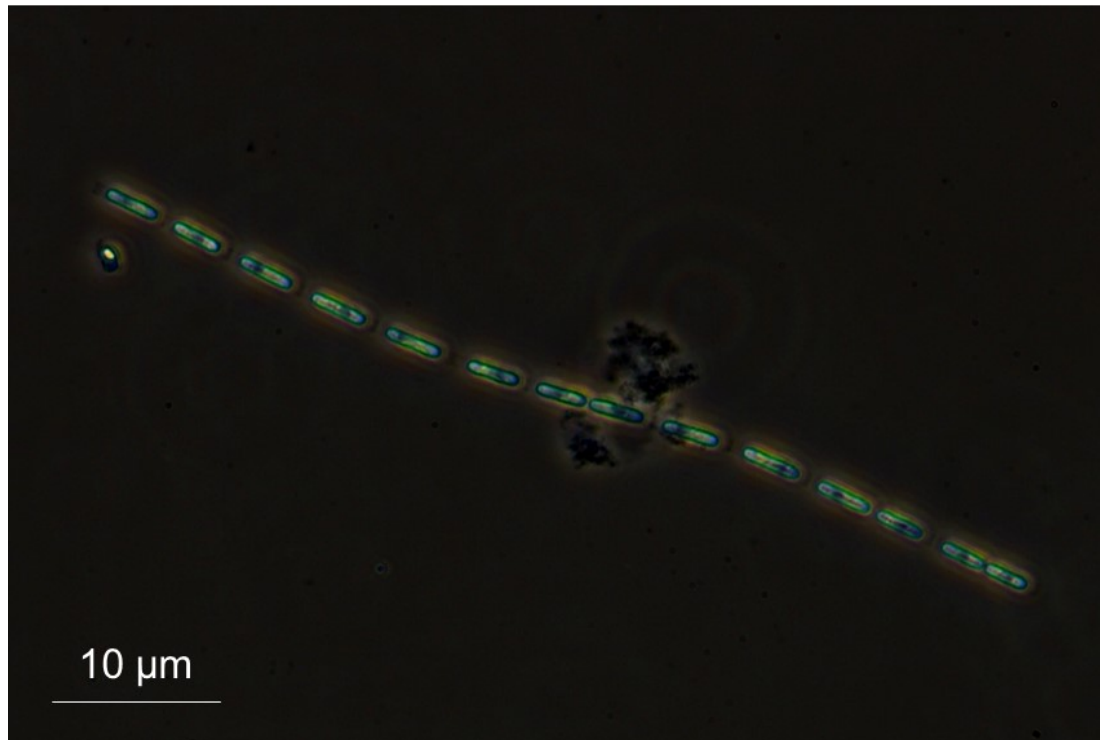
Då förhållandena är ogynnsamma, bildar *S. marinoi* så som många andra kiselalger i tempererade områden vilostadier. Dessa vilostadier sjunker ner till havsbotten, vilka kan förvaras i sediment i flera årtionden (Härnström *et al.*, 2011). I och med att *S. marinoi* har hög diversitet i Östersjön (Sjöqvist *et al.*, 2015; Sassenhagen *et al.*, 2021), fungerar sediment med vilostadier som en slags genbank. Uppväckta vilostadier kan användas för att grunda kulturer (Figur 4) av *S. marinoi*. Genom att grunda kulturer från enskilda individer bildar man med mycket hög sannolikhet stammar som är genetiskt olika. Detta beror på att det är mycket osannolikt att påträffa två genetiskt identiska individer av *S. marinoi* i Östersjön (Godhe och Härnström, 2010; Sassenhagen *et al.*, 2021).

Precis så som många andra växtplankton och kiselalger, tyder forskning på att även *S. marinoi* har ett associerat bakteriesamhälle (Grossart *et al.*, 2005; Johansson *et al.*, 2019). Det har visat sig vara mycket svårt att bilda axeniska kulturer av *S. marinoi* (Johansson *et al.*, 2019), alltså kulturer med endast algen utan kontamination av bakterier. Eftersom bakterierna associerade med *S. marinoi* är av marint ursprung, är det sannolikt att bakterierna följer med algerna då algkulturerna grundas, trots användning av sterilt tillväxtmedium. Försök att fullständigt avlägsna det associerade bakteriesamhället med antibiotika har uppgetts antingen leda till att kulturerna dör

(Johansson *et al.*, 2019), eller att det fortfarande finns åtminstone lite bakterieförekomst (Grossart *et al.*, 2005).

Grossart *et al.* (2005) bevisade att bakteriesamhället associerat med *S. marinoi* skiljde sig från bakteriesamhället hos en annan kiselalg, och Johansson *et al.* (2019) bevisade att en tillsättning av en vissa bakterier isolerade ur *S. marinoi* kulturer hade en tillväxtfrämjande effekt. Notera att Grossart *et al.* (2005) använder namnet *S. costatum* i sin studie, men nyare forskning (Kooistra *et al.*, 2008) har visat att *S. costatum* som tidigare antogs vara endast en art, kan i verkligheten delas in i flera arter. *S. marinoi* är arten som påträffas i Nordatlanten varifrån individerna i studien av Grossart *et al.* (2005) härstammade. Johansson *et al.* (2019) lyckades isolera sju bakteriearter ur *S. marinoi* kulturer med ursprung i Östersjön, och i en annan studie isolerades hela 34 bakteriearter ur en annan art av *Skeletonema* (Liu *et al.*, 2021). I båda studierna förekom bakterier i algkulturerna trots att de upprätthållits i laboratorieförhållanden i flera år. Detta kunde tyda på att interaktionerna mellan *Skeletonema* och bakterier associerat med släktet är ihärdiga, och att det potentiellt förekommer interaktioner med väldigt många bakteriearter. Forskning om bakteriesamhällets sammansättning hos *S. marinoi* i Östersjön begränsar sig dock till studien av Johansson *et al.* (2019), och fler studier krävs för att fylla denna kunskapslucka.

I flera studier har *S. marinoi* använts som en modellorganism för kiselalger eller växtplankton i allmänhet i olika experiment. *S. marinoi* fungerar bra som en modellorganism, dels för att det är relativt lätt att grunda kulturer av arten, och dels för att kulturer av arten är lätta att upprätthålla. Eftersom *S. marinoi* dominerar den viktiga vårbloomingen i Östersjön, har forskningsresultat med arten också en stor ekologisk relevans.



Figur 2. *Skeletonema marinoi* med ursprung i Östersjön. Bilden tagen i ljusmikroskop med 200 gångers förstoring.

1.4 Målsättningar och frågeställningar

Eftersom växtplankton har flera viktiga funktioner i marina ekosystem så som Östersjön, är det viktigt att utreda vilka faktorer påverkar deras tillväxtparametrar utan och vid utsättning för stress. Två faktorer som potentiellt kan ha en inverkan på tillväxtparametrar hos växtplankton är genetiska diversitetens nivå och tillståndet av bakterierna i fykosfären. Avsikten med denna avhandling var att undersöka ifall en rubbning av det associerade bakteriesamhället hos kiselalgen *S. marinoi* utsätter algen för stress, och ifall genetisk diversitet i så fall är till fördel. Mer specifikt var avsikten att betrakta betydelsen av den genetiska diversiteten utan, under och efter exponering till antibiotika, som eventuellt kunde leda till indirekt stress. Samtidigt hade avhandlingen som avsikt att undersöka ifall olika genotyper av *S. marinoi* har fenotypiska skillnader i sin respons i de olika scenarierna. Målet var att besvara följande frågeställningar:

- 1) Påverkar en rubbning av det associerade bakteriesamhället tillväxtparametrar hos *S. marinoi*?
- 2) Skiljer sig responsen hos kulturer med genetisk diversitet från kulturer utan genetisk diversitet hos *S. marinoi* a) under stress, b) vid återhämtning från stress och c) utan stress gällande algens tillväxtparametrar?
- 3) Finns det fenotypiska skillnader mellan enskilda genotyper av *S. marinoi* a) under stress, b) vid återhämtning från stress och c) utan stress gällande algens tillväxtparametrar?

Hypoteserna för avhandlingens frågeställningar var: 1) en rubbning av det associerade bakteriesamhället påverkar de mätta tillväxtparametrarna negativt, 2) kulturer med genetisk diversitet presterar bättre i de mätta tillväxtparametrarna än kulturer bestående av endast en genotyp, och 3) olika genotyper har fenotypiska skillnader i de mätta tillväxtparametrarna. Frågeställningarna 2a–b och 3a–b förutsatte att hypotesen för frågeställning 1) stämde.

2 Material och metoder

För att besvara avhandlingens frågeställningar utfördes laboratorieexperiment. I experimenten användes tre genetiskt olika stammar av *S. marinoi* med naturliga bakteriesamhällen associerat med dem. Stammarna odlades enskilt och i en kombination. Kombinationen av genotyperna användes för att representera genetisk diversitet i experimenten. De genetiskt olika (klonala) stammarna grundades själv med hjälp av vilostadier lagrade i sediment. För att rubba det associerade bakteriesamhället hos *S. marinoi* användes antibiotikabehandlingar.

2.1 Förberedelser och experiment

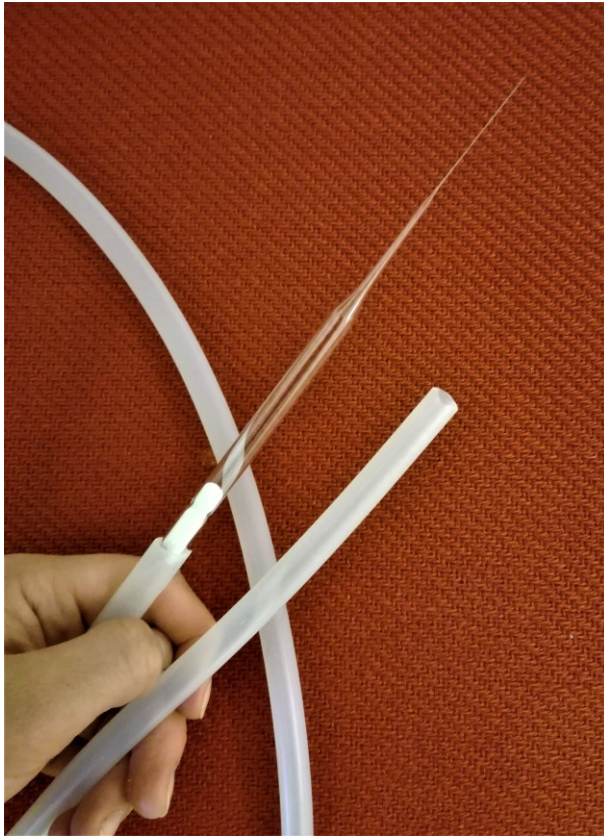
2.1.1 Grundande av klonala stammar

I april 2019 samlades sedimentprov från tre olika lokaler på nordvästra Åland. Avsikten var att grunda genetiskt olika stammar av *S. marinoi* med hjälp av algens vilostadier lagrade i sediment. Som fältbas fungerade Husö biologiska station. Sedimentprovtagning utfördes vid Västerfjärden (60°20.847 N, 19°43.216 E), väster om Äppelö (60°21.708 N, 19°41.196 E), och vid norra Ivarskärdsfjärden (60°17.816 N, 19°47.896 E) med Ekmanhuggare. För att få en uppfattning om provtagningslokalernas miljö togs vattenprov från en meter från botten och en meter från ytan med en Limnos-vattenhämtare. Från botten vattenprov mättes syrehalt, och från ytans vattenprov mättes halten av klorofyll *a* och salinitet (Tabell I, bilaga).

En liten mängd sediment (cirka 0,5 g) ur de olika lokalerna löstes upp i egna volymer av tillväxtmedium (40 ml). Sedimentupplösning från varje lokal fördelades i varsin NUNC 24-hålsplatta (Figur 4.1). 24-hålsplattorna inkuberades i ett klimarum i 10 °C ± 1 °C med 70 μmol fotoner m⁻² s⁻¹ ± 10 μmol fotoner m⁻² s⁻¹ under en 12:12 h ljus:mörker-cykel i fem dagar, tills uppväckta *S. marinoi*-individer kunde ses bland andra mikroorganismer i sedimentupplösningen (Figur 4.3). Som tillväxtmedium under hela studiens gång användes f/2 + Si (Guillard, 1975). Medium framställdes genom att pipettera näringsämnen, spårmetallerna och vitaminerna ur ett färdigt kit (Bigelow National Center for Marine Algae and Microbiota) i filtrerat havsvatten. Havsvattnet filtersterilerades genom att pumpa havsvattnet med en peristaltisk pump genom ett sterilt kapselfilter med porstorleken 0,2 μm (Pall Corporation, Acropak 200). Vid isolering av cellkedjor och grundande av klonala stammar användes havsvatten från ytterskärgården på Åland utanför Äppelö. Efter att stammarna flyttades till Åbo i maj 2019 användes havsvatten från Erstan i Åbolands skärgård. Havsvattnet från Erstan som innehöll mera organiskt material förfiltrerades genom glasfiberfilter (Whatman, GF/C) innan egentlig filtrering. Under sterilfiltrering, förvaring av filtersterilerat havsvatten och förvaring av tillväxtmedium användes sterila kärl och övrig utrustning för att undvika kontamination.

Efter inkubering av 24-hålsplattorna med sedimentupplösning började isoleringsprocessen av enskilda cellkedjor av *S. marinoi* för att grunda klonala stammar (Figur 4.3). Isoleringen skedde under ett omvänt ljusmikroskop (Nikon Diaphot) ur en Utermöhl-kammare. Vid isoleringen användes självgjorda mikropipetter (Figur 3). Mikropipetterna formades genom att töja ut upphettade pasteurpipetter av glas. Upphettningen skedde med hjälp av en flamma från en bunsenbrännare. På detta sätt skapades mikropipetter med lång och tunn spets välanpassade för att suga upp små volymer vätska. Suget in och ut ur mikropipetten kontrollerades med munnen genom en silikonslang (Figur 3) fäst på mikropipetten.

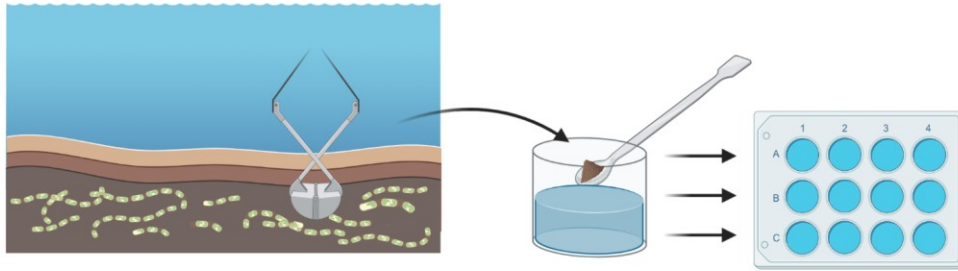
För att börja isoleringsprocessen av cellkedjor av *S. marinoi* flyttades inkuberad sedimentupplösning i en Utermöhl-kammare. Därefter lokaliserades en *S. marinoi*-individ bland andra uppväckta mikroorganismer i sedimentupplösningen. Efter att en cellkedja av *S. marinoi* lokaliserats med mikroskop, flyttades cellkedjan med mikropipett till en droppe tillväxtmedium på ett objektglas. Cellkedjan lokaliserades i droppen med mikroskop, varefter den flyttades till en ny droppe av tillväxtmedium. Detta steg upprepades tills inga andra organismer än cellkedjan av *S. marinoi* kunde detekteras i droppen. I regel flyttades kedjan genom åtminstone tre droppar tillväxtmedium för att minimera chansen för kontamination av andra organismer. Droppen med cellkedjan flyttades till en egen brunn fylld med 1,5 ml tillväxtmedium i en ny 24-hålsplatta. Endast en cellkedja per brunn isolerades från 24-hålsplattorna med sedimentupplösning för att undvika isolering av genetiskt identiska individer. Mellan varje isolering sköljdes objektglaset och Utermöhl-kammaren med 70-procentig etanol och destillerat vatten.



Figur 3. En självgjord mikropipett som användes vid isoleringen av cellkedjor av *S. marinoi*.

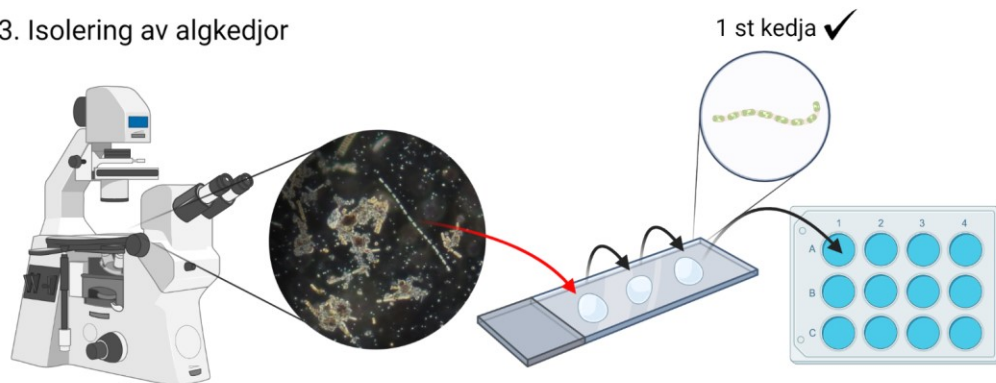
24-hålsplattorna med de isolerade cellkedjorna inkuberades i samma förhållanden som tidigare i ungefär en vecka, tills avsevärd tillväxt kunde iakttas i brunnarna med preparationsmikroskop (Figur 4.5). Hela volymen från brunnarna flyttades till 10 ml tillväxtmedium i 40 ml:s kulturflaskor (Greiner, Cellstar). Kulturflaskorna inkuberades i samma förhållanden som 24-hålsplattorna tidigare i tio dagar, varefter flaskorna fylldes upp med tillväxtmedium till 40 ml. Kontaminerade kulturer, samt kulturer som inte påvisade tillväxt slopades under processen. Kulturerna flyttades till Biocity i Åbo i maj 2019. För att upprätthålla kulturerna flyttades 1–2 ml kultur till 40 ml ny tillväxtmedium med 4–8 veckors mellanrum. Överföringarna av kultur i ny tillväxtmedium i samband med upprätthållningen av kulturerna skedde i laminarskåp för att undvika kontaminering. Totalt tretton stammar upprätthölls, och utav de som påvisade stabil tillväxt valdes slumpmässigt tre stammar (AX01, AX02, AX03) för laboratorieexperiment.

1. Fördelning av sedimentsampel i tillväxtmedium



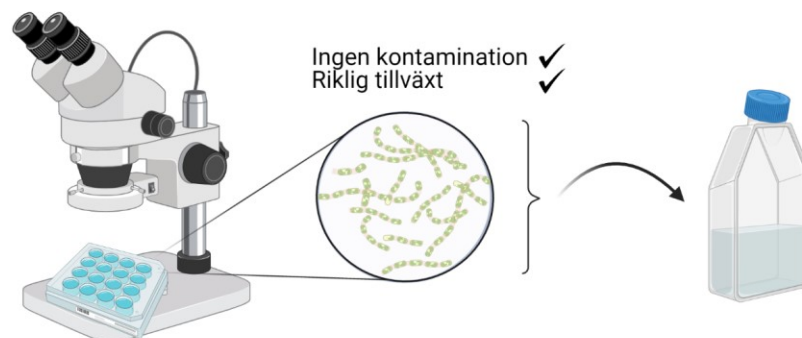
2. Inkubering

3. Isolering av algkedjor



4. Inkubering

5. Grundande av stabila kulturer



Figur 4. Processen för att grunda klonala stammar av *S. marinoi*. 1) Provtagning av vilostadier lagrade i sediment, upplösning av sediment i tillväxtmedium och fördelning av sedimentupplösning i 24-hålsplattor. 2) Inkubering av 24-hålsplattorna i $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ med $70\text{ }\mu\text{mol fotoner m}^{-2}\text{ s}^{-1} \pm 10\text{ }\mu\text{mol fotoner m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ under en 12:12 h ljus:mörker-cykel i fem dagar. 3) Lokalisering av en *S. marinoi*-individ i inkuberad sedimentupplösning, förflyttning av cellkedjan genom flera droppar tillväxtmedium för att isolera cellkedjan. Förflyttning av den isolerade cellkedjan till en egen brunn i en 24-hålsplatta tillsammans med tillväxtmedium 4) Inkubering av 24-hålsplattan i likadana förhållanden som tidigare i ungefär en vecka. 5) Förflyttning av algutväxten i brunnarna till egna kulturflaskor tillsammans med en liten volym tillväxtmedia. Inkubering av kulturflaskorna i tio dagar, och slutligen påfyllnad av mer tillväxtmedium i kulturflaskorna.

2.1.2 Antibiotika

I denna studie användes en kombination av carbenicillin, cephalexin, kanamycin, rifampicin och streptomycin för att hämma tillväxten av bakterier associerade med *S. marinoi*. För att välja lämpliga antibiotikakoncentrationer för experimentet utfördes pilottest, var effekten av fem olika koncentrationsnivåer av antibiotikakombinationen observerades (se del 2.1.3 Bestämning av antibiotikabehandlingarna med pilottest). Utifrån data ur pilottesten fattades beslutet att använda antibiotikakombinationen i två olika stressbehandlingar; en mild och en svår. För en utredning av stressbehandlingarna använda i experimentet se Tabell 1.

Av varje antibiotika framställdes stamlösningar som förvarades frysta innan användning. Vid experimentets initiering framställdes även utspädda arbetslösningar utav stamlösningarna för den milda antibiotikabehandlingen. En utredning av koncentrationerna av stam- och arbetslösningarna använda i experimentet finns inkluderat i bilagorna (Tabell II, bilaga). Alla stamlösningar framställdes i destillerat vatten, och i framställningen av rifampicinets stamlösning användes lösningsmedlet dimetylsulfoxid (DMSO) för att förbättra lösligheten. Stamlösningarna filtersterilerades med sterila 0,22 µm sprutfilter i laminarskåp innan förvaring i frysen.

Tabell 1. Antibiotikakoncentrationerna i milda och svåra stressbehandlingen använda i experimentet.

Antibiotika	Mild behandling*	Svår behandling**
Carbenicillin	25 µg/ml	100 µg/ml
Kanamycin	25 µg/ml	100 µg/ml
Streptomycin	25 µg/ml	100 µg/ml
Cephalexin	25 µg/ml	100 µg/ml
Rifampicin	5 µg/ml	25 µg/ml

* DMSO 0,005 %, ** DMSO 0,025 %

2.1.3 Bestämning av antibiotikabehandlingarna med pilottest

Eftersom det finns knappt om information om vilka antibiotika och vilka koncentrationer av antibiotika som ger en avsevärd, men inte fatal effekt på bakteriesamhället associerat med växtplankton, utfördes pilottest. Avsikten var att uppnå antibiotikabehandlingar som hämmar, men inte fullständigt utplånar bakterierna i algkulturerna. Detta var avsikten i och med antagande att *S. marinoi* inte överlever utan de associerade bakterierna. Pilottesternas målsättning var att forma två antibiotikabehandlingar för experimentet som uppfyllde dessa kriterier. Dessutom var avsikten att bekräfta att tillsatt antibiotika hade en negativ inverkan på bakteriemängden i algkulturerna. I första pilottestet granskades effekten av tillsatt antibiotika genom att följa upp cellkoncentrationen av *S. marinoi* samt mängden bakterier i algkulturerna. Cellkoncentrationen av *S. marinoi* följdes upp med manuell cellräkning med hjälp av en Sedgewick-Rafter cellkammare (1 ml). Mängden bakterier följdes upp genom att observera kolonitillväxten på agarplattor (Reasoner's 2A agar, R2A) med tillsatt algkultur.

Kombinationen av fem antibiotika för piloten valdes utifrån studien av Johansson *et al.* (2019). Av antibiotikakombinationen formades fem olika behandlingar för att testa deras effekt på tillväxten av *S. marinoi* och det associerade bakteriesamhället (Tabell 2).

Tabell 2. Antibiotikakoncentrationerna i de fem olika behandlingarna använda i pilottesten.

Antibiotika	Kontroll	Behandling	Behandling	Behandling	Behandling	Behandling
		1	2	3	4	5
Carbenicillin	0 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml	300 µg/ml
Kanamycin	0 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml	300 µg/ml
Streptomycin	0 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml	300 µg/ml
Cephalexin	0 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml	300 µg/ml
Rifampicin	0 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	75 µg/ml

I piloten inkluderades en klonal stam; genotypen AX01, samt en kultur med en kombination av alla tre genotyperna (MIX) använda senare i huvudexperimentet (AX01, AX02, AX03). Båda kulturerna (AX01 och MIX) hade en kontrollbehandling

utan antibiotika för jämförelse. Piloten utfördes i 40 ml:s kulturflaskor (Greiner, Cellstar) med 40 ml kultur. Vid pilotens initiering förbereddes kulturernas cellkoncentration till 5000 celler ml^{-1} (för en mer detaljerad beskrivning på hur cellantalet förbereddes till önskad koncentration, se del 2.1.4 Kulturernas förberedelse innan experiment). Till kulturen med en kombination av genotyperna (MIX) tillsattes lika mycket celler från varje genotyp. Pilottestet varade i sex dagar, och utfördes semikontinuerligt så som huvudexperimentet. Semikontinuitet utfördes genom att överföra 5 ml kultur i 35 ml ny tillväxtmedia den tredje dagen. För att beräkna cellkoncentrationen av *S. marinoi* togs prov (1,2 ml) den tredje och sjätte dagen. Proven fixerades med alkalisk Lugols lösning (Willén, 1962). Kulturerna inkuberades i likadana förhållanden som användes senare i huvudexperimentet (se del 2.1.5 Experimentupplägg). Data ur piloten är visualiserade i Figur I (bilaga).

På pilotens tredje och sjätte dag pipetterades även 100 μl kultur från varje kulturflaska på R2A agar för att jämföra mängden bakteriekolonier i de olika behandlingarna. Från varje kultur pipetterades 100 μl utspädd kultur, men även 100 μl kultur med utspädningen 1:10. Kultur spreds på agarplattorna med en triangelformad metallstav steriliserad med 90 % etanol och flamma mellan proverna. Agarplattorna inkuberades i samma klimarum som algerna i en mörk låda. Tillväxten av bakteriekolonier på agarplattorna kontrollerades med jämna mellanrum efter piloten, sista gången 17 dagar efter inkubering.

Efter piloten beskriven ovan gjordes en andra pilot i 500 ml:s kulturflaskor (Greiner, Cellstar) med 400 ml kultur. I andra piloten inkluderades samma algkulturer som i första piloten (AX01 och MIX), men endast kontroll och behandling 2 inkluderades för att minska arbetsbördan. Andra piloten utfördes för att kontrollera algernas tillväxt i större kulturflaskor med liknande metodik, och för att pröva exponera kulturerna till konstant koncentration av antibiotika i nio dagar. Det vill säga att den förlorade mängden antibiotika i samband med överföringarna av kultur i ny tillväxtmedia dagarna 3 och 6 kompenseras med tillsättning av mer antibiotika. Tillsättning av antibiotika dagarna 3 och 6 i samband med överföringarna bibehöll de initiala antibiotikakoncentrationerna konstanta i nio dagar. Detta skiljde sig från första piloten var förlorad antibiotikamängd inte kompenseras, och var antibiotikakoncentrationen var som högst endast de 3 första dagarna. Andra piloten varade totalt i tolv dagar. Prov

för att beräkna cellkoncentrationen av *S. marinoi* togs dagarna 3, 6, 9 och 12, och fixerades med alkalisk Lugols lösning (Willén, 1962). Resultat ur andra piloten antydde att cellkoncentrationen av *S. marinoi* blir för låg efter nio dagars exponering till de initiala koncentrationerna av antibiotika för att avklara återhämtning. Eftersom cellkoncentrationerna i proven tagna dag 9 var väldigt låga, beräknades inte cellkoncentrationen i proverna tagna dag 12. Grafer med data ur andra piloten finns inkluderat i bilagorna (Figur II, bilaga).

Utgående från resultat och observationer från första och andra piloten fattades beslutet att använda behandling 1 som en mild stressbehandling i experimentet, och behandling 3 som en svår stressbehandling (Tabell 2). Samtidigt fattades beslutet att inte bibehålla de initiala antibiotikakoncentrationerna längre än tre dagar.

För att observera eventuella skillnader i mängden eller sammansättningen av bakterier mellan de olika kulturerna, spreds dessutom 100 µl kultur av alla genotyper (AX01, AX02, AX03) och deras kombination (MIX) enskilt på R2A agar efter piloterna (kulturer utan antibiotika).

2.1.4 Kulturernas förberedelse innan experiment

Avsikten var att utföra huvudexperimentet med kulturer i den exponentiella tillväxtfasen, vilket uppnåddes genom att hålla kulturerna i semikontinuerlig tillväxt. För att börja huvudexperimentet med kulturer redan i den exponentiella tillväxtfasen, användes kulturer som upprätthölls semikontinuerligt innan experimentet påbörjades. Cellkoncentrationerna av AX01, AX02 och AX03 som hade upprätthållits sedan stammarna grundades beräknades nio dagar innan experimentet initierades genom manuell cellräkning med en hjälp av en Sedgewick-Rafter cellkammare (1 ml). Utgående från cellkoncentrationerna beräknades volymen kultur och volymen tillväxtmedium som krävdes för att förbereda 400 ml kultur med 5000 celler ml⁻¹. Kulturer förbereddes i enlighet med beräkningarna i nya kulturflaskor, en för varje genotyp. Dessa nya kulturer upprätthölls semikontinuerligt i nio dagar innan experimentet påbörjades. Semikontinuitet uppnåddes genom att överföra 50 ml kultur

till 350 ml ny tillväxtmedia med tre dagars mellanrum. Det vill säga att två överföringar gjordes innan experimentet påbörjades.

Cellkoncentrationerna i kulturerna som växt semikontinuerligt beräknades dagen som experimentet initierades med hjälp av en Sedgewick-Rafter cellkammare (1 ml). Med hjälp av de beräknade cellkoncentrationerna beräknades exakta volymen kultur (ca 9 ml) och volymen tillväxtmedia som krävdes för att förbereda 500 ml kultur med 5000 celler ml^{-1} . Kulturer förbereddes i enlighet med beräkningarna i nya kulturflaskor för varje genotyp och varje behandling. Eftersom antibiotika tillsattes i stressbehandlingarna löst i destillerat vatten, tillsattes motsvarande volym destillerat vatten utan antibiotika i kontrollbehandlingarna för att undvika olika salt- och näringshalter mellan behandlingarna. Tillsatt volym destillerat vatten togs i beaktande i beräkningen av cellkoncentrationerna.

Utav AX01, AX02 och AX03 som hade upprätthållits semikontinuerligt förberedes en kultur med en blandning av genotyperna (MIX). MIX-kulturen bildades genom att inkludera kultur från alla genotyper i en ny kulturflaska. Utifrån de beräknade cellkoncentrationerna i AX01, AX02 och AX03 beräknades den rätta proportionen som krävdes för att förbereda 500 ml kultur med ett jämnt antal celler från de olika stammarna (128,7 ml; 136,7 ml och 134,6 ml). MIX-kulturens cellkoncentration beräknades utgående från cellkoncentrationerna i AX01, AX02 och AX03. Den beräknade cellkoncentrationen användes för att beräkna volymen kultur (cirka 9 ml) och tillväxtmedium som krävdes för att förbereda 500 ml kultur med 5000 celler ml^{-1} . Detta gjordes för varje behandling i experimentet. Innan pipettering av kultur ur MIX-kulturen vändes kulturflaskan om försiktigt flera gånger för att få en homogen blandning av cellerna. Volymen av tillsatt antibiotika togs i beaktande i beräkningen av cellkoncentrationerna.

Då experimentet initierades förbereddes 500 ml kultur i kulturflaskorna istället för 400 ml som var volymen som användes under största delen av experimentet (dagarna 3–12). 100 ml extra kultur förbereddes för att kompensera en del av volymen som avlägsnades i samband med provtagningarna som skedde experimentets första dag. 130 ml kultur avlägsnades i samband med provtagningarna, så den slutliga volymen i kulturflaskorna var 370 ml dagarna 0–3 och inte 400 ml som dagarna 3–12. Den

avlägsnade volymen var hela 130 ml eftersom prov togs för klorofyll *a* (50 ml), men även för andra analyser (80 ml) som inte inkluderades i avhandlingen.

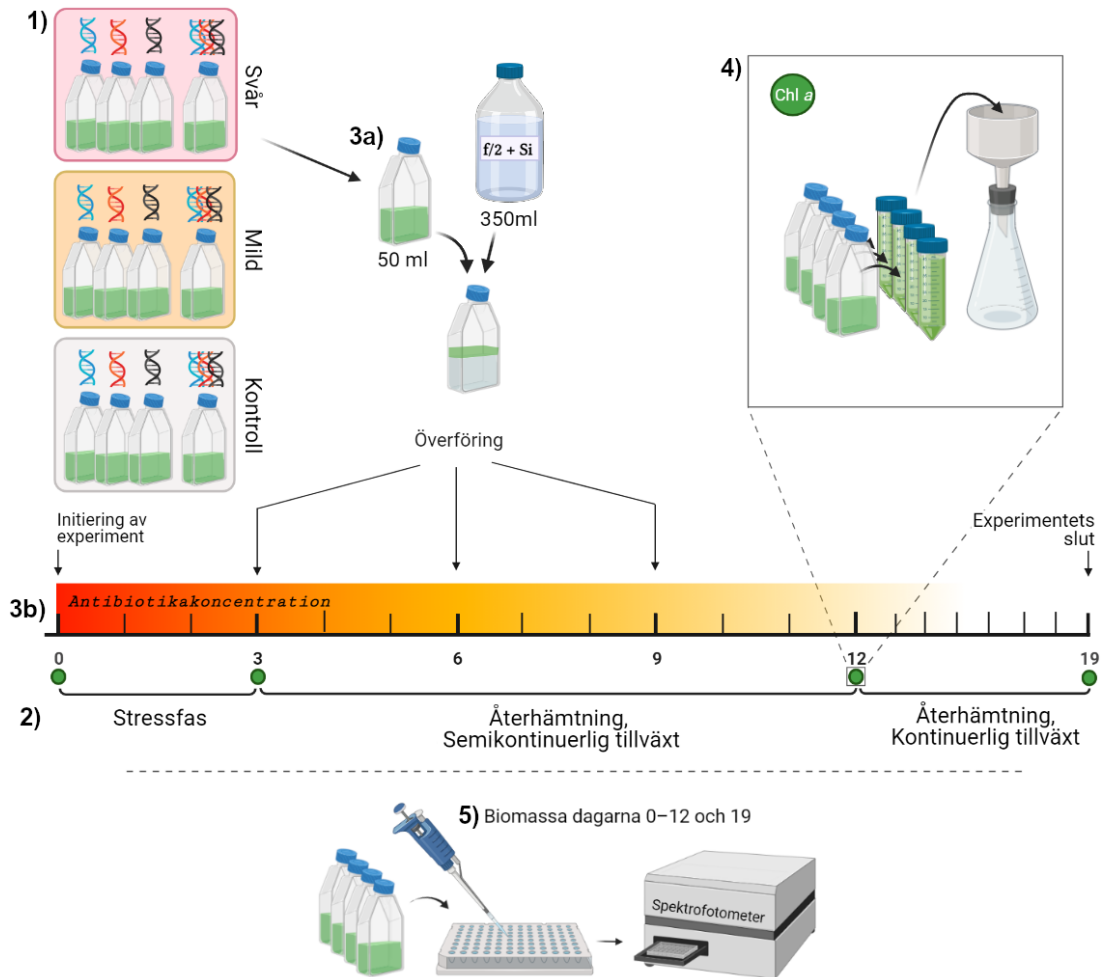
2.1.5 Experimentupplägg

Huvudexperimentet (Figur 5) utfördes mellan september och oktober 2020 i Natura på Åbo Universitet. Experimentet utfördes med tre klonala stammar (AX01, AX02, AX03) av *S. marinoi* odlade enskilt och tillsammans i en kombination (MIX). Kulturerna som bestod av en kombination av de olika genotyperna (klonala stammarna) representerade genetisk diversitet. Experimentet hade tre behandlingar: en mild stressbehandling, en svår stressbehandling och en kontrollbehandling (Figur 5.1). Experimentet pågick i nitton dagar, och var uppdelat i tre faser; en tre dagars stressfas med de högsta antibiotikakoncentrationerna (Tabell 1), en nio dagars återhämtningsfas i semikontinuerlig tillväxt, och en sju dagars fortsatt återhämtningsfas i kontinuerlig tillväxt (Figur 5.2). Under återhämtningen i semikontinuerlig tillväxt dagarna 3–12 minskade antibiotikakoncentrationerna med sju åttondelar vart tredje dag. De exakta antibiotikakoncentrationerna under experimentets gång i milda och svåra stressbehandlingen finns inkluderade i bilagorna (Tabell III och IV, bilagor).

De fyra olika kulturerna (AX01, AX02, AX03 och MIX) hade fyra biologiska replikat ($n = 4$) i varje behandling. Totalantalet kulturflaskor var 48 stycken: tre behandlingar \times fyra kulturtyper \times fyra biologiska replikat. Experimentet pågick under lysrör (4000 kelvin) i $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ med $97\text{ }\mu\text{mol fotoner m}^{-2}\text{ s}^{-1} \pm 10\text{ }\mu\text{mol fotoner m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ under en 12:12 h ljus:mörker-cykel. På grund av praktiska begränsningar ställdes kulturflaskorna under lysrören i tre grupper, men flaskornas ordning randomiserades dagligen experimentets tolv första dagar. Efter dag 12 stod flaskorna i samma randomiserade ordning för resten av experimentet. Antibiotika tillsattes i stressbehandlingarna då experimentet initierades, varefter ingen ytterligare antibiotika tillsattes under resten av experimentet. Därav var antibiotikakoncentrationerna starkaste de tre första dagarna och definierades som experimentets stressfas. Den sammanlagda tillsatta volymen antibiotika (20,5 ml) var samma för båda stressbehandlingarna, då olika arbetskoncentrationer (Tabell II, bilaga) av antibiotika

användes. Som nämnts tidigare (ovan) tillsattes motsvarande volym destillerat vatten till kontrollbehandlingen för att undvika olika salt- och näringshalter i behandlingarna.

Vid experimentets initiering förbereddes cellkoncentrationen av *S. marinoi* i de olika kulturerna till 5000 celler ml⁻¹. För en mer detaljerad förklaring på hur cellantalet förbereddes till önskad koncentration, se del 2.1.4 Kulturernas förberedelse innan experiment. Experimentet utfördes i 500 ml stora kulturflaskor (Greiner, Cellstar) med 400 ml kultur i flaskorna ända till dag 12, med undantaget av de tre första dagarna (se del 2.1.4 Kulturernas förberedelse inför experimentet). Algernas tillväxt under experimentet upprätthölls semikontinuerligt dagarna 0–12 för att hålla algerna i exponentiell tillväxt. Semikontinuitet uppnåddes genom att dagarna 0–12 vart tredje dag avlägsna 50 ml kultur, och överföra volymen till 350 ml ny tillväxtmedia i nya kulturflaskor (Figur 5.3a). Denna metodik hade konstaterats vara lämplig för semikontinuerlig upprätthållning av *S. marinoi* med preliminära test innan utförande av experimentet (Figur III, bilaga). Syftet med den andra återhämtningsfasen var att nå algernas stationära tillväxtfas, så inga överföringar gjordes dagarna 12–19. För att nå den stationära tillväxtfasen inom sju dagar tillsattes ingen ny tillväxtmedia i kulturflaskorna efter provtagningarna dag 12. Därmed var volymen i kulturflaskorna under dessa dagar endast 270 ml.



Figur 5. Figur över experimentets upplägg: 1) Experimentet hade två stressbehandlingar och en kontrollbehandling. Varje behandling hade fyra kulturtyper: tre kulturer bestående av endast en genotyp (AX01, AX02, AX03) och en kultur bestående av en blandning av genotyperna (MIX). Varje kulturflaska hade fyra biologiska replikat. 2) Experimentet var uppdelat i tre faser; en tre dagars stressfas, en nio dagars återhämtningsfas i semikontinuerlig tillväxt, och en sju dagars fortsatt återhämtningsfas i kontinuerlig tillväxt. 3a) Semikontinuerlig tillväxt utfördes genom att överföra 50 ml kultur i 350 ml ny media vart tredje dag dagarna 0–12. 3b) Antibiotikakonzentrationerna i stressbehandlingarna minskade med 7% vart tredje dag i och med överföringarna. 4) Prov för analys av klorofyll *a* togs dagarna 0, 3, 12 och 19. 5) Biomassa i form av *in vivo* fluorescens av klorofyll *a* mättes dagarna 0–12 och 19 med spektrofotometer.

2.2 Provtagning och provanalys

Biomassa mättes dagligen dagarna 0–12 ungefär samma tid varje kväll (Figur 5.5). En sista mätning av biomassa gjordes dag 19. Prov för analys av klorofyll *a* togs dagarna 0, 3, 12 och 19 (Figur 5.4). Dag 19 uteblev provtagningen av klorofyll *a* för den svåra

stressbehandlingen. Prov för eventuell manuell cellräkning (1,2 ml) togs dagarna 12 och 19, och förvarades med alkalisk Lugols lösning (Willén, 1962).

2.2.1 Biomassa

In vivo fluorescens av klorofyll *a* användes som ett mått på biomassa istället för cellkoncentration beräknat utifrån manuell cellräkning med mikroskop. *In vivo* fluorescens av klorofyll *a* mättes dagligen med en spektrofotometer (Perkin Elmer, EnSpire™ 2300 Multilabel Reader) i helsvarta 96-hålsplattor (PerkinElmer, 96 Optiplate). Ur varje kulturflaska pipetterades 300 µl i tre brunnar för tekniska replikat. För att ta i beaktande eventuell ojämn fördelning av celler i brunnarna, användes “well area scan”-läge för att få fem mätningar runt mitten av varje brun med 1 mm avstånd mellan mätningarna. Eftersom de dagliga proverna (inkluderande tekniska replikat och blankmätningar) inte fick plats på en 96-hålsplatta, fördelades proven mellan två 96-hålsplattor. Fluorescensens excitationsvåglängd var inställt till 425 nm, och emissionsvåglängden till 680 nm.

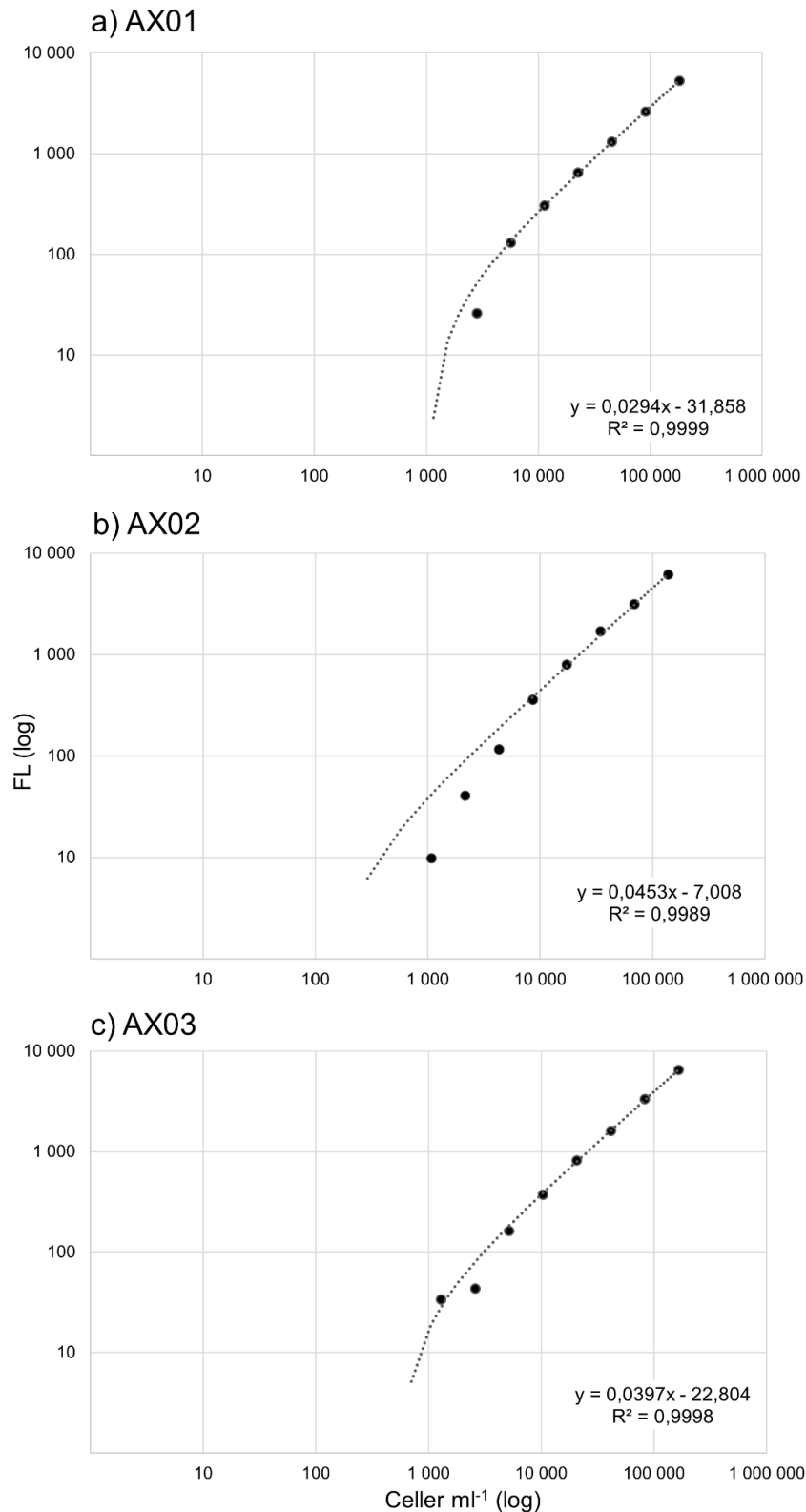
För varje behandling fanns en kulturflaska utan alger för blankkorrigering av fluorescensmätningarna. Blanka kulturflaskorna inkuberades tillsammans med resten av kulturflaskorna, och genomgick likadana överföringar. Kontrollbehandlingens blank innehöll endast tillväxtmedium, och stressbehandlingarnas blanker innehöll tillväxtmedia med korresponderande antibiotikakoncentrationer. Från och med dag 4 hade varje mätta 96-hålsplatta tre brunnar med blank från varje behandling. Innan dag 3 inkluderades blanka prov dagligen endast på endera av de mätta plattorna. Plattorna som saknade blankmätningar blankkorrigerades med ett medeltal beräknat av blankmätningar från andra mätningssomgångar. Fluorescensmätningarna blankkorrigerades med blankmätningarna manuellt i efterhand.

Standardkurvor för *in vivo* fluorescens av klorofyll *a* gjordes innan experimentet enskilt för genotyperna AX01, AX02 och AX03 (Figur 6). Cellkoncentrationerna i varje klonala stam beräknades genom manuell cellräkning i mikroskop med hjälp av en Sedgewick-Rafter cellkammare (1 ml). Av kulturerna gjordes en spädningsserie med faktorn 1:2 i tio utspädningar. Utspädningarnas *in vivo* fluorescens av klorofyll *a*

mättes med samma inställningar i samma spektrofotometer som användes i huvudexperimentet. Ett prov med endast tillväxtmedium (utan celler) inkluderades i standardkurvorna. I standardkurvorna inkluderades åtta av utspädningarna med de lägsta cellkoncentrationerna, för att omfatta endast cellkoncentrationer som påträffades i huvudexperimentet. Cellkoncentrationerna i standardkurvorna sträckte sig från ungefär 1 000 celler ml⁻¹ till 180 000 celler ml⁻¹, beroende på genotyp. Fluorescensvärdena mätta i experimentet omvandlades till cellkoncentrationer med hjälp av standardkurvornas linjära ekvation. För standardkurvan för kulturerna bestående av en kombination av genotyperna (MIX) beräknades en genomsnittlig linje utifrån de klonala stammarnas standardkurvor. Utifrån cellkoncentrationerna beräknades också tillväxthastigheten r (eng. intrinsic rate of increase) under experimentet med formeln:

$$r = \frac{\ln(N_t/N_0)}{\Delta t} = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{\Delta t},$$

var Δt är tidsintervallets längd ($t_t - t_0$) (Wood et al., 2005). För statistiska analyser beräknades tillväxthastigheten r för fem tidsintervall: fyra tre dagars intervall mellan dagarna 0 och 12 (0–3, 3–6, 6–9, 9–12), och en sju dagars intervall mellan dagarna 12 och 19.



Figur 6. Standardkurvor med förhållandet mellan cellkoncentrationer beräknade genom manuell cellräkning i mikroskop och *in vivo* fluorescens av klorofyll *a* mätt med spektrofotometer. Standardkurvor för genotyperna a) AX01, b) AX02 och c) AX03. Notera att båda axlarna är i logaritmisk skala. Den linjära trendlinjens ekvation och regressionskoefficienten är angiven för varje graf nere till höger. De linjära trendlinjerna och regressionskoefficienterna är beräknade i Microsoft Office Excel.

2.2.2 Klorofyll *a*

För analys av klorofyll *a* filtrerades 50 ml kultur på ett glasfiberfilter (Whatman, GF/C) med en vakuumpump. Provvolymerna hälldes upp i 50 ml:s centrifugrör innan filtrering. Filtreringsapparaturen sköljdes mellan proverna med kranvatten. Filtren förvarades torrt i mörker tills analys. Analys av klorofyll *a* ur filtren utfördes på Husö biologiska station. Halten av klorofyll *a* i µg/l analyserades genom extrahering med etanol (SFS, 1993).

2.3 Statistiska analyser

Både data med tillväxthastighet *r* och data med klorofyll *a* analyserades med en trevägs ANOVA (variansanalys) med blandad design (eng. mixed measures ANOVA) i enskilda univariata analyser. ANOVA-analyserna gjordes med två mellangrupsvariabler (eng. between subjects factors) och en inomgruppsvariabel (eng. within subjects factor) för att estimeras effekten av genotyp, behandling och tid på beroende variablerna. Tidpunkt agerade som inomgruppsvariabel, och genotyp och behandling agerade som mellangrupsvariabler. I den statistiska modellen för klorofyll *a* inkluderades data från alla fyra tidpunkterna som provtagningar gjordes; dag 0, dag 3, dag 12 och dag 19. I statistiska modellen för tillväxthastighet *r* inkluderades tillväxthastighet beräknat för fem tidsintervall; dag 0–3, dag 3–6, dag 6–9, dag 9–12 och dag 12–19.

För att visuellt granska att det inte fanns extremvärden användes låddiagram. Fördelningen av data kontrolleras visuellt med så kallade QQ-plottar, och för att granska att kraven för normalfördelning uppfylldes användes Shapiro–Wilks test. Levenes test användes för att testa för homogena varianser.

Då trevägsinteraktionen observerades vara signifikant för beroende variabeln i fråga, analyserades möjliga tvåvägsinteraktioner. Effekten av interaktionen mellan tid och behandling på varje nivå av genotyp, samt också effekten av interaktionen mellan genotyp och behandling på varje nivå av tidpunkt analyserades. Därefter analyserades

i vilka scenarier det fanns en signifikant huvudeffekt av genotyp, samt i vilka scenarier det fanns en signifikant huvudeffekt av behandling på beroende variablerna. Dessa analyser gjordes med enskilda ANOVA-analyser. Till sist utfördes parvisa jämförelser med t-test som post hoc för att undersöka vilka genotyper eller vilka behandlingar som skilde sig signifikant från varandra inom varje tidpunkt eller tidsintervall. Bonferroni-korrigerad användes vid analys av tvåvägsinteraktionerna, huvudeffekterna och post-hoc.

Alla statistiska analyser utfördes i R (version 4.0.2), och de statistiska modellerna utfördes med tilläggs paketet rstatix.

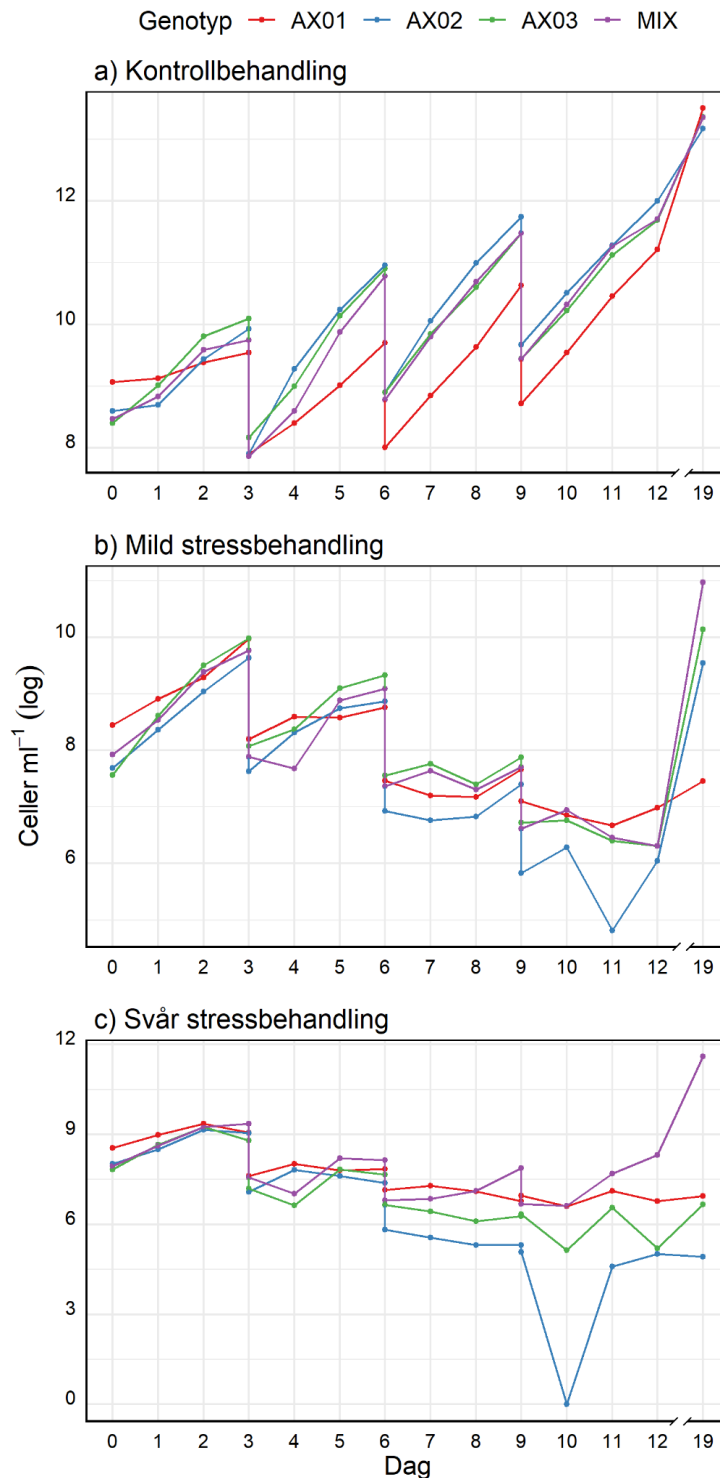
3 Resultat

3.1 Biomassa

Cellkoncentrationerna var huvudsakligen betydligt lägre i stressbehandlingarna jämfört med kontrollbehandlingen (Figur 7; Figur IV, bilaga), och allra lägst var de i den svåra stressbehandlingen (Figur 7c). Under de tre första dagarna av experimentet sågs ännu inte en stor skillnad mellan kontrollbehandlingen och milda behandlingens tillväxt (Figur 7a–b), men från och med dag 3 var skillnaden mellan behandlingarna uppenbar. I svåra behandlingen var cellkoncentrationerna betydligt lägre än kontrollbehandlingen redan de tre första dagarna (Figur 7a och c).

Kulturerna i kontrollbehandlingen växte i regel exponentiellt under experimentets semikontinuerliga andel (dagarna 0–12) (Figur 7a). I kontrollbehandlingen var cellkoncentrationen hos AX01 betydligt lägre än de andra kulturerna genom hela experimentet (med undantag av dag 19) (Figur 7a), och genotypen påvisade tidvis sämre tillväxt även i milda stressbehandlingen (Figur 7b). Tillväxthastigheten i stressbehandlingarna var uppenbarligen för låga för att kompensera utspädningen som skedde i och med överföringen av $\frac{1}{8}$ kultur i ny tillväxtmedium vart tredje dag. Medan cellkoncentrationerna i kontrollbehandlingen mångfaldigades under experimentet, var cellkoncentrationen i båda stressbehandlingarna betydligt lägre dag 12 än under första

dagen av experimentet. Dag 12 var cellkoncentrationen i milda behandlingen uppskattningsvis endast 300–1 500 celler ml^{-1} och 0–1 000 celler ml^{-1} i svåra behandlingen (med undantag av ett replikat av MIX, 1 600 celler ml^{-1}). Efter sju dagar i kontinuerlig tillväxt (dag 19) hade återhämtning skett i milda behandlingen hos alla andra kulturtyper förutom i genotypen AX01 (Figur 7b). Kulturerna med en blandning av genotyperna (MIX) hade återhämtat sig betydligt bättre än de klonala kulturerna i milda behandlingen (Figur 7b; Figur IVb, bilaga). I svåra behandlingen hade återhämtning skett endast i ett av fyra replikat av MIX, medan resten av kulturerna påvisade ytterst lite återhämtning, eller ingen återhämtning alls (Figur 7c; Figur IVc, bilaga).



Figur 7. Cellkoncentrationer under experimentet i a) kontrollbehandlingen, b) milda stressbehandlingen, och c) svåra stressbehandlingen. Medeltal av biologiska replikat ($n = 4$) i logaritmisk skala. Notera skillnaderna i skalorna på y-axeln, och att det förekommer avbrott i skalan på x-axeln. Cellkoncentrationerna är omvandlade från *in vivo* fluorescens av klorofyll *a* mätt med spektrofotometer. Samma figur i normal skala (medeltal \pm standardavvikelse) är inkluderad i bilagorna (Figur IV, bilaga). Ett av värdena blev negativt vid omvandling, och ändrades till 1 för figuren för att underlätta visualisering av data. Notera att höga medeltalet för MIX i slutet av graf c beror på att ett av de fyra biologiska replikaten påvisade avsevärt högre tillväxt än resten av replikaten. För standardavvikelser visualiserade som felstaplar, se Figur IV (bilaga).

3.2 Tillväxthastighet

Data för tillväxthastighet r hade homogena varianser i tidsintervallerna dag 0–3, dag 3–6, och dag 6–9 men inte i tidsintervallerna dag 9–12 och dag 12–19. Levens test; $p = 0,0145$ för dag 9–12, och $p = 0,0232$ för dag 12–19. Eftersom modellen i fråga är relativt robust för heterogena varianser då gruppstorlekarna är lika stora (Patrick, 2009), utfördes ANOVA-analysen med blandad design i alla fall trots att alla krav för homogena varianser inte uppfylldes. I påföljande del inkluderar termen genotyp alla kulturtyper som användes i experimentet (AX01, AX02, AX03, MIX).

Variansanalysen med blandad design tydde på en signifikant tvåvägsinteraktion mellan behandling, genotyp och tid; $F(14,42; 81,72) = 3,029$, $p = 0,000779$. Det fanns en signifikant effekt på tillväxthastighet r av tvåvägsinteraktionen mellan tidsintervall och behandling på varje genotyp (Tabell 3). Det fanns även en signifikant effekt på klorofyll a av tvåvägsinteraktionen mellan genotyp och behandling under tidsintervallerna dag 3–6 och dag 12–19 (Tabell 4). Huvudeffekten av genotyp på tillväxthastighet var signifikant dag 0–3 i kontrollen och milda behandlingen, dag 3–6 i kontrollen och milda behandlingen, dag 6–9 i kontrollen, dag 9–12 i kontrollen och dag 12–19 i kontrollen och båda stressbehandlingarna (Tabell 5). Huvudeffekten av behandling på tillväxthastigheten r var signifikant för alla genotyper under varje tidsintervall (Tabell 6).

Den parvisa jämförelsen med t-test antydde ett flertal signifikanta skillnader i tillväxthastighet r mellan genotyper inom samma tidsintervall och behandlingar. Till exempel hade AX01 signifikant sämre tillväxthastighet r dag 3–6 i både kontrollen och milda behandlingen än resten av genotyperna. Även under dag 12–19 hade AX01 en signifikant lägre tillväxthastighet r än de andra genotyperna i milda behandlingen, men signifikant högre tillväxthastighet r i kontrollbehandlingen. Dessutom förekom även andra skillnader mellan enskilda genotyper i kontrollbehandlingen och milda behandlingen under alla tidsintervaller. Signifikanta skillnader mellan genotypernas tillväxthastighet r inom samma behandlingar inom de enskilda tidsintervallerna är visualiserade i Figur 8. Parvisa t-testet som jämförde tillväxthastighet r mellan behandlingarna inom samma genotyp och samma tidsintervall, antydde signifikanta skillnader inom alla fem tidsintervall. Tillväxthastigheten r var signifikant högre i

kontrollbehandlingen än båda stressbehandlingarna i alla tidsintervall mellan dagarna 3–12. Dag 0–3 var tillväxthastigheten signifikant högre i milda behandlingen än kontrollbehandlingen hos AX01 och kombinationen av genotyperna (MIX). Hos AX01 var kontrollbehandlings tillväxthastighet r mellan dagarna 12–19 fortfarande signifikant högre än båda stressbehandlingarna, men hos AX02, AX03 och blandningen av genotyperna (MIX) var tillväxthastigheten r i milda behandlingen signifikant högre än kontrollbehandlingen och svåra stressbehandlingen. Signifikanta skillnader i tillväxthastighet r mellan olika behandlingar inom samma genotyp och tidsintervall är visualiserade i Figur 9.

Tabell 3. ANOVA-resultat på effekten av tvåvägsinteraktionen mellan tid och behandling på tillväxthastighet r , på varje nivå av genotyp. Signifikanta skillnader är markerade; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Bonferronikorrigerat.

Genotyp	Frihetsgrad		Frihetsgrad	p
	täljare	nämnare		
AX01	8	36	55,033	6,91E-18 ****
AX02	8	32	22,93	3,46E-11 ****
AX03	8	36	17,294	3,22E-10 ****
MIX	8	32	14,913	7,99E-09 ****

Tabell 4. ANOVA-resultat på effekten av tvåvägsinteraktionen mellan genotyp och behandling under fem tidsintervall under experimentet. Signifikanta skillnader är markerade; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Bonferronikorrigerat.

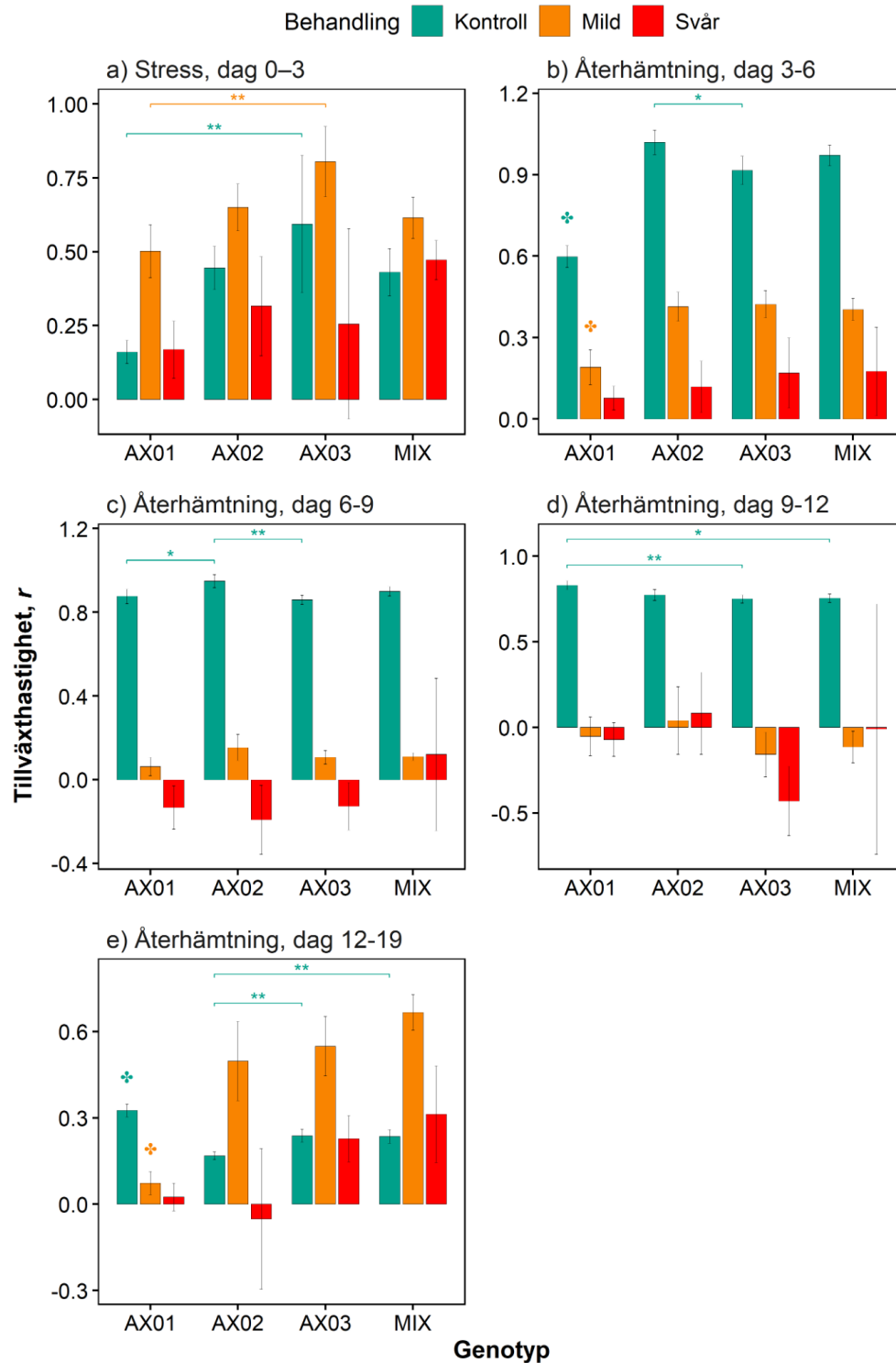
Tidsintervall	Frihetsgrad		Frihetsgrad	p
	täljare	nämnare		
Dag 0–3	6	36	2,02	0,088
Dag 3–6	6	36	4,311	0,002 **
Dag 6–9	6	36	1,855	0,116
Dag 9–12	6	34	1,081	0,393
Dag 12–19	6	34	11,976	3,42E-07 ****

Tabell 5. ANOVA-resultat på huvudeffekten av genotyp på tillväxthastighet r . Signifikanta skillnader är markerade; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Bonferronikorrigerat.

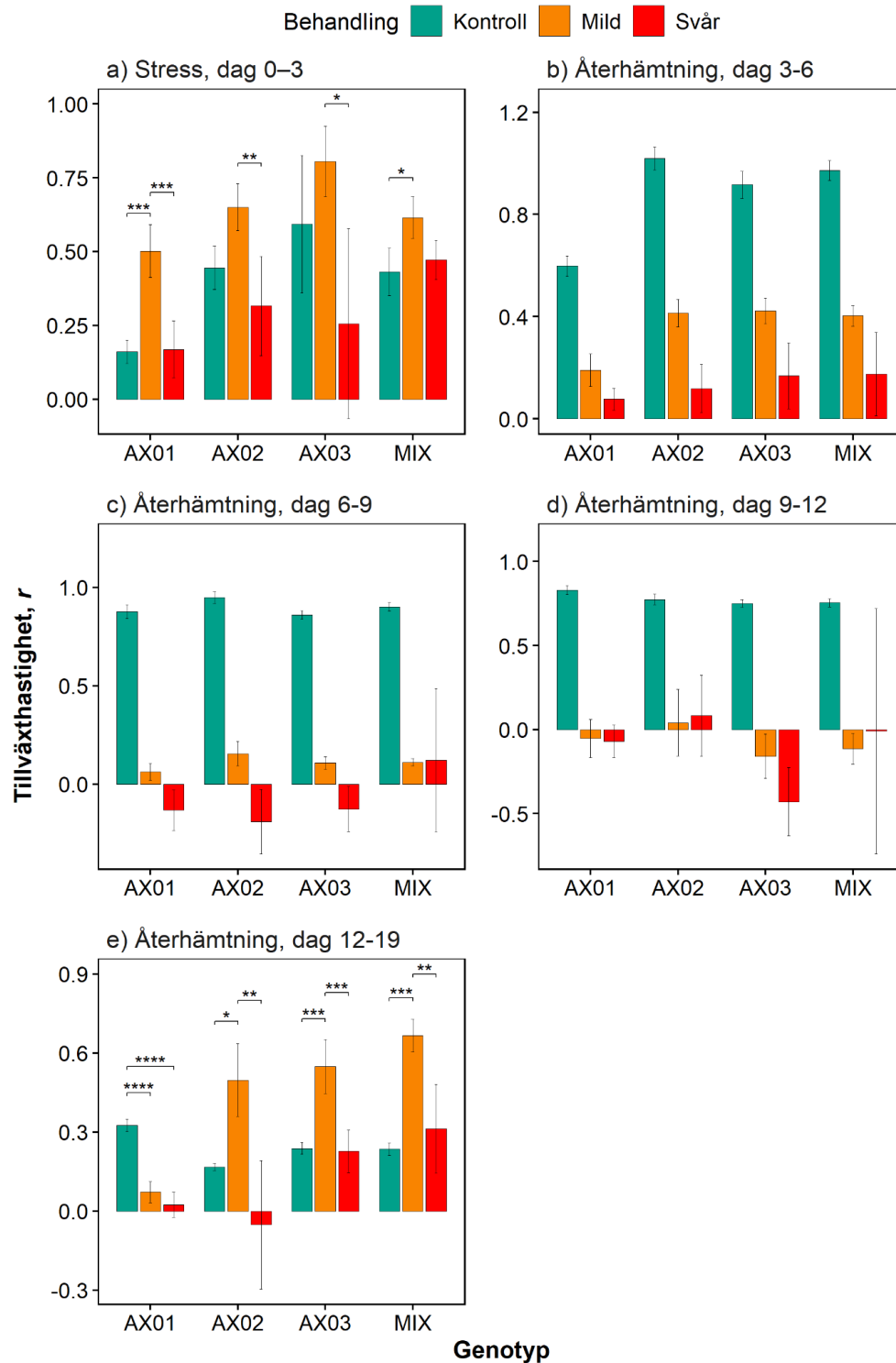
Behandling	Dag	Frihetsgrad täljare	Frihetsgrad nämnare	Frihetsgrad	p	
Kontroll	Dag 0–3	3	12	7,713	0,004	**
Mild	Dag 0–3	3	12	7,531	0,004	**
Svår	Dag 0–3	3	12	1,795	0,202	
Kontroll	Dag 3–6	3	12	73,708	5,30E–08	****
Mild	Dag 3–6	3	12	17,799	1,00E–04	***
Svår	Dag 3–6	3	12	0,625	0,613	
Kontroll	Dag 6–9	3	12	7,882	0,004	**
Mild	Dag 6–9	3	12	3,088	0,068	
Svår	Dag 6–9	3	12	1,673	0,225	
Kontroll	Dag 9–12	3	12	7,562	0,004	**
Mild	Dag 9–12	3	12	1,524	0,259	
Svår	Dag 9–12	3	10	1,38	0,305	
Kontroll	Dag 12–19	3	12	39,061	1,80E–06	****
Mild	Dag 12–19	3	12	30,569	6,70E–06	****
Svår	Dag 12–19	3	10	4,631	0,028	*

Tabell 6. ANOVA-resultat på huvudeffekten av behandling på tillväxthastighet r . Signifikanta skillnader är markerade; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Bonferronikorrigerat. Notera att effekten av tvåvägsinteraktionen mellan genotyp och behandling var endast signifikant under tidsintervallen dag 3–6 och dag 12–19 (Tabell 4).

Genotyp	Tidsintervall	Frihetsgrad täljare	Frihetsgrad nämnare	Frihetsgrad	p
AX01	Dag 0–3	2	9	24,044	2,45E–04 ***
AX02	Dag 0–3	2	9	8,596	0,008 **
AX03	Dag 0–3	2	9	5,355	0,029 *
MIX	Dag 0–3	2	9	7,178	0,014 *
AX01	Dag 3–6	2	9	119,886	3,26E–07 ****
AX02	Dag 3–6	2	9	181,494	5,33E–08 ****
AX03	Dag 3–6	2	9	78,732	1,99E–06 ****
MIX	Dag 3–6	2	9	67,79	3,75E–06 ****
AX01	Dag 6–9	2	9	249,863	1,30E–08 ****
AX02	Dag 6–9	2	9	129,257	2,35E–07 ****
AX03	Dag 6–9	2	9	218,807	2,34E–08 ****
MIX	Dag 6–9	2	9	18,416	6,59E–04 ***
AX01	Dag 9–12	2	9	137,793	1,78E–07 ****
AX02	Dag 9–12	2	8	22,097	5,52E–04 ***
AX03	Dag 9–12	2	9	77,871	2,08E–06 ****
MIX	Dag 9–12	2	8	6,395	0,022 *
AX01	Dag 12–19	2	9	70,73	3,13E–06 ****
AX02	Dag 12–19	2	8	12,182	0,004 **
AX03	Dag 12–19	2	9	22,739	3,03E–04 ***
MIX	Dag 12–19	2	8	23,734	4,33E–04 ***



Figur 8. Stapeldiagram över skillnader i tillväxthastighet r hos olika genotyper inom samma behandlingar under a) dag 0-3, b) dag 3-6, c) dag 6-9, d) dag 9-12 och e) dag 12-19 av experimentet, medeltal \pm standardavvikelse. Signifikanta skillnader mellan genotyperna är markerade med färgade klamrar för att indikera inom vilken behandling skillnad kunde ses; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Markering med \clubsuit antyder signifikant skillnad från alla de andra kulturtyperna (AX02, AX03, MIX) inom samma behandling; $p < 0,01$. Bonferronikorrigerat. Notera skillnader i skalorna.



Figur 9. Stapeldiagram över skillnader i tillväxthastighet (r) mellan olika behandlingar hos samma genotyp under a) dag 0–3, b) dag 3–6, c) dag 6–9, d) dag 9–12 och e) dag 12–19 av experimentet, medeltal \pm standardavvikelse. Signifikanta skillnader är markerade med klamrar för graferna var det är oklart om en signifikant skillnad förekom; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. I graferna b–d är inga klamrar utsatta för att undvika omåttligt antal klamrar; kontrollerna skiljde sig signifikant från båda antibiotikabehandlingarna hos varje genotyp; $p < 0,05$. Bonferronikorrigerat. Notera skillnader i skalorna. Notera att effekten av tvåvägsinteraktionen mellan genotyp och behandling var signifikant endast i graf b och c (Tabell 3). Endast huvudeffekten av behandling var signifikant för graferna a, c och d (Tabell 6).

3.3 Klorofyll *a*

För klorofyll *a* var varianserna homogena för dagarna 3 och 19, men inte för dagarna 0 och 12. Levens test; $p = 0,0314$ för dag 0, och $p = 0,00294$ för dag 12. Eftersom modellen i fråga är relativt robust för homogena varianser då gruppstorlekarna är lika stora (Patrick, 2009), utfördes ANOVA-analysen i alla fall trots att alla krav för homogena varianser inte uppfylldes.

Variansanalysen med blandad design tydde på en signifikant tvåvägsinteraktion mellan behandling, genotyp och tid; $F(3,61; 28,86) = 8,04$, $p = 0,00025$. Det fanns en signifikant effekt på klorofyll *a* av tvåvägsinteraktionen mellan tid och behandling på varje genotyp (Tabell 7). Det fanns även en signifikant effekt på klorofyll *a* av tvåvägsinteraktionen mellan genotyp och behandling under dagarna 3, 12 och 19 (Tabell 8). Huvudeffekten av antibiotikabehandling på klorofyll *a* var signifikant dag 3 för genotyperna AX02 och AX03, samt dagarna 12 och 19 för alla genotyper (Tabell 9). Huvudeffekten av genotyp på klorofyll *a* var signifikant dag 0 i milda behandlingen, dag 3 i både kontrollbehandlingen och milda behandlingen, dag 12 i kontrollbehandlingen, och dag 19 både i kontrollbehandlingen och milda behandlingen (Tabell 10). En signifikant huvudeffekten av genotyp observeras inte i den svåra behandlingen.

Den parvisa jämförelsen med t-test antydde ett flertal signifikanta skillnader i klorofyll *a* mellan genotyper inom samma dagar och behandlingar. Till exempel skiljde sig kulturen med en kombination av genotyperna (MIX) signifikant från alla klonala stammar dag 19, och genotyp AX01 skilde sig signifikant från åtminstone en genotyp i åtminstone en av behandlingarna varje provtagningsdag. Signifikanta skillnader mellan genotypernas halt av klorofyll *a* inom samma behandlingar inom de enskilda dagarna är visualiserade i Figur 10. Parvisa t-testet som jämförde klorofyll *a* mellan behandlingarna inom samma genotyp inom samma dag antydde en signifikant skillnad dag 12 i klorofyll *a* mellan kontrollbehandlingen och båda stressbehandlingarna hos varje genotyp. Dag 19 fanns en signifikant skillnad mellan kontrollbehandlingen och milda stressbehandlingen hos varje genotyp. Hos två av klonala kulturerna kunde skillnader i klorofyll *a* mellan olika behandlingar ses redan dag 3. Signifikanta

skillnader mellan behandlingarna inom samma genotyp och samma dag är visualiserade i Figur 11.

Tabell 7. ANOVA-resultat på effekten av tvåvägsinteraktionen mellan tid och behandling på klorofyll, på varje nivå av genotyp. Signifikanta skillnader är markerade; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Bonferronikorrigerat.

Genotyp	Frihetsgrad täljare	Frihetsgrad nämnare	Frihetsgrad	p
AX01	3	8	366,167	7,46E-07 ****
AX02	3	8	161,124	3,43E-13 ****
AX03	3	8	150,475	6,21E-13 ****
MIX	3	8	597,694	3,32E-18 ****

Tabell 8. ANOVA-resultat på effekten av tvåvägsinteraktionen mellan genotyp och behandling under experimentets provtagningsdagar 0, 3, 12 och 19. Signifikanta skillnader är markerade; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Bonferronikorrigerat.

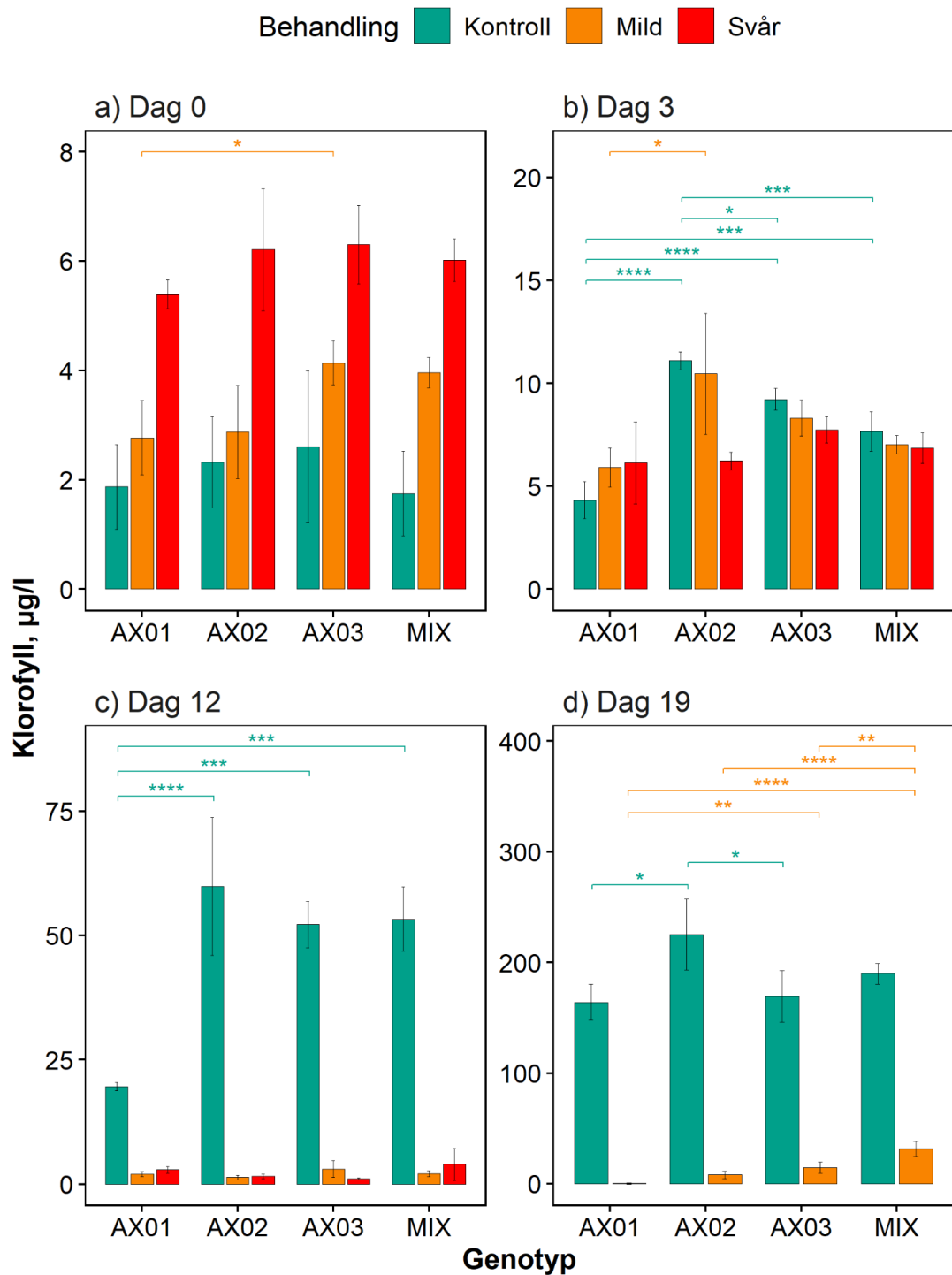
Dag	Frihetsgrad täljare	Frihetsgrad nämnare	Frihetsgrad	p
Dag 0	6	36	1,09	0,386
Dag 3	6	36	5,88	2,36E-4 ***
Dag 12	6	36	19,9	4,26E-10 ****
Dag 19	3	24	6,87	0,002 **

Tabell 9. ANOVA-resultat på huvudeffekten av genotyp på klorofyll *a*. Signifikanta skillnader är markerade; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Bonferronikorrigerat. Resultat från svåra behandlingen dag 19 saknas eftersom provtagningen i fråga uteblev.

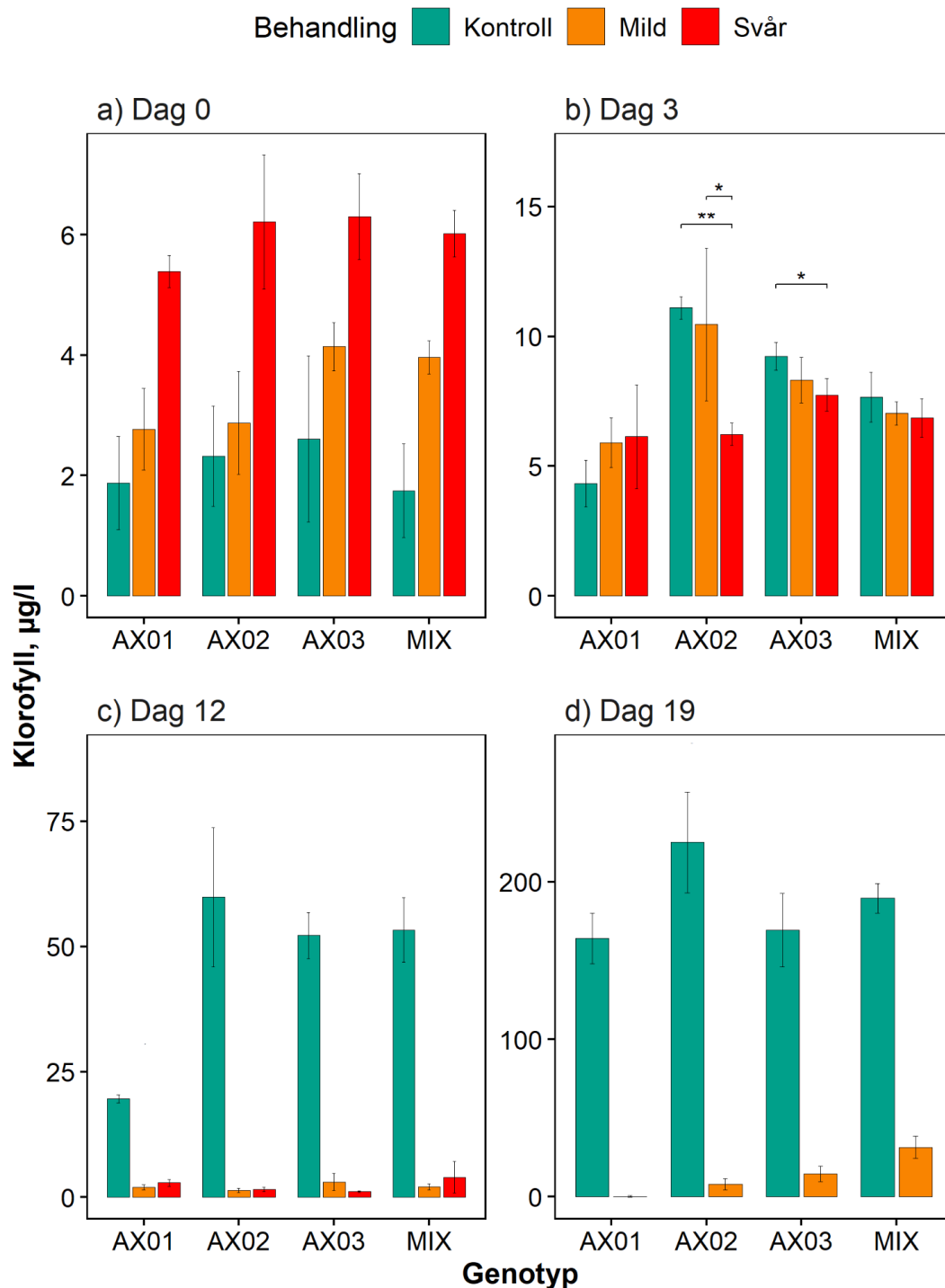
Behandling	Dag	Frihetsgrad täljare	Frihetsgrad nämnare	Frihetsgrad	p	
Kontroll	Dag 0	3	12	0,665	0,59	
Mild	Dag 0	3	12	5,74	0,011	*
Svår	Dag 0	3	12	1,36	0,301	
Kontroll	Dag 3	3	12	60,2	1,67E-07	****
Mild	Dag 3	3	12	5,78	0,011	*
Svår	Dag 3	3	12	1,70	0,219	
Kontroll	Dag 12	3	12	20,4	5,29E-05	****
Mild	Dag 12	3	12	2,15	0,147	
Svår	Dag 12	3	12	2,55	0,104	
Kontroll	Dag 19	3	12	6,40	0,008	**
Mild	Dag 19	3	12	33,1	4,41E-06	****
Svår	Dag 19	-	-	-	-	

Tabell 10. ANOVA-resultat på huvudeffekten av behandling på klorofyll för de dagarna som en tvåvägsinteraktion mellan genotyp och behandling kunde observeras. Signifikanta skillnader är markerade; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Bonferronikorrigerat.

Genotyp	Dag	Frihetsgrad täljare	Frihetsgrad nämnare	Frihetsgrad	p	
AX01	Dag 3	2	9	2,052	0,184	
AX02	Dag 3	2	9	9,285	0,006	**
AX03	Dag 3	2	9	4,591	0,0420	*
MIX	Dag 3	2	9	1,290	0,322	
AX01	Dag 12	2	9	854,738	5,44E-11	****
AX02	Dag 12	2	9	70,611	3,15E-06	****
AX03	Dag 12	2	9	413,349	1,40E-09	****
MIX	Dag 12	2	9	194,831	3,90E-08	****
AX01	Dag 19	1	6	413,507	9,19E-07	****
AX02	Dag 19	1	6	181,342	1,04E-05	****
AX03	Dag 19	1	6	168,191	1,29E-05	****
MIX	Dag 19	1	6	735,793	1,66E-07	****



Figur 10. Stapeldiagram över skillnader i klorofyll *a* ($\mu\text{g/l}$) hos olika genotyper inom samma behandlingar under a) dag 0, b) dag 3, c) dag 12 och d) dag 19 av experimentet, medeltal \pm standardavvikelse. Signifikanta skillnader är markerade med färgade klamrar för att indikera inom vilken behandling skillnaden kunde ses; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Bonferronikorrigerat. Notera skillnader i skalorna. Svåra behandlingens provtagning dag 19 uteblev, och är därmed inte visualiserad i figuren.



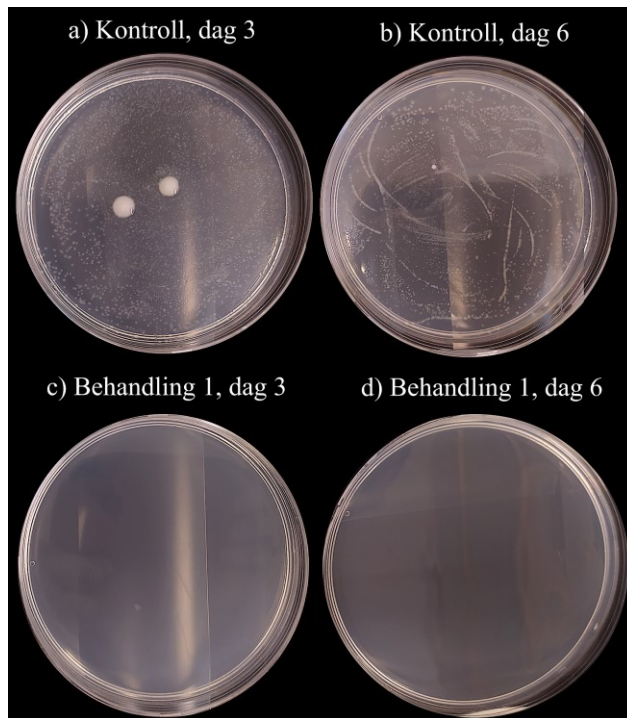
Figur 11. Stapeldiagram över skillnader i klorofyll *a* ($\mu\text{g/l}$) mellan olika behandlingar hos samma genotyp under a) dag 0, b) dag 3, c) dag 12 och d) dag 19 av experimentet, medeltal \pm standardavvikelse. Signifikanta skillnader är markerade med klamrar för graferna var det är oklart om en signifikant skillnad förekom; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. I graferna b–d är inga klamrar utsatta för att undvika omätligt antal klamrar; kontrollerna skiljde sig signifikant från båda antibiotikabehandlingarna hos varje genotyp; $p < 0,001$. Bonferronikorrigerat. Notera skillnader i skalorna. Svåra behandlingens provtagning dag 19 uteblev, och är därmed inte visualiserad i figur d. Eftersom det inte fanns en signifikant tvåvägsinteraktion mellan genotyp och behandling dag 0 (se Tabell 8), är signifikanta skillnader från t-testet inte utmärkta i graf a.

3.4 Pilottest

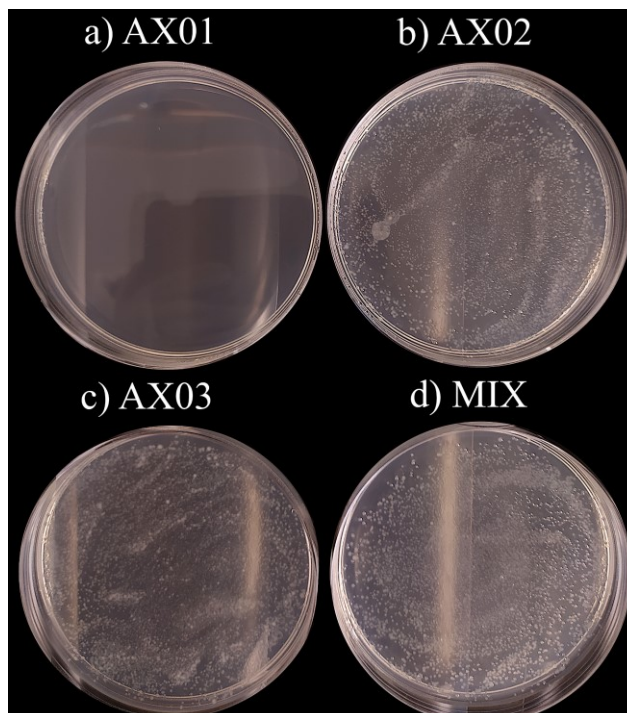
I första piloten var mängden och sammansättningen av bakterierna i algkulturerna följdes upp visuellt, växte inga bakterier på agarplattorna med stressbehandling med tillsatt antibiotika. Kolonitillväxt saknades till och med på agarplattorna med lägsta koncentrationsnivån av antibiotika (behandling 1, se Tabell 2). På agarplattorna med klonala stammen AX01 växte inga bakteriekolonier, inte ens i kontrollen utan antibiotika, varken på agarplattorna från tredje eller sjätte dagen av piloten. På agarplattorna med MIX-kultur utan antibiotika växte däremot bakteriekolonier både dag 3 och 6 (Figur 12). Åtminstone tre morfologiskt olika kolonityper kunde urskiljas efter ytlig inspektion. Alla kolonier var vita, men varierade i storlek och nyans. Två av kolonityperna var av mindre storlek, och en av kolonityperna var avsevärt större.

Då alla kulturtyper utan tillsatt antibiotika spreds på agar, förekom bakteriekolonier på tre av fyra kulturtyperna. På agarplattan med klonala stammen AX01 växte inga bakteriekolonier så som i tidigare piloten, medan agarplattorna med AX02, AX03 och MIX hade riklig kolonitillväxt (Figur 13).

Under första piloten var cellkoncentrationen hos *S. marinoi* avsevärt lägre i stressbehandlingarna i jämförelse med kontrollbehandlingen. Cellkoncentrationerna blev lägre med starkare antibiotikakoncentrationer i behandlingarna (Figur I, bilaga). I andra piloten var tillväxten i behandling 2 avsevärt lägre än i kontrollbehandlingen (Figur II, bilaga). I båda piloterna var cellkoncentrationerna i allmänhet lägre i AX01 i jämförelse med MIX. I preliminära test var lämplig metodik för semikontinuerlig upprätthållning av *S. marinoi*-kulturer testades, var cellkoncentrationerna lägst hos AX01 (Figur III, bilaga). I dessa preliminära test var cellkoncentrationerna högst i AX02 och MIX.



Figur 12. Kolonitillväxt på R2A agar med 100 μ l algkultur från första piloten. Agarplattorna i figuren hade kultur av *S. marinoi* bestående av en blandning av genotyperna (MIX) i en utspädning 1:10 (a–b) och 1:1 (c–d). Kultur ur; a) kontroll, dag 3; b) kontroll, dag 6; c) behandling 1, dag 3; d) behandling 1, dag 6 av piloten. Se Tabell 2 för en utredning av behandling 1. Bilderna tagna tretton (a, c) och tio (b, d) dagar efter inkubering. Motsvarande agarplattor från piloten med AX01 hade ingen kolonitillväxt.



Figur 13. Kolonitillväxt på R2A agar med 100 μ l utspädd algkultur från klonala kulturerna (a–c) och från kulturen bestående av en blandning av genotyperna (MIX) (d). Bilderna tagna sju dagar efter inkubering.

4 Diskussion

Målsättningarna för denna studie var att 1) undersöka om tillväxtparametrar hos *S. marinoi* påverkas av att det associerade bakteriesamhälle rubbas, och 2) undersöka rollen av algens genetiska diversitet utan, under och efter den (eventuellt) orsakade stressen. Dessutom var avsikten att 3) undersöka ifall de olika genotypernas tillväxtförmåga skiljer sig signifikant ifrån varandra.

Denna studie påvisar att en kombination av antibiotika har en drastisk negativ effekt på tillväxtparametrar hos *S. marinoi*, och att den negativa effekten kan ses redan efter några dagars exponering (Figur 7, Figur 9, Figur 11). Studien påvisar också att kulturer av *S. marinoi* med genetisk diversitet återhämtar sig bättre än kulturer utan genetisk diversitet beträffande halten av klorofyll *a* (Figur 10d) och koncentrationen av celler (Figur 7b). Dessutom påvisar studien att olika genotypers tillväxt varierar hos *S. marinoi*, åtminstone utan en exponering till antibiotikastress (Figur 7, Figur 8, Figur 10).

4.1 Effekten av antibiotika på tillväxt hos *S. marinoi*

Denna studie påvisar att carbenicillin, cephalexin, kanamycin, rifampicin och streptomycin i en kombination påverkar tillväxten av *S. marinoi* negativt, och att effekten är större med högre antibiotikakoncentrationer. Den negativa effekten är uppenbar vid jämförelse av tillväxtkurvorna i de olika behandlingarna (Figur 7; Figur IV, bilaga). Den negativa påverkan kan ses redan efter några dagars exponering. I halten av klorofyll *a* observerades en signifikant skillnad mellan kontrollbehandlingen och båda stressbehandlingarna hos alla kulturtyper experimentets två sista provtagningsdagar av klorofyll *a*; 12 och 19. Hos genotyperna AX02 och AX03 sågs den negativa effekten av stressbehandlingarna på halten av klorofyll *a* redan dag 3 (Figur 11b). Den statistiska modellen för tillväxthastigheten r antydde att tillväxthastigheten i båda stressbehandlingarna mellan dagarna 3–6, 6–9 och 9–12 var signifikant lägre i jämförelse med kontrollbehandlingen. Däremot var den beräknade

tillväxthastigheten r högre i den milda behandlingen än i kontrollbehandlingen för alla kulturer mellan dagarna 0–3, och för alla kulturer förutom AX01 mellan dagarna 12–19 (Figur 9). Möjliga orsaken till dessa avvikande resultat för dagarna 0–3 och 12–19 diskuteras i del 4.4 Utvecklingsförslag och metodernas begränsningar.

4.1.1 Antibiotikas negativa effekt - direkt eller indirekt?

Den negativa inverkan på *S. marinoi* kan ha orsakats direkt av antibiotika eller indirekt genom en rubbning av det associerade bakteriesamhället. Inför denna studie formades antibiotikabehandlingar med avsikten att rubba bakteriesamhället i *S. marinoi* kulturerna, vilket indirekt kunde påverka algens tillväxtparametrar. Stressbehandlingarnas direkta effekt på bakteriesamhället i algkulturerna prövades kort med pilottest, var det framkom att använda antibiotika verkligen hade en avsevärd negativ effekt på bakterieförekomsten. Detta kunde bekräftas i och med att agarplattor med antibiotikabehandlad algkultur saknade kolonitillväxt, medan agarplattor med kultur utan antibiotika hade riklig kolonitillväxt (Figur 12, Figur 13). Trots att antibiotika är utvecklat för att verka mot bakterier, och en direkt effekt på bakterieförekomsten bekräftades med pilottest, kan man inte utesluta möjligheten att använd antibiotika kunde ha haft en direkt negativ inverkan på *S. marinoi*. Således kan man inte direkt dra slutsatsen att det var en rubbning av det associerade bakteriesamhället som gav upphov till algernas nedsatta tillväxt.

Penicillin har bevisats ha en indirekt negativ effekt på olika kiselalger genom att negativt påverka det omgivande bakteriesamhället, medan kloramfenikol är känt för att ha en direkt negativ effekt på kiselalger genom cellulära mekanismer (D'Costa och Anil, 2012). Streptomycin som användes i min studie binder till ribosomala mindre subenheten 30S hos bakterier (Pepper och Gerba, 2015), men kan potentiellt störa proteinsyntesen också i kiselalgernas organeller (70S) (Cullen och Lesser, 1991). D'Costa och Anil (2012) observerade dock i sin studie att en tillsättning av streptomycin inte hade någon direkt eller indirekt negativ effekt på ett naturligt kiselalgssamhälle med flera kiselalger. Rifampicinet som användes i min studie gav vätskan i algkulturerna också en rödaktig färg (Figur V, bilaga). Färgändringen kunde potentiellt haft en direkt negativ inverkan på algerna i och med att ljusets våglängd

påverkar tillväxtförmågan hos växtplankton (Das *et al.*, 2011). Det vill säga att det är möjligt att antibiotika i stressbehandlingarna i min studie till en viss mån hade en direkt effekt på algernas tillväxt genom cellulära eller andra mekanismer.

Däremot är förhållanden mellan växtplankton och bakterier som gynnar båda parternas tillväxt vanligt förekommande (Seymour *et al.*, 2017), speciellt hos kiselalger (Jauffrais *et al.*, 2017). Bland annat B₁₂ som produceras av bakterier korrelerar med kiselalgernas tillväxt (Haines och Guillard, 1974). I en studie med 326 arter av växtplankton var det över hälften som var beroende av B₁₂, trots att de inte producerar vitaminet själv (Croft *et al.*, 2005). En del bakterier har även en central roll i algernas upptagning av B₁, B₇ (Tang, Koch och Gobler, 2010) och järn (Amin *et al.*, 2009). Därför kan vissa bakterier vara fördelaktiga, eller kanske till och med nödvändiga för kiselalger. Behringer *et al.* (2018) bevisade att bakterier kan ha negativa, men även många positiva effekter på kiselalgers tillväxt. Specifikt för *S. marinoi* (tidigare *costatum*) har det observerats att inkubering med en liten volym havsvatten innehållande ett naturligt bakteriesamhälle resulterar i signifikant högre cellkoncentrationer än i axeniska kulturer med steril tillväxtmedium (Grossart *et al.*, 2005). För *S. marinoi* har det också observerats att en tillsättning av hög koncentration av vissa bakterier härstammande ur algens associerade bakteriesamhälle ger en tillväxtfrämjande effekt (Johansson *et al.*, 2019). Dessutom har det visat sig vara ytterst svårt att odla fram axeniska kulturer av *S. marinoi*, då antibiotika leder till att algkulturen dör fullständigt eller att algkulturen fortfarande har förekomst av bakterier (Grossart *et al.*, 2005; Johansson *et al.*, 2019). Tillväxtfrämjande effekt av bakterier har också observerats hos vissa grönalger (Chevanton *et al.*, 2013). Dessa studiers resultat stödjer antagandet om att kiselalger, och specifikt *S. marinoi*, har bakterier i sin fykosfär som är viktiga, eller till och med avgörande för algernas överlevnad. Således är det sannolikt att den negativa effekten av antibiotika på tillväxten hos *S. marinoi* i min studie åtminstone delvis berodde på en indirekt bakteriemedlad effekt.

Det går inte med säkerhet att säga om antibiotikas effekt i min studie var direkt, indirekt eller en kombination av båda. Tidigare studier (ovan) skulle dock stöda uppfattningen om att den negativa effekten som observerades i experimentet främst var en indirekt följd av rubbningen av det associerade bakteriesamhället hos *S. marinoi*, men att även en direkt effekt av antibiotika kan ha förekommit. För rollen av

den genetiska diversiteten hos *S. marinoi* under och efter stress (som diskuteras i nästa del) är det dock av mindre betydelse om den negativa effekten orsakades direkt eller indirekt.

Att *S. marinoi* med stor sannolikhet har ett associerat bakteriesamhälle med en central roll för artens tillväxtdynamik, innebär implikationer för hela Östersjön. I och med att *S. marinoi* har en så central roll i den produktiva vårblomningen i Östersjön (Jochem, 1989), ger detta ekosystemets bakteriesamhälle en helt ny relevans. Bakterier har redan i sig en betydande roll i biogeokemiska cykler i marina system, men indirekta effekter på växtplanktonsamhället utvidgar gruppens betydande roll. Intresset om bakteriers betydelse för växtplankton har under det senaste årtiondet ökat, men knappt inga studier har undersökt interaktioner mellan växtplankton och andra marina mikroorganismer. I och med att bakterier spelar en betydande roll för flera växtplankton, är det fullkomligt möjligt att intima interaktioner förekommer också mellan växtplankton och andra mikroorganismer så som svampar och virus.

4.2 Betydelsen av genetisk diversitet

4.2.1 Under och efter stress

Algkulturerna med genetisk diversitet (MIX) hade signifikant högre cellkoncentrationer (Figur 7) och halter av klorofyll *a* (Figur 10d) under experimentets sista dag i jämförelse med alla tre klonala stammarna i den milda stressbehandlingen. Detta antyder att genetisk diversitet är till fördel under återhämtning ur antibiotikastress. En tidigare experimentell studie med *S. marinoi* har påvisat likartade resultat med flera viktiga cellulära parametrar under stress orsakad av nedsatt salinitet (Sjöqvist och Kremp, 2016). I studien av Sjöqvist och Kremp (2016) buffrade genetisk diversitet den negativa effekten på algens primärproduktion orsakad av lägre salinitet. Halten partikulärt organiska ämnen och upptagningen av kol var också signifikant högre i kulturer med högre genetisk diversitet i jämförelse med klonala kulturer under nedsatt salinitet. I studien observerades en buffrande effekt redan då algerna utsattes för stress, till skillnad från min studie var genetiska diversiteten upptäcktes ha

betydelse först under återhämtningen ur stress. Wolf et al. (2019) observerade att redan en låg genetisk diversitet buffrar mot förändringar i produktivitet orsakade av förhöjd temperatur och förhöjd halt av pCO₂ hos kiselalgen *Thalassiosira hyalina*. En buffrande effekt av genetisk diversitet har även observerats hos dinoflagellaten *Alexandrium fundyense* då man mätt den negativa effekten av betning av en heterotrof dinoflagellat (John et al., 2015). Flera studiers resultat stämmer alltså överens med resultaten i min studie, som tyder på att den genetiska diversiteten spelar stor roll för kiselalger vid stress.

Den statistiska modellen för tillväxthastighet r antydde inte att kulturerna med genetisk diversitet skulle ha haft signifikant bättre eller sämre tillväxthastigheter än de tre klonala stammarna. Detta stämmer överens med resultat ur studien av Sjöqvist och Kremp (2016), var genetisk diversiteten hade en positiv effekt på andra cellulära parametrar under nedsatt salinitet, men inte på tillväxthastigheten. Det är dock värt att notera att i båda stressbehandlingarna i min studie var tillväxthastighetens medeltal högst i MIX-kulturerna under experimentets slut mellan dagarna 12–19 (Figur 8e). Ingen statistisk signifikans upptäcktes med den statistiska modellen eftersom variationen av de fyra replikaten i båda stressbehandlingarna var relativt stor. Endast en kulturflaska av de totala 16 kulturflaskorna i experimentets svåra stressbehandling gjorde märkbar återhämtning från behandlingen; ett av MIX-replikaten. Medan den procentuella ökningen i cellkoncentration mellan dagarna 12–19 i de övriga MIX-replikaten var under 1 000 %, hade den avvikande MIX-kulturen en procentuell ökning på cirka 430 000 % (Figur 7c). Det kan handla om en ren slump att den enda kulturen som påvisade avsevärd återhämtning från svåra stressbehandlingen dag 19 var en kultur med genetisk diversitet, men detta behöver inte nödvändigtvis vara fallet. Utifrån ett undantag kan man dock inte dra den definitiva slutsatsen att det var den genetiska diversiteten som spelade en avgörande roll för denna avvikande kultur i svåra stressbehandlingen. För den milda stressbehandlingen kan man dock med större säkerhet påstå att det var ökningen i den genetiska diversiteten som var avgörande för bättre återhämtning.

Eftersom cellkoncentrationerna var väldigt låga i alla kulturtyper mellan dagarna 3–12 i båda stressbehandlingarna (Figur 7b–c), är det svårt att med säkerhet säga att den

genetiska diversiteten inte spelade någon roll under dessa dagar. Detta trots att de statistiska modellerna inte upptäckte skillnader i klorofyll *a* eller tillväxthastighet *r*.

4.2.2 Utan stress

I denna studies kontrollbehandling sågs ingen signifikant skillnad mellan MIX-kulturerna med genetisk diversitet och de tre klonala stammarna beträffande halten av klorofyll *a* eller tillväxthastighet. På samma sätt upptäckte inte heller Sjöqvist och Kremp (2016) att genetiska diversiteten skulle ha haft en effekt på tillväxthastigheten hos *S. marinoi* då stressfaktorer var exkluderade. I studien av Wolf et al. (2019) observerades inte heller att kulturer av kiselalgen *Thalassiosira hyalina* med genetisk diversitet skulle ha klarat sig bättre än enskilda klonala stammar utan exponering till stress. I studien av John et. al (2015) fanns det likaså inga skillnader i tillväxthastighet mellan klonala kulturer och kulturer med genetisk diversitet hos dinoflagellaten *Alexandrium fundyense* utan utsättning för betning. Däremot observerade Roger et al. (2012) i sin experimentella studie en positiv effekt på tillväxt hos *S. marinoi* av genetisk diversitet utan stress. Också i en äldre studie med grönalgen *Chlamydomonas reinhardtii* hade kulturer med högre genetisk diversitet högre tillväxthastigheter, trots att ingen stress närvarade (Bell, 1991). Således finns det motstridiga resultat om genetiska diversitetens roll hos kiselalger och växtplankton då de inte utsätts för någon stressfaktor. Detta tyder på att mekanismerna om intraspecifik konkurrens hos kiselalger och växtplankton är dåligt förstådda, och varierar i stor omfattning.

Man bör dock lägga märke till att i studien av Roger et al. (2012) bibehölls inte den genetiska diversiteten tills slutet av experimenten, utan ett fåtal av stammarna i kulturerna tog över genom konkurrens. Det är även möjligt att detta också skedde i studien av Bell (1991). En tidigare studie har bevisat att stammar av *S. marinoi* med tidig ankomst under succession verkligen har en intraspecifik konkurrensfördel (Sefbom et al., 2015). Det vill säga att stammar som etablerar sig fortare får högre relativ abundans i jämförelse med stammar med senare ankomst. Detta kan leda till att kulturer med hög genetisk diversitet till slut övergår till kulturer dominerade av endast av ett fåtal genotyper, så som det skedde i studien av Roger et al. (2012). I studien av Sjöqvist och Kremp (2016) kunde man dock bekräfta att den genetiska diversiteten

bibehölls under experimentet. I min studie undersöktes inte denna aspekt. Studien av Roger et al. (2012) skiljer sig alltså på ett betydelsefullt sätt från studien av Sjöqvist och Kremp (2016), vilket kunde vara en möjlig orsak till motstridiga resultaten om rollen av den genetiska diversiteten utan utsättning för stress. För studien av Bell (1991) är det relevant att ta i beaktande att modellorganismen inte var en kiselalg som i resten av studierna diskuterades i detta avsnitt.

I och med att genetisk diversitet i min studie representerades av kulturer med endast tre olika genotyper, är det också möjligt att den genetiska diversiteten i experimentet inte räckte för att ordentligt demonstrera den positiva effekten då kulturerna inte utsattes för stress. Den verkliga effekten av genetisk diversitet i naturliga förhållanden kunde möjligen vara starkare än vad min studie antyder, då *S. marinoi* i Östersjön påvisar exceptionellt hög genetisk diversitet (Sjöqvist *et al.*, 2015; Sassenhagen *et al.*, 2021). Med hjälp av modellering har man kunnat uppskatta att *S. marinoi* populationen i Östersjön kan bestå av närmare 200 000 olika genotyper (Sassenhagen *et al.*, 2021). Wolf et al. (2019) inkluderade i sin studie sex olika klonala stammar i kulturerna som representerade genetisk diversitet, och Sjöqvist et al. (2016) inkluderade som bäst 20 olika stammar i sin studie. Trots att båda av dessa studier inkluderade flera genotyper i de genetiskt diversa kulturerna, fann de inte att dessa kulturer skulle ha presterat bättre än de klonala kulturerna (då kulturerna inte utsattes för stress). Den realistiska effekten av genetisk diversitet i naturliga förhållanden kan vara mycket svår att demonstrera, då det är praktiskt omöjligt att inkludera flera hundratusentals genotyper i en och samma kultur. Utveckling av alternativ till empiriska studier genom modellering kunde erbjuda en lösning på denna problematik.

Att genetisk diversitet verkligen spelar en så viktig roll för växtplankton under olika typers stress, tyder på att mer forskning behövs för att utreda omfattningen av den genetiska diversiteten som råder bland växtplankton i marina ekosystem. På detta vis kunde man få en uppfattning om vad den egentliga kapaciteten för anpassning till miljöförändringar verkligen är hos växtplankton. Eftersom den genetiska diversiteten har en buffrande effekt hos många växtplankton, kommer graden av den genetiska diversiteten följaktligen att vara en av de avgörande faktorerna vid externa störningar. Kommer den exceptionellt höga genetiska diversiteten hos arter så som *S. marinoi*

(Sassenhagen *et al.*, 2021) att trygga arternas anpassning till miljöförändringarna den pågående klimatförändringen kommer att orsaka?

4.3 Skillnader mellan olika genotyper

Precis som tidigare studier med *S. marinoi* (Roger, Godhe och Gamfeldt, 2012; Sjöqvist *et al.*, 2014; Sjöqvist och Kremp, 2016), andra kiselalger (Wolf *et al.*, 2019; Ajani *et al.*, 2021) och andra växtplankton (John *et al.*, 2015), påvisade även min studie att olika genotyper kan ha olika fenotypiska skillnader vad det gäller tillväxt och andra viktiga cellulära parametrar. Genotypen AX01 presterade konsekvent sämre under flera tidpunkter av experimentet; både i koncentrationen av celler, i halten av klorofyll *a* och i tillväxthastigheten *r*. Detta begränsade sig inte till ett scenario, utan AX01 presterade sämre än de andra genotyperna både i kontrollbehandlingen och i milda stressbehandlingen. I Figur 7a kan man se att cellkoncentrationerna hos AX01 i kontrollbehandlingen var betydligt lägre än i de andra kulturerna genom hela experimentet (med undantag av dag 19). I Figur 7b kan man se att AX01 var den enda kulturtypen i milda stressbehandlingen som inte påvisade egentlig återhämtning, inte ens efter en sju dagars återhämtning i kontinuerlig tillväxt dag 19. Enligt den statistiska modellen för tillväxthastigheten *r* hade AX01 signifikant sämre tillväxthastighet än resten av kulturerna mellan dagarna 3–6 och 12–19 i milda stressbehandlingen, och mellan dagarna 3–6 i kontrollen (Figur 8b och e). Enligt den andra statistiska modellen hade AX01 signifikant lägre halter av klorofyll *a* än resten av kulturerna dag 3 och 12, men bara i kontrollbehandlingen (Figur 10b–c). Dessutom hade AX01 lägsta cellkoncentrationerna även i alla pilottest (Figur I–III, bilagor).

Även andra signifikanta skillnader förekom mellan de klonala stammarna; AX02 presterade tidvis bättre än resten av genotyperna i koncentrationen av celler, halten av klorofyll *a* och tillväxthastighet *r*. Enligt statistiska modellen för tillväxthastighet *r* hade AX02 högre tillväxthastighet än de två andra klonala stammarna mellan dagarna 3–6 och 6–9 (Figur 8b–c). Samma mönster kunde ses i statistiska modellen för klorofyll *a*, som antydde att AX02 hade högre halter av klorofyll *a* än resten av kulturerna (inkluderande MIX) dag 3, och högre halter än de två andra klonala

kulturerna dag 19 (Figur 10b och d). AX02 hade även signifikant högre halt av klorofyll *a* än AX01 dag 3 i milda stressbehandlingen (Figur 10b). AX02 hade högre cellkoncentrationer än de andra klonala stammarna även i piloterna var AX02 var inkluderad (Figur III, bilaga). Skillnaderna fanns dock huvudsakligen endast i kontrollbehandlingarna och inte i stressbehandlingarna beträffande AX02.

I andra studier med *S. marinoi* (Sjöqvist och Kremp, 2016), andra kiselalger (Wolf *et al.*, 2019) och andra växtplankton (John *et al.*, 2015) har olika genotypers respons varit signifikant olika från varandra både vid utsättning för stressfaktorer så som nedsatt salinitet, förhöjd temperatur, förhöjd halt av pCO₂ och betning, men även under kontrollförhållanden utan stress. Min studie agerar som ytterligare bevis på att det finns fenotypiska skillnader hos olika genotyper av kiselalger av samma art. Förekomsten av fenotypiska skillnader i tillväxtparametrar hos olika genotyper kommer med stor sannolikhet att ha evolutiva påföljder för olika växtplankton, speciellt vid närvaron av starka selektionstryck.

Förutom att algernas tillväxtparametrar varierade med genotyp, förekom också skillnader i kulturernas bakterieförekomst. Då alla kulturtyper utan tillsatt antibiotika (AX01, AX02, AX03, MIX) spreds på agarplattor, upptäcktes att bakterieförekomsten i kulturen med AX01 avvek drastiskt från resten. Medan kolonitillväxten var riklig på agarplattorna med AX02, AX03 och MIX, saknades kolonitillväxten fullständigt på agarplattan med genotypen AX01 (Figur 13). Kolonitillväxt på R2A agar med kultur av genotypen AX01 saknades båda gångerna kultur spreds på agarplattor i pilottesten. Detta tyder på att observationen var sann och inte beroende av en slump eller ett mänskligt misstag. Efter ytlig visuell granskning av agarplattorna kunde inga andra tydliga skillnader mellan resten av kulturtypernas kolonitillväxt ses.

Eftersom det inte är garanterat att alla bakterier i algkulturerna växer på agar, tyder inte avsaknaden av kolonitillväxt på R2A agar direkt på att AX01 fullständigt saknar ett associerat bakteriesamhälle. Det har nämligen varit känt sedan länge att de flesta marina bakterier som går att räkna med mikroskop inte växer i vanliga tillväxtmedia; på eller i agar (Jannasch och Jones, 1959). Däremot är det uppenbart att bakteriesammansättningen i AX01 var betydligt annorlunda än i resten av kulturerna. Observationen är mycket intressant, då den enda studien som har jämfört det

associerade bakteriesamhället mellan olika stammar av samma art av kiselalg fann inga väsentliga skillnader i bakteriesammansättningen mellan stammarna (Behringer *et al.*, 2018). Intressant är också att AX01 med avsaknad kolonitillväxt på agar var genotypen som presterade betydligt sämre i de mätta tillväxtparametrarna. Kunde dessa två observationer vara kopplade? Kanske AX01 presterade sämre i min studie för att AX01 gick miste om viktiga bakterier i isoleringskedet (Figur 4.3) då de klonala stammarna grundades? Eller kunde bakteriesammansättningen i fykosfären varierar mellan olika klonala stammar hos *S. marinoi*? Observationen lämnar många öppna frågor.

4.4 Utvecklingsförslag och metodernas begränsningar

Experimentella studier har många för- och nackdelar. Med experimentella studier kan man svara på mycket specifika frågeställningar som i många fall inte skulle kunna besvaras med deskriptiva studier. Med ett experimentupplägg har man full kontroll över de omgivande förhållandena, men den ökade kontrollen kommer med ökad chans för både enstaka och systematiska mänskliga misstag. I denna del tar jag upp begränsningar av metoderna använda i min experimentella studie.

4.4.1 Genetisk diversitet

I min studie bekräftades inte att AX01, AX02 och AX03 verkligen var åtskilda genotyper på grund av den höga kostnaden för dylika analyser. Tekniskt sett finns det en chans att någon av genotyperna kunde vara samma, och de upptäckta resultaten i studien inte är beroende på genotyp. Dock är det mycket osannolikt då *S. marinoi*-populationen i Östersjön har uppskattats bestå av närmare 200 000 olika genotyper (Sassenhagen *et al.*, 2021), och de klonala stammarna i min studie grundades ur viloceller härstammande från sedimentsampel från olika lokaler. I en tidigare studie med *S. marinoi* i Östersjön fann man att endast 0,65 % av 154 isolat var av samma genotyp (Godhe och Härnström, 2010). Eftersom det kan ske intraspecifik konkurrens i kulturer med flera genotyper (Sefbom *et al.*, 2015), är det även möjligt att den

genetiska diversiteten inte bibehölls tills slutet av experimentet i denna studie. Det kan hända att starkare genotyper tog över, så som det har skett i en del tidigare studier (Roger, Godhe och Gamfeldt, 2012). Å andra sidan finns det exempel på studier där den genetiska diversiteten bibehölls under experimentella förhållanden (Sjöqvist och Kremp 2016). De andra varierande faktorerna var dock eliminerade, vilket tyder på att det verkligen var den genetiska diversiteten som utgjorde den avgörande fördelen för MIX-kulturena i denna studie.

4.4.2 Semikontinuerlig tillväxt

I experimentet utfördes tillväxten i huvudsak semikontinuerligt istället för kontinuerligt som i många andra studier. Eftersom sammansättningen av det associerade bakteriesamhället hos kiselalger kan naturligt varieras under olika tillväxtfaser (Grossart *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2021), var det bättre att utföra experimentet på ett sätt som minimerade den naturliga variationen i bakteriesammansättningen. Detta var viktigt då den ursprungliga forskningsplanen inkluderade analys av bakteriellt DNA för att jämföra skillnader i bakteriesammansättningen mellan olika tidpunkter i experimentet. Detta bidrog till beslutet att hålla algerna i en och samma tillväxtfas under experimentet. Detta genomfördes genom att hålla algkulturerna i den exponentiella tillväxtfasen med semikontinuerlig tillväxt.

Semikontinuerlig tillväxt kom dock med sina egna oförutsägbara problem, trots test på bra tidsintervall mellan överföringarna och andel överförd volym i ny media (Figur III, bilaga). Stressbehandlingarnas effekt var starkare och räckte längre än förväntat trots piloter som inkluderande den valda antibiotikakombinationen (Figur I– II, bilaga). Större effekt än förväntat ledde till att tillväxthastigheten i de antibiotikabehandlade kulturerna inte var tillräckligt hög dagarna 3–12 för att kompensera för utspädning som skedde vart tredje dag. Mycket låga cellkoncentrationer gjorde det svårt att analysera skillnader mellan kulturtyperna, och dessutom var den använda spektrofotometern inte lämpad för avläsning av låga cellkoncentrationer. Eventuella skillnader under dagarna 3–12 i stressbehandlingarna mellan kulturerna kan därför bero på kast i spektrofotometerens mätningar. Därmed är

det svårt att med säkerhet att säga att den genetiska diversiteten inte hade en effekt under semikontinuerliga delen av återhämtningen (dagarna 3–12) så som de statistiska modellerna antyder. Det är mycket möjligt att genetisk diversitet skulle ha varit till fördel för *S. marinoi* redan under antibiotikastress med mildare behandling. Som det har diskuterat ovan, har andra studier upptäckt fördel av genetisk diversitet hos växtplankton redan under utsättning för stress (John et al., 2015; Sjöqvist och Kremp, 2016; Wolf et al., 2019). I min studie var båda stressbehandlingarnas negativa effekt troligen för stark för att kunna se liknande resultat.

4.4.3 Rollen av det associerade bakteriesamhället

Antibiotikas negativa inverkan på *S. marinoi* i denna studie kunde ha berott på både en direkt och indirekt bakteriemedlad effekt (se del 4.1.1 Antibiotikas negativa effekt - direkt eller indirekt?). Detta betyder att det inte går att dra definitiva slutsatser om rollen av det associerade bakteriesamhället på tillväxtparametrarna hos *S. marinoi* endast utifrån min studie. Antibiotika för experimentet valdes utgående från en tidigare studie med *S. marinoi* ur Östersjön och dess associerade bakteriesamhälle (Johansson *et al.*, 2019). Flera olika antibiotika i stressbehandlingen användes för att få en negativ effekt på så många bakterietyper som möjligt. Det har visat sig att en kombination av antibiotika utgör ett effektivt sätt att påverka bakterier i algkulturer (Jones, Rhodes och Evans, 1973; Myklestad, 1974; Patil och Anil, 2005). En mer fördjupad utredning om olika antibiotikas potentiellt direkta effekter på kiselalger skulle ha krävts för att bättre kunna undersöka rollen av det associerade bakteriesamhället hos *S. marinoi*. Till exempel penicillin kan inte påverka algernas tillväxt genom cellulära mekanismer (D'Costa och Anil, 2012). Ett sätt att utreda om antibiotikan i experimentet hade en direkt effekt på *S. marinoi* skulle vara att se på genexpressionen hos algen vid tillsatts av antibiotika. Den ursprungliga forskningsplanen för denna studie inkluderade en analys av bakteriell 16S för att jämföra bakteriesammansättningen mellan olika tidpunkter, behandlingar och kulturtyper i experimentet. Sådana analyser kunde också ha hjälpt besvara frågan om den negativa effekten av antibiotika berodde på en indirekt bakteriemedlad effekt. Analysen som uteblev kunde också ha förklarat varför en del klonala stammar klarade sig bättre än andra. Det har dock ännu inte bevisats att det skulle förekomma

märkvärdiga skillnader i bakteriesammansättningen mellan olika stammar av en och samma art (Behringer *et al.*, 2018).

Ett annat alternativt sätt som kunde bevisa att den observerade negativa effekten av stressbehandlingarna var bakteriemedlad, är utförande av ett till kompletterande experiment. Bakterier isolerade ur kulturerna av *S. marinoi* kunde sättas till i kulturerna under experimentets återhämtningsfas. Med liknande metodik kunde Johansson *et al.* (2019) bevisa att en del av bakterierna i det associerade bakteriesamhället hos *S. marinoi* verkligen hade en tillväxtfrämjande effekt på algen. Ifall en positiv effekt av tillsatta bakterier observeras i ett ytterligare experiment med antibiotikastress, skulle det bekräfta relevansen av det associerade bakteriesamhället hos *S. marinoi*.

4.4.4 Data och dataanalys

Utgående från fluorescensmätningarna dag 12 såg det ut som att nästan alla kulturer hade dött fullständigt i båda stressbehandlingarna. Dock upptäcktes dag 19, sju dagar senare med blotta ögat förekomst av biomassa i vissa kulturer i den milda stressbehandlingen. Analys av klorofyll *a* och mätning av *in vivo* fluorescens av klorofyll *a* ur prov tagna dag 19 bekräftade att betydlig återhämtning hade skett i en del kulturer i milda stressbehandlingen (Figur 7b, Figur 11d), och dessutom hos ett replikat av MIX i den svåra stressbehandlingen (Figur 7c). Därmed fattades beslutet att inkludera data från dag 19 i denna studie trots ursprungliga planen om ett 12 dagars experiment. Halten av klorofyll *a* i den svåra behandlingen dag 19 analyserades inte eftersom ingen biomassa upptäcktes med blotta ögat med ett undantag. Att återhämtning hade skett endast i en kulturflaska i svåra behandlingen dag 19 bekräftas dock med fluorescensmätningarna av *in vivo*-klorofyll *a* (Figur 7c). Det är inte optimalt att utelämna analys av en del av data, men i detta fall ansågs det motiverat, speciellt då data inkluderades ur en av två stressbehandlingar var biomassa kunde upptäckas. En oplanerad provtagning dag 19 ledde också till att en del förhållanden dagarna 12–19 avvek från resten av experimentet, vilket inte heller är optimalt. Kulturflaskornas position under lamporna randomiserades inte dagligen som dagarna 0–12, och volymen i kulturflaskorna var betydligt lägre än tidigare i experimentet då

den avlägsnade provvolymerna inte kompensades. Dessa aspekter påverkade dock knappast de slutliga resultaten, då ljusmängden under lamporna inte varierade särskilt mycket ($\pm 10 \mu\text{mol fotoner m}^{-2} \text{s}^{-1}$), och för alg-tillväxten är det av mindre betydelse i hur stora volymer kulturerna upprätthålls. Dock är det värt att notera ifall man vill upprepa experimentet.

Eftersom forskningsplanen inte innefattade provtagningar efter dag 12, saknas det dagliga mätningar på biomassa dagarna 12–19. Därför är det omöjligt att veta säkert i vilken tillväxtfas de olika kulturerna befann sig i dag 19. Det är sannolikt att snabbare kulturer nådde stationär fas, medan långsammare kulturer fortfarande växte exponentiellt dag 19. Ifall kulturerna är i olika tillväxtfaser är en jämförelse av tillväxthastighet r missvisande. Detta är högst troligen orsaken till att den statistiska modellen för tillväxthastighet r antydde högre tillväxthastighet mellan dag 12–19 i milda antibiotikabehandlingen än i kontrollen för AX02, AX03 och MIX (Figur 9e). På samma sätt antydde modellen att AX01 hade signifikant högre tillväxthastigheter än resten mellan dag 12–19 i kontrollbehandlingen (Figur 8e), trots att AX01 presterade i allmänhet sämre än resten av kulturerna under resten av experimentet. Kulturerna i milda stressbehandlingen och AX01 i kontrollbehandlingen växte långsammare. De var troligen fortfarande i exponentiell tillväxt dag 19, medan de andra kulturerna redan hade nått stationär tillväxtfas. Detta betyder att tillväxthastigheten r inte var ett optimalt sätt att jämföra kulturernas prestation mellan dagarna 12–19. Formeln för tillväxthastighet r används dessutom för exponentiell tillväxt (Wood *et al.*, 2005). Kulturerna i kontrollbehandlingarna växte exponentiellt under hela experimentet, men det gjorde inte kulturerna i stressbehandlingarna under dagarna 12–19. Eftersom analysen för halten av klorofyll a är på många sätt ett mycket noggrannare mått på algernas fysiologiska tillstånd än den beräknade tillväxthastigheten i denna studie, finns det orsak att sätta huvudvikt på resultaten ur den statistiska modellen med klorofyll a och observationer på cellkoncentrationer.

Det är också värt att notera att data analyserades med en version av ANOVA som är ett parametriskt test, trots att kraven för homogena varianser inte uppfylldes för alla data. Ifall kraven för homogena varianser inte uppfylls, finns en risk för typ I-fel; att man felaktigt finner signifikanta skillnader som inte finns i verkligheten (Patrick, 2009). Varianserna var homogena för hälften av klorofyll a -data, medan kraven

uppfylldes för tre av fem grupper för data med tillväxthastighet r . Eftersom ANOVA F-test är relativt robusta mot heterogena varianser vid jämna gruppstorlekar (Patrick, 2009), användes parametriska ANOVA i alla fall. Eftersom resultaten ur denna studie stämde överens med många tidigare studiers resultat, och det är känt att den använda modellen är relativt robust mot brott mot homogena varianser, är det dock osannolikt att typ I-fel förekom.

5 Slutsatser

Denna studie visar att genetiskt diversa kulturer av *S. marinoi* återhämtar sig betydligt bättre från antibiotikastress än klonala kulturer. Studien påvisar att redan en låg nivå av genetisk diversitet är till fördel vid återhämtning från stress, eftersom de genetiskt diversa kulturerna i studien bestod av en kombination av endast tre genotyper. De olika genotyperna av *S. marinoi* uppvisade också fenotypiska skillnader beträffande olika tillväxtparametrar utan exponering för antibiotikastress. Denna studie bidrar därmed med ytterligare bevis på att olika genotyper av *S. marinoi* har olika fenotyper. En tillsättning av carbenicillin, cephalexin, kanamycin, rifampicin och streptomycin hade en mycket stark negativ effekt på tillväxtparametrarna av *S. marinoi*. Studiens resultat tyder på att den negativa effekten åtminstone delvis berodde på en indirekt effekt orsakad av att det associerade bakteriesamhället rubbades, men detta kunde inte bekräftas med säkerhet.

Genetisk diversitet har redan tidigare bevisats buffra mot en handfull stressfaktorer hos växtplankton, men denna studie bekräftade betydelsen av den genetiska diversiteten vid en utsättning för en till outforskad stresstyp. Eftersom klimatförändringen kommer att innebära många olika stressfaktorer för växtplankton, krävs det mer likartade studier kring både växtplanktons genetiska diversitet, och interaktionerna som möjligen förekommer mellan växtplankton och andra marina mikroorganismer. Detta skulle ge en bättre förståelse för hur växtplanktonsamhällena i Östersjön kommer att klara klimatförändringens påföljder.

6 Tillkännagivande

Ett stort tack till Conny Sjöqvist som fungerade som min handledare under avhandlingsprocessen med dess många vändningar. Bättre handledare får man nog leta efter, det är inte alla som är ens nära på så investerade i sina graduander som du. Tack för att jag aldrig var ensam med mitt arbete, utan att det alltid fanns någon att vända sig till då problemen kändes svåra och jobbiga. Ett stort tack också för att jag aldrig behövde bekymra mig över materialet som gick åt till allt labbarbete.

Jag vill också tacka Teppo Hiltunen på Åbo Universitet som erbjöd chansen att utföra experimenten på Natura, och som stod för en del av materialet som gick åt i labbarbetet. Tack också till hans studenter Elisa, Ida-Marija och Olli i labbet som hjälpte mig med en del praktiska arrangemang, och som dessutom höll mina alger i liv på Natura under covid-lockdown våren 2020. Tack också till Tom Wiklund som höll mina alger vid liv i Biocity under samma tidsperiod. Jag vill också tacka Tom för givande diskussioner om antibiotika och bakterier då jag planerade mina pilottest. Tack till Ronja Lanndér som hjälpte mig under två av de långa experimentdagarna, och Maximilian Gareis som var bland annat med mig och Conny och hämta närmare 100 liter havsvatten med båt från Åbolands skärgård. Tack till Husö biologiska station som fungerade som fältbas då jag grundade mina algkulturer, och ett speciellt tack till Tony Cederberg som hjälpte mig ställa in temperatur- och ljusförhållanden för kulturerna.

Tack också till familj och vänner som har erbjudit stöd under hela processen. Speciellt stort tack till mina studiekompisar från bland annat MM-15 för den bästa studietiden, ni vet vem ni är. Slutligen vill jag tacka Nino som alltid orkade uppmuntra och trösta då allting kändes jobbigt, och då jag tidvis trodde att jag aldrig utexamineras. För att citera en vis kvinna under studiernas slutskede “ni blir alla färdiga, bara ni inte ger upp”.

7 Referenser

- Ajani, P. A., Kahlke, T., Siboni, N., Carney, R., Murray, S. A. & Seymour, J. R. (2018). The microbiome of the cosmopolitan diatom *Leptocylindrus* reveals significant spatial and temporal variability. *Frontiers in microbiology*, 9:2758.
- Ajani, P. A., Petrou, K., Larsson, M. E., Nielsen, D. A., Burke, J. & Murray, S. A. (2021). Phenotypic trait variability as an indication of adaptive capacity in a cosmopolitan marine diatom. *Environmental microbiology*, 23(1):207–223.
- Allendorf, F. W., Hohenlohe, P. A. & Luikart, G. (2010). Genomics and the future of conservation genetics. *Nature reviews. Genetics*, 11(10):697–709.
- Alpermann, T. J., Tillmann, U., Beszteri, B., Cembella, A. D. & John, U. (2010). Phenotypic variation and genotypic diversity in a planktonic population of the toxigenic marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (dinophyceae). *Journal of Phycology*, 46:18–32.
- Amin, S. A., Green, D. H., Hart, M. C., Kupper, F. C., Sunda, W. G. & Carrano, C. J. (2009). Photolysis of iron-siderophore chelates promotes bacterial-algal mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(40):17071–17076.
- Amin, S. A., Parker, M. S. & Armbrust, E. V. (2012). Interactions between diatoms and bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 76(3):667–684.
- Behringer, G., Ochsenkühn, M. A., Fei, C., Fanning, J., Koester, J. A. & Amin, S. A. (2018). Bacterial communities of diatoms display strong conservation across strains and time. *Frontiers in microbiology*, 9:659.
- Bell, G. (1991). The ecology and genetics of fitness in *Chlamydomonas*. IV. The properties of mixtures of genotypes of the same species. *Evolution*, 45(4):1036–1046.
- Bell, W. & Mitchell, R. (1972). Chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products. *The Biological bulletin*, 143(2):265–277.
- Chevanton, M. L., Le Chevanton, M., Garnier, M., Bougaran, G., Schreiber, N., Lukomska, E., Bérard, J.-B., Fouilland, E., Bernard, O. & Cadoret, J.-P. (2013). Screening and selection of growth-promoting bacteria for *Dunaliella* cultures. *Algal Research*, 2(3):212–222.
- Cook-Patton, S. C., McArt, S. H., Parachnowitsch, A. L., Thaler, J. S. & Agrawal, A. A. (2011). A direct comparison of the consequences of plant genotypic and species diversity on communities and ecosystem function. *Ecology*, 92(4):915–923.
- Croft, M. T., Lawrence, A. D., Raux-Deery, E., Warren, M. J. & Smith, A. G. (2005). Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature*, 438(7064):90–93.
- Cullen, J. J. & Lesser, M. P. (1991). Inhibition of photosynthesis by ultraviolet radiation as a function of dose and dosage rate: Results for a marine diatom. *Marine biology*, 111(2):183–190.
- Das, P., Lei, W., Aziz, S. S. & Obbard, J. P. (2011). Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light. *Bioresource technology*, 102(4):3883–3887.
- D’Costa, P. M. & Anil, A. C. (2012). The effect of antibiotics on diatom communities. *Current science*, 102(11):1552–1559.
- Falkowski, P. G. (1994). The role of phytoplankton photosynthesis in global biogeochemical cycles. *Photosynthesis research*, 39(3):235–258.
- Field, C. B., Behrenfeld, M. J., Randerson, J. T. & Falkowski, P. (1998). Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science*, 281(5374):237–240.

- Fouilland, E., Tolosa, I., Bonnet, D., Bouvier, C., Bouvier, T., Bouvy, M., Got, P., Le Floch, E., Mostajir, B., Roques, C., Sempéré, R., Sime-Ngando, T. & Vidussi, F. (2014). Bacterial carbon dependence on freshly produced phytoplankton exudates under different nutrient availability and grazing pressure conditions in coastal marine waters. *FEMS Microbiology Ecology*, 87(3):757–769.
- Gamfeldt, L. & Källström, B. (2007). Increasing intraspecific diversity increases predictability in population survival in the face of perturbations. *Oikos*, 116(4):700–705.
- Godhe, A. & Härnström, K. (2010). Linking the planktonic and benthic habitat: genetic structure of the marine diatom *Skeletonema marinoi*. *Molecular ecology*, 19(20):4478–4490.
- Grossart, H.-P., Levold, F., Allgaier, M., Simon, M. & Brinkhoff, T. (2005). Marine diatom species harbour distinct bacterial communities. *Environmental microbiology*, 7(6):860–873.
- Guillard, R. R. L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. I: Smith WL, Chanley MH (red.). *Culture of marine invertebrate animals*. New York: Plenum press. 29–60.
- Haines, K. C. & Guillard, R. R. L. (1974). Growth of vitamin B12-requiring marine diatoms in mixed laboratory cultures with vitamin B12-producing marine bacteria. *Journal of Phycology*, 10(3):245–252.
- Härnström, K., Ellegaard, M., Andersen, T. J. & Godhe, A. (2011). Hundred years of genetic structure in a sediment revived diatom population. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(10):4252–4257.
- Heiskanen, A.-S. (1998). *Factors governing sedimentation and pelagic nutrient cycles in the northern Baltic Sea*. Helsinki: Finnish Environment Institute.
- HELCOM (2013). Climate change in the Baltic Sea Area: HELCOM thematic assessment in 2013. *Baltic Sea Environment Proceedings No. 137*.
- Iglesias-Rodriguez, M. D., Schofield, O. M., Batley, J., Medlin, L. K. & Hayes, P. K. (2006). Intraspecific genetic diversity in the marine coccolithophore *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae): the use of microsatellite analysis in marine phytoplankton population studies. *Journal of phycology*, 42(3):526–536.
- Jannasch, H. W. & Jones, G. E. (1959). Bacterial populations in sea water as determined by different methods of enumeration. *Limnology and oceanography*, 4(2):128–139.
- Jauffrais, T., Agogue, H., Gemin, M.-P., Beaugeard, L. & Martin-Jézéquel, V. (2017). Effect of bacteria on growth and biochemical composition of two benthic diatoms *Halamphora coffeaeformis* and *Entomoneis paludosa*. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 495:65–74.
- Jochem, F. (1989). Distribution and importance of autotrophic ultraplankton in a boreal inshore area (Kiel Bight, Western Baltic). *Marine ecology progress series*, 53:153–168.
- Johannesson, K. & André, C. (2006). INVITED REVIEW: Life on the margin: genetic isolation and diversity loss in a peripheral marine ecosystem, the Baltic Sea. *Molecular Ecology*, 15(8):2013–2029.
- Johansson, O. N., Pinder, M. I. M., Ohlsson, F., Egardt, J., Töpel, M. & Clarke, A. K. (2019). Friends with benefits: exploring the phycosphere of the marine diatom *Skeletonema marinoi*. *Frontiers in microbiology*, 10:1828.
- John, U., Tillmann, U., Hülskötter, J., Alpermann, T. J., Wohlrab, S. & Van de Waal, D. B. (2015). Intraspecific facilitation by allelochemical mediated grazing protection within a toxigenic dinoflagellate population. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1798):20141268.

- Jones, A. K., Rhodes, M. E. & Evans, S. C. (1973). The use of antibiotics to obtain axenic cultures of algae. *British Phycological Journal*, 8(2):185–196.
- Jones, K. M., Kobayashi, H., Davies, B. W., Taga, M. E. & Walker, G. C. (2007). How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium-Medicago model. *Nature reviews. Microbiology*, 5(8):619–633.
- Kooistra, W. H. C. F., Sarno, D., Balzano, S., Gu, H., Andersen, R. A. & Zingone, A. (2008). Global diversity and biogeography of *Skeletonema* species (bacillariophyta). *Protist*, 159(2):177–193.
- Kremp, A., Oja, J., LeTortorec, A. H., Hakanen, P., Tahvanainen, P., Tuimala, J. & Suikkanen, S. (2016). Diverse seed banks favour adaptation of microalgal populations to future climate conditions. *Environmental microbiology*, 18(2):679–691.
- Kywalyanga, M. (2015). Phytoplankton primary production. I: *Regional state of the coast report: Western Indian Ocean*. Nairobi, Kenya: UNEP and WIOMSA. 212-230.
- Laikre, L., Lundmark, C., Jansson, E., Wennerström, L., Edman, M. & Sandström, A. (2016). Lack of recognition of genetic biodiversity: International policy and its implementation in Baltic Sea marine protected areas. *Ambio*, 45(6):661–680.
- Leppäkoski, E., Olenin, S. & Gollasch, S. (2002). The Baltic Sea — A Field Laboratory for Invasion Biology. I: *Invasive Aquatic Species of Europe. Distribution, Impacts and Management*. Dordrecht: Springer. 253–259.
- Lignell, R., Heiskanen, A.-S., Kuosa, H., Gundersen, K., Kuuppo-Leinikki, P., Pajuniemi, R. & Uitto, A. (1993). Fate of a phytoplankton spring bloom: sedimentation and carbon flow in the planktonic food web in the northern Baltic. *Marine ecology progress series*, 94:239–252.
- Liu, Y., Kan, J., Yang, J., Noman, M. A. & Sun, J. (2021). Bacterial community composition and chromophoric dissolved organic matter differs with culture time of *Skeletonema dohrnii*. *Diversity*, 13(4):150.
- Myklestad, S. (1974). Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms. I. Comparison of nine different species in culture. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 15(3):261–274.
- Neumann, T., Eilola, K., Gustafsson, B., Müller-Karulis, B., Kuznetsov, I., Meier, H. E. M. & Savchuk, O. P. (2012). Extremes of temperature, oxygen and blooms in the Baltic Sea in a changing climate. *Ambio*, 41(6):574–585.
- Patil, J. S. & Anil, A. C. (2005). Influence of diatom exopolymers and biofilms on metamorphosis in the barnacle *Balanus amphitrite*. *Marine Ecology Progress Series*, 301:231–245.
- Patrick, J. D. (2009). *Simulations to analyze type I error and power in the ANOVA F-test and nonparametric alternatives*. University of West Florida.
- Pepper, I. L. & Gerba, C. P. (2015). Chapter 10 - Cultural Methods. I: Pepper, I. L., Gerba, C. P., & Gentry, T. J. (red.) *Environmental Microbiology*. 3. uppl. San Diego: Academic Press. 195–212.
- Pinhassi, J., Sala, M. M., Havskum, H., Peters, F., Guadayol, O., Malits, A. & Marrasé, C. (2004). Changes in bacterioplankton composition under different phytoplankton regimens. *Applied and environmental microbiology*, 70(11):6753–6766.
- Piontek, J., Händel, N., De Bodt, C., Harlay, J., Chou, L. & Engel, A. (2011). The utilization of polysaccharides by heterotrophic bacterioplankton in the Bay of Biscay (North Atlantic Ocean). *Journal of plankton research*, 33(11):1719–1735.
- Reusch, T. B. H., Ehlers, A., Hämmerli, A. & Worm, B. (2005). Ecosystem recovery after climatic extremes enhanced by genotypic diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(8):2826–2831.

- Roger, F., Godhe, A. & Gamfeldt, L. (2012). Genetic diversity and ecosystem functioning in the face of multiple stressors. *PloS one*, 7(9):e45007.
- Salo, T., Reusch, T. B. H. & Boström, C. (2015). Genotype-specific responses to light stress in eelgrass *Zostera marina*, a marine foundation plant. *Marine ecology progress series*, 519:129–140.
- Sassenhagen, I., Erdner, D., Lougheed, B., Richlen, M. & Sjöqvist, C. (2021). Estimating proportion of clones and genotype richness in aquatic microalgae. *Authorea Preprints*.
- Schäfer, H., Abbas, B., Witte, H. & Muyzer, G. (2002). Genetic diversity of ‘satellite’ bacteria present in cultures of marine diatoms. *FEMS microbiology ecology*, 42(1):25–35.
- Sefbom, J., Sassenhagen, I., Rengefors, K. & Godhe, A. (2015). Priority effects in a planktonic bloom-forming marine diatom. *Biology letters*, 11(5), p. 20150184.
- Seymour, J. R., Amin, S. A., Raina, J.-B. & Stocker, R. (2017). Zooming in on the phycosphere: the ecological interface for phytoplankton–bacteria relationships. *Nature Microbiology*, 2:17065.
- Suomen Standardisoimisliitto, SFS. (1993). *Veden A-klorofyllipitoisuuden määrittäminen. Etanoliiuutto. Spektrofotometrinen menetelmä: Standardi SFS 5772*.
- Sjöqvist, C., Delgado, L. F., Alneberg, J. & Andersson, A. F. (2021). Ecologically coherent population structure of uncultivated bacterioplankton. *The ISME journal*, doi:10.1038/s41396-021-00985-z.
- Sjöqvist, C., Godhe, A., Jonsson, P. R., Sundqvist, L. & Kremp, A. (2015). Local adaptation and oceanographic connectivity patterns explain genetic differentiation of a marine diatom across the North Sea-Baltic Sea salinity gradient. *Molecular ecology*, 24(11):2871–2885.
- Sjöqvist, C., Kremp, A., Lindehoff, E., Båmstedt, U., Egardt, J., Gross, S., Jönsson, M., Larsson, H., Pohnert, G., Richter, H., Selander, E. & Godhe, A. (2014). Effects of grazer presence on genetic structure of a phenotypically diverse diatom population. *Microbial ecology*, 67(1):83–95.
- Sjöqvist, C. O. & Kremp, A. (2016). Genetic diversity affects ecological performance and stress response of marine diatom populations. *The ISME journal*, 10:2755–2766.
- Tang, Y. Z., Koch, F. & Gobler, C. J. (2010). Most harmful algal bloom species are vitamin B1 and B12 auxotrophs. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 107(48):20756–20761.
- Treguer, P. & Pondaven, P. (2000). Global change. Silica control of carbon dioxide. *Nature*, 406(6794):358–359.
- Wasmund, N. & Uhlig, S. (2003). Phytoplankton trends in the Baltic Sea. *ICES Journal of Marine Science*, 60(2):177–186.
- Willén, T. (1962). Studies on the phytoplankton of some lakes connected with or recently isolated from the Baltic. *Oikos*, 13:169–199.
- Wolf, K. K. E., Romanelli, E., Rost, B., John, U., Collins, S., Weigand, H. & Hoppe, C. J. M. (2019). Company matters: The presence of other genotypes alters traits and intraspecific selection in an Arctic diatom under climate change. *Global change biology*, 25(9):2869–2884.
- Wood, A. M., Michelle Wood, A., Everroad, R. C. & Wingard, L. M. (2005). Measuring growth rates in microalgal cultures. I: *Algal Culturing Techniques*. New York: Elsevier Academic Press. 269–286.
- Worm, B., Barbier, E. B., Beaumont, N., Duffy, J. E., Folke, C., Halpern, B. S., Jackson, J. B. C., Lotze, H. K., Micheli, F., Palumbi, S. R., Sala, E., Selkoe, K. A., Stachowicz, J. J. & Watson, R. (2006). Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services. *Science*, 314(5800):787–790.

8 Bilagor

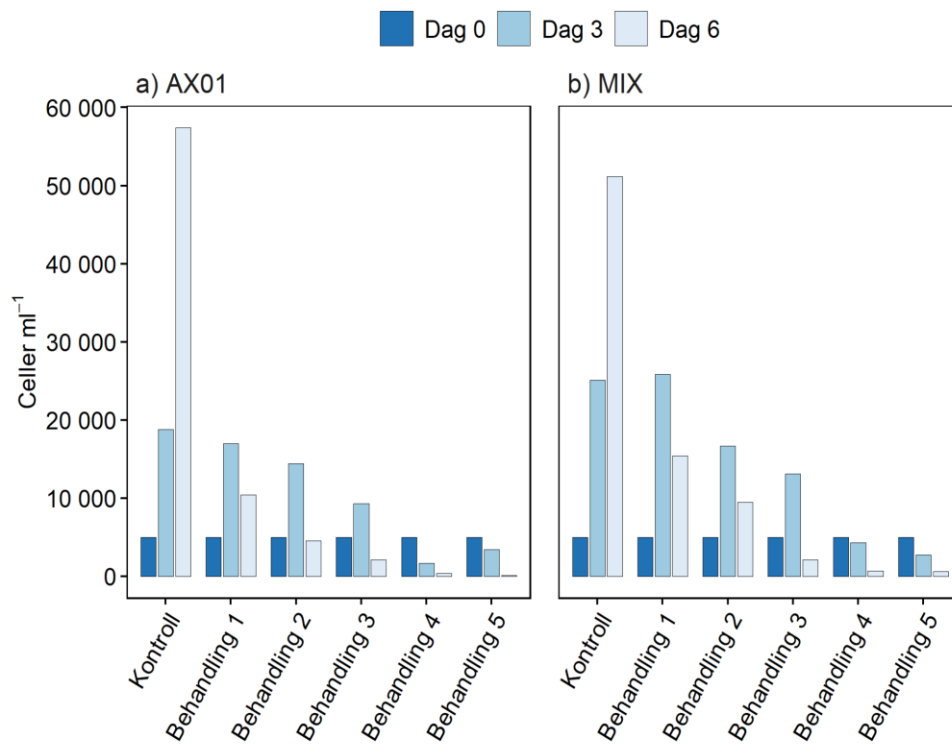
Tabell I. Miljövariabler på provtagningslokalerna. Klorofyll och salinitet mättes 1 m från ytan, syrehalt mättes 1 m från botten. Klorofyll mättes med enligt protokollet SFS (1993), koncentrationen av löst syre analyserades med Winklermetoden, salinitet beräknades utgående från konduktivitet.

Lokal	Klorofyll <i>a</i>	Syre	Salinitet	Djup	Yttemp.	Bottentemp.
Västerfjärden	1,9 µg/l	12,8 mg/l	5,6 ‰	16 m	5,5 °C	5,2 °C
Äppelö	1,3 µg/l	13,3 mg/l	5,5 ‰	30 m	5,6 °C	3,3 °C
Ivaskärsfjärden	4,1 µg/l	12,5 mg/l	4,8 ‰	26 m	7,6 °C	5,9 °C

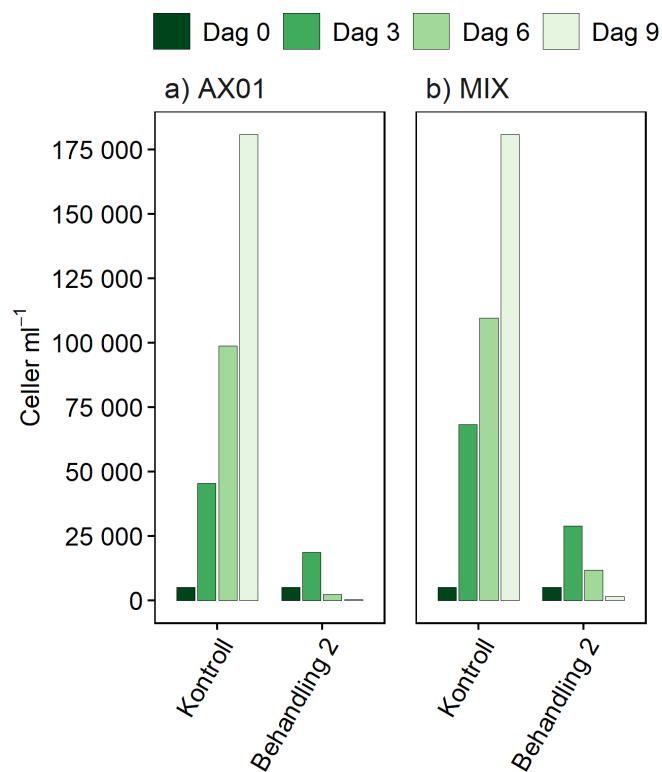
Tabell II. Koncentrationerna av stam- och arbetslösningar av använda antibiotikan.

Antibiotika	Stamlösning	Arbetslösning
Carbenicillin	50 mg/ml	12,5 mg/ml
Kanamycin	50 mg/ml	12,5 mg/ml
Streptomycin	50 mg/ml	12,5 mg/ml
Cephalexin	10 mg/ml	2,5 mg/ml
Rifampicin	1 mg/ml*	0,2 mg/ml**

*1 % DMSO, **0,2 % DMSO



Figur I. Cellkoncentrationen ml^{-1} under första pilottestet i; a) klonala kulturen AX01 och b) kulturen med en blandning av genotyperna (MIX) i de olika behandlingarna. Se Tabell 2 för en utredning av antibiotikakoncentrationerna i behandlingarna.



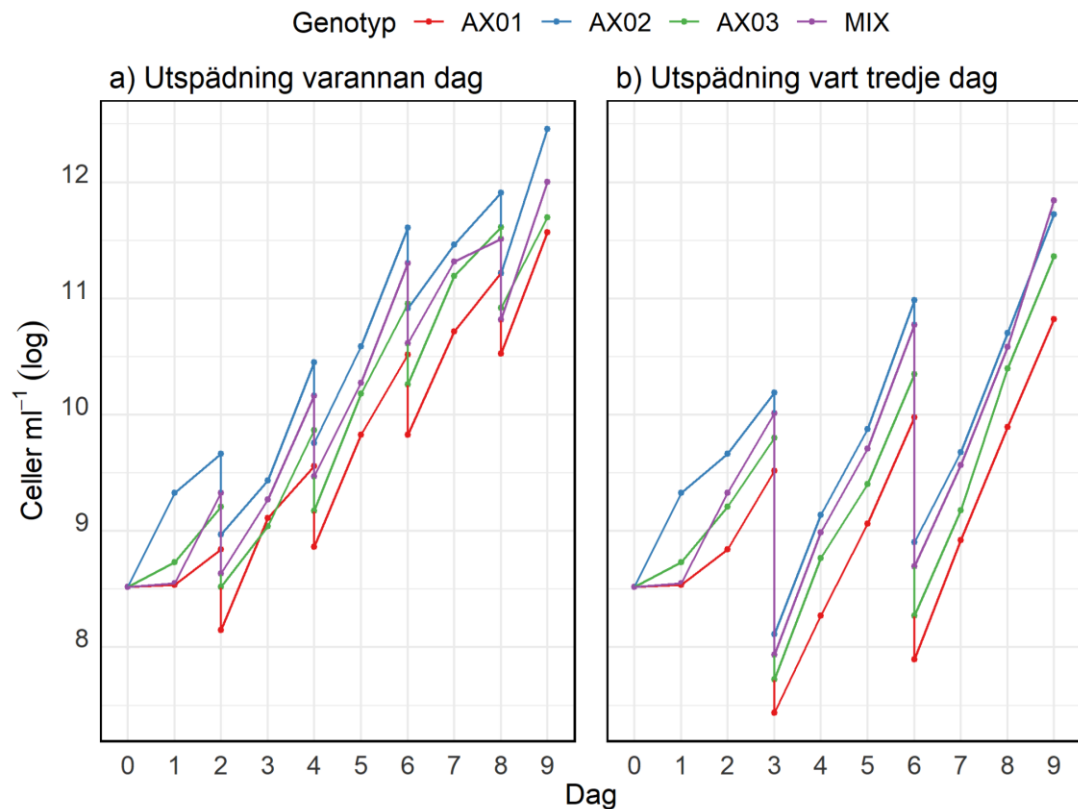
Figur II. Cellkoncentrationen ml^{-1} under andra pilottestet i; a) klonala kulturen AX01 och b) kulturen med en blandning av genotyperna (MIX) under andra pilottestet i kontrollbehandlingen och behandling 2. Se Tabell 2 för en utredning av antibiotikakoncentrationerna i behandling 2.

Tabell III. Milda stressbehandlingens antibiotikakoncentrationer under experimentets lopp.

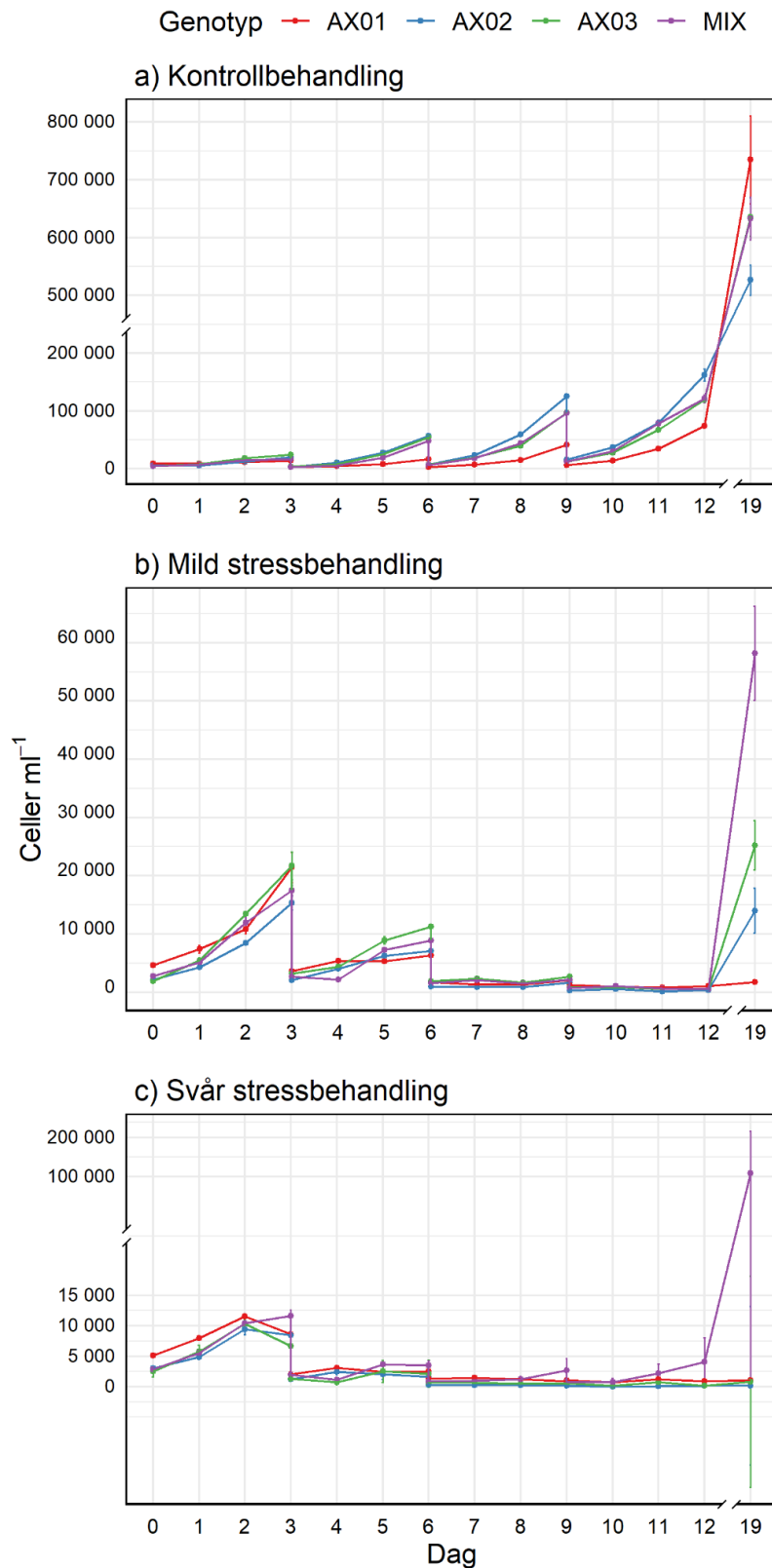
Antibiotika	Dag 0–3	Dag 3–6	Dag 6–9	Dag 9–19
Carbenicillin	25,00 µg/ml	3,13 µg/ml	0,39 µg/ml	0,05 µg/ml
Kanamycin	25,00 µg/ml	3,13 µg/ml	0,39 µg/ml	0,05 µg/ml
Streptomycin	25,00 µg/ml	3,13 µg/ml	0,39 µg/ml	0,05 µg/ml
Cephalexin	25,00 µg/ml	3,13 µg/ml	0,39 µg/ml	0,05 µg/ml
Rifampicin	5,00 µg/ml	0,63 µg/ml	0,08 µg/ml	0,01 µg/ml

Tabell IV. Svåra stressbehandlingens antibiotikakoncentrationer under experimentets lopp.

Antibiotika	Dag 0–3	Dag 3–6	Dag 6–9	Dag 9–19
Carbenicillin	100,00 µg/ml	12,50 µg/ml	1,56 µg/ml	0,20 µg/ml
Kanamycin	100,00 µg/ml	12,50 µg/ml	1,56 µg/ml	0,20 µg/ml
Streptomycin	100,00 µg/ml	12,50 µg/ml	1,56 µg/ml	0,20 µg/ml
Cephalexin	100,00 µg/ml	12,50 µg/ml	1,56 µg/ml	0,20 µg/ml
Rifampicin	25,00 µg/ml	3,13 µg/ml	0,39 µg/ml	0,05 µg/ml



Figur III. Tillväxtdata från preliminära test för att välja lämplig metodik för upprätthållning av *S. marinoi*-kulturer semikontinuerligt. Notera att y-axeln är i logaritmisk skala. Två olika tidsintervall mellan överföringarna med olika andel överförd kulturvolym i ny tillväxtmedia prövades; a) överföring av 20 ml kultur till 20 ml ny tillväxtmedia ($\frac{1}{2}$) varannan dag, och b) överföring av 5 ml kultur till 35 ml ny tillväxtmedia ($\frac{1}{7}$) vart tredje dag. Cellkoncentrationerna är beräknade med hjälp av manuell cellräkning i mikroskop med en Sedgewick-Rafter cellkammare (1 ml). Proven för cellräkning fixerades med alkalisk Lugols lösning (Willén, 1962) innan räkning. Startkoncentrationen dag 0 förbereddes till 5000 celler ml^{-1} .



Figur IV. Cellkoncentrationer under experimentet i a) kontrollbehandlingen, b) milda stressbehandlingen, och c) svåra stressbehandlingen, y-axeln i normal skala. Medeltal av biologiska replikat ($n = 4$) \pm standardavvikelse. Notera skillnaderna i skalorna på y-axeln, och att det förekommer avbrott i skalorna på båda axlarna. Cellkoncentrationerna är omvandlade från *in vivo* fluorescens av klorofyll *a*, mätt med spektrofotometer.



Figur V. Kulturflaskor i klimarummet dag 1 av experimentet. Ur bilden framkommer den röda nyansen som rifampicinet orsakade i milda och svåra stressbehandlingens kulturer. Svåra stressbehandlingens kulturer hade röd-orange nyans, milda behandlingens kulturer hade en svagare orange-gul nyans, medan kontrollbehandlingens kulturer var genomskinliga utan färg. Färgen i stressbehandlingarna blev svagare under experimentets gång i och med överföring av $\frac{1}{8}$ kultur i ny tillväxtmedia vart tredje dag. Mot experimentets slut gick det knappt att urskilja färgskillnader mellan behandlingarna. Första, tredje och åttonde kulturflaskan i första raden är kulturer med svår stressbehandling; andra, fjärde och sjunde kulturflaskan är kulturer med kontrollbehandling; femte och sjätte kulturflaskan är kulturer med mild stressbehandling. Volymen avviker i tredje och sjätte kulturflaskan eftersom de användes i spektrofotometerens blankkorrigering, hade ingen tillsats av *S. marinoi*, och därmed ingen avlägsnad volym från provtagning.