

Effekten av molekylär stimulering på livscykeln och tillväxten hos växtplankton



Pro gradu-avhandling 30 sp.

Anna Ikonen

Åbo Akademi

Fakultet för naturvetenskaper och teknik

Miljö- och marinbiologi

Våren 2022

Handledare: Conny Sjöqvist

Abstrakt

Växtplankton fungerar som grund till de flesta marina näringsvävar. I ogynnsamma miljöförhållanden kan vissa växtplanktonarter bilda så kallade vilostadier vilka sedimenteras och kan hållas levande i flera tusentals år. Dessa vilostadier vaknar upp när miljöförhållandena är gynnsamma för blomning och tillväxt. Genom att återuppväcka vilostadier av till exempel kiselalger kan man undersöka fenotyper av organismer från en tidsperiod som är längre än medellivslängden av en människa. Också dessa återuppväckta vilostadiers förmåga att tåla framtidens miljöförhållanden har undersökts. I den här gradun undersöks ifall melatonin kunde användas för att öka återuppväckningsraten av vilostadier samt ifall man med melatonin kunde få levande celler att återgå till vilostadiet. Också den potentiella effekten som melatonin kunde ha på tillväxtraten av levande celler undersöktes. Experimenten gjordes på kiselalger, mestadels *Skeletonema marinoi*, som någondera återuppväcktes direkt från sediment eller fanns färdigt som en levande kultur. I experimenten användes melatonin i olika koncentrationer samt en kontrollbehandling per experiment. Resultaten visade att melatonin inte inverkar på återuppväckningen av vilostadier. Enligt resultaten inverkar melatonin på tillväxtraten av vegetativa celler. Melatoninkoncentrationerna som använts hade en negativ effekt på tillväxtraten. Resultaten visade att melatonin ökade mängden av bildade nya vilostadier. Enligt ny kunskap som tagits fram med hjälp av dessa experiment skulle jag rekommendera användning av melatonin för att bilda nya vilostadier, men inte för återuppväckning av vilostadier eller för att försöka öka tillväxten av vegetativa celler. Dessa resultat är viktiga för den pågående forskning som handlar om att jämföra populationer och växtplanktonsamhällen från olika tidsperioder med hjälp av vilostadier från sedimentkärnor. Genom att undersöka hur återuppväckta kiselalger och andra växtplankton tål miljöförhållandena som förväntas i framtiden kan man få en bättre förståelse om hur Östersjöns växtplanktonsamhälle kan se ut till exempel år 2100.

Nyckelord: växtplankton, melatonin, återuppväckning, vilostadier, kiselalger, *Skeletonema marinoi*

Abstract

Phytoplankton are single-celled organisms that are essential for the function of the marine food webs for example because they produce about half of all the oxygen on Earth. In unfavourable environmental conditions, like low nutrient concentrations, some phytoplankton produce resting stages that can survive in the sediment for millennia. These resting stages will wake up when the environmental conditions are suitable for blooming and growth. Resurrection ecology studies resurrected resting stages to be able to study phenotypes that are older than the mean age of a human. The resting stages also give an opportunity to study how they adapt to historical environmental changes. In this master's thesis I study if melatonin potentially could be used for resurrection of resting stages. I also study if the growth rate of vegetative cells is affected from added melatonin or if melatonin could make vegetative cells go into resting mode. The experiments were done on diatoms, mostly *Skeletonema marinoi*, and many melatonin concentrations and one control treatment were used in every experiment. Our results indicate that melatonin does not affect the awakening of resting stages. According to my results melatonin affects both the growth rate and the dormancy of vegetative cells. The growth rate is negatively affected by the added melatonin concentrations. The dormancy on the other hand is positively affected by the melatonin concentrations when more vegetative cells enter resting mode when melatonin is added. These results are important for the ongoing research where phytoplankton communities from different time periods are compared by using resting stages from the sediment. By examining how resurrected diatoms and other phytoplankton groups can tolerate the environmental conditions that are expected in the future we can get a picture of how the Baltic Sea phytoplankton community may look like in for example the year 2100.

Keywords: Phytoplankton, melatonin, resurrection, resting stages, diatoms, *Skeletonema marinoi*

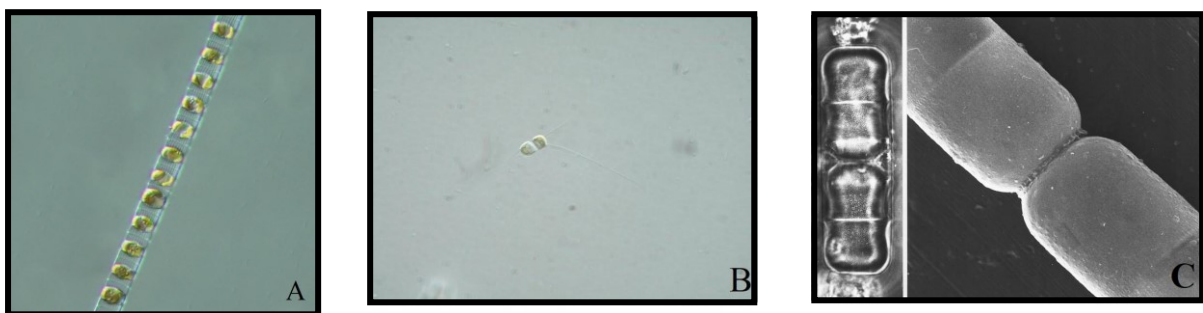
Innehållsförteckning

1 Inledning	1
1.1 Vilostadier av växtplankton.....	2
1.2 Melatonin.....	4
1.3 Målsättningar, frågeställningar och hypoteser.....	5
2 Material och metoder	6
2.1 Insamling av sediment.....	6
2.2 Åldersbestämning.....	7
2.3 Molekylär biostimulering med melatonin.....	8
2.3.1 Kvalitativ bestämning av vegetativa celler.....	9
2.4 Tillväxtexperiment med melatonin.....	9
2.4.1 Kvantitativ undersökning av tillväxt.....	10
2.5 Experiment för att få cellerna att somna.....	11
2.5.1 Kvalitativ analys av celltyp.....	12
3 Dataanalys	12
4 Resultat	13
4.1 Återuppväcknings-experiment.....	13
4.2 Tillväxtexperiment.....	14
4.3 Effekten av melatonin på bildande av vilostadier.....	15
5 Diskussion	16
5.1 Molekylär biostimulering med melatonin.....	16
5.1.1 Melatonin och dess inverkan på marina och terrestra växter.....	18
5.1.2 Biostimulering som metod.....	19
5.2 Tillväxtexperiment med melatonin.....	19
5.3 Sömnexperiment.....	20
5.4 Växtplankton i Östersjön och deras anpassning till miljöförändringar.....	21
5.5 Förbättringsförslag för fortsatta studier.....	22
6 Slutsatser	23
7 Tackord	23
8 Referenslista	23
9 Bilagor	27

1 Inledning

Växtplankton är encelliga fotosyntetiska organismer som fungerar som grund till de flesta marina näringsvävar. På grund av detta utgör de en ekologiskt viktig organismgrupp. Växtplankton är en av de största kolproducenterna i världen också om man beaktar terrestra områden. De använder cirka hälften av den atmosfäriska koldioxiden globalt. Eftersom de använder en så stor del av den globala koldioxidbudgeten bildar de också globalt närmare hälften av allt syre genom sin fotosyntes. Växtplankton fungerar som en direkt födokälla för till exempel djurplankton och som en indirekt födokälla för högre trofiska nivåer genom att de bildar upplöst organisk kol (Engelska Dissolved Organic Carbon, DOM) (Andersson et al. 2015).

Generellt sett kan växtplankton uppdelas i prokaryota och eukaryota organismer. Exempel på en prokaryot växtplanktongrupp är cyanobakterierna medan de vanligaste eukaryota växtplanktongrupperna är dinoflagellater och kiselalger (Ellegaard och Ribeiro 2018). Exempel på vanliga och ofta undersökta grupper i Östersjön och Skärgårdshavet är kiselalger och dinoflagellater (Wasmund et al. 1998). Speciellt under våren brukar dessa grupper dominera växtplanktonsamhället (Wasmund et al. 1998). Några exempel på abundanta kiselalger är *Skeletonema marinoi* (Figur 1A) samt olika arter av *Chaetoceros spp.* (Figur 1B) och *Melosira spp.* (Figur 1C). Exempel på dominerande dinoflagellater i Östersjön är *Woloszynskia halophila* och *Peridiniella catenata* (Spilling et al. 2006).



Figur 1. A= *S. marinoi*, B= *Chaetoceros muelleri*, C= *Melosira lineata*. Alla bilder är tagna från nordicmicroalgae.org.

S. marinoi är en kiselalg som bildar en kedja av celler. Den och andra kiselalger är viktiga arter för många högre trofiska nivåer (till exempel Sommer et al. 2002). I Skärgårdshavet observeras

S. marinoi året om men den är mest synlig i april och maj då vårblomningen av växtplankton råder (Jumppanen och Mattila 1994). *S. marinoi* reproducerar sig oftast asexuellt men i vissa fall kan också sexuell reproduktion ske (Godhe et al. 2014). Asexuell reproduktion sker genom att en modercell delar på sig så att en dottercell bildas. Modercellen kommer att minska i storlek vid varje delning. När modercellen delat sig tillräckligt många gånger är den för liten för att kunna dela sig. Modercellens storlek återställs genom sexuell reproduktion. Asexuell reproduktion är snabbare än sexuell reproduktion, kräver mindre mängd energi och kan bilda nya genotyper också i klonade kulturer (Brand 1981). Detta är orsaken att kiselalger använder bägge strategier för förökning. Vanligen delar sig en *S. marinoi* asexuellt individ en gång per dag i laboratorieförhållanden (Taylor et al 2009). Dinoflagellater kan också reproducera sig asexuellt genom att det inuti modercellen bildas en eller två zoosporer som sväller upp till ungefär samma storlek och form som modercellen och bildar en eller två nya vegetativa celler (Swift och Durbin 1971).

Den sexuella reproduktionen sker genom att en så kallad auxospor bildas (Round et al. 1990). En auxospor är en diploid zygot (eng. zygote) som bildas då två haploida gameter går ihop (Chepurnov et al. 2004). Inuti auxosporen bildas en stor initial cell. Vanlig sexuell reproduktion hos kiselalger sker när en stor orörlig äggcell fertiliseras av en utvecklad spermatocyt med en flagell. Denna reaktion är oogam, vilket betyder att äggcellen är betydligt större än spermien. Sexuell reproduktion är viktig för att återställa cellstorleken hos de flesta kiselalger (Godhe et al. 2014).

1.1 Vilostadier av växtplankton

När miljöförhållandena inte är gynnsamma för tillväxt kan flera olika arter av växtplankton bilda så kallade vilostadier. Vad ogynnsamma miljöförhållanden betyder varierar från art till art för olika arter har sina specifika krav på sin miljö. Med ogynnsamma miljöförhållanden kan till exempel menas brist på kväve, låg temperatur, hög salthalt och låg syrehalt men också aspekter som predationstryck, järnbrist etc, kan orsaka ogynnsamma tillväxtförhållanden för växtplankton. Olika artgrupper har olika slags vilostadier, cyanobakteriers vilostadier heter akineter medan vilostadier av kiselalger kan delas in i två eller tre grupper. Dessa grupper är vilostadier, vilosporer (som kallas för hypnosporer) och eventuellt vilostadier som endast bildas för att överleva vinter. En del vilostadier, som till exempel vilostadier av dinoflagellater, bildas som en del av sexuell reproduktion medan andra vilostadier, som vilostadier av kiselalger, bildas asexuellt (Ellegaard och Ribeiro 2018).

Vilostadier av växtplankton är inte döda och vissa studier tyder på att åtminstone vilostadier av kiselalger skulle bevaras livskraftiga på havsbotten i över 7000 år (Sanyal et al. 2019). Tidigare forskning visar att tiden för uppväckning av olika arter varierar. Med uppväckning menas hur fort vilostadier bildar vegetativa celler (Argawal 2009). Till exempel *Chaetoceros muelleri* kan väckas på endast några timmar, eller senast några dagar efter att inkubationen påbörjats (Sanyal et al. 2019). För andra arter kan uppväckningen ta veckor eller till och med månader (Härnström et al. 2011). Både biotiska och abiotiska faktorer påverkar uppväckningen av vilostadier. Exempel på faktorer som påverkar uppväckningen är mängden ljus, vattentemperatur, pH samt mängden av näringsämnen. Även antropogena faktorer som mängden antibiotika eller andra kemikalier i omgivningen kan påverka hur fort vilostadier bildar vegetativa celler (Argawal 2009).

Vilostadier av växtplankton kan ibland vara svåra att urskilja från vegetativa celler. Vegetativa celler är celler av dinoflagellater och kiselalger som växer och kan dela sig fritt i vattenmassan (Tsim et al. 1997). Vilosporerna av kiselalger skiljer sig från den vegetativa cellen genom att de har en tjockare vägg av kisel. De är också rundare i formen och innehåller en mindre mängd ”mönster” än vegetativa celler. Dinoflagellaters vilostadier kallas för hypnozygoter och är bildade sexuellt som en del av livscykeln. Dessa är oftast små, färglösa och har en tjock cellvägg (Ellegaard och Ribeiro 2018). Vilostadierna sedimenteras tillsammans med annat organiskt och oorganiskt material på havsbotten efter en blomning eller då tillväxtperioden är över. Man uppskattar att sedimentlagret i Östersjön ökar med cirka 0,5- 3 mm per år i medeltal (Suplińska och Pietrzak-Flis 2008). Sedimenteringsraten varierar från år till år eftersom den påverkas till exempel av vind- och vågförhållanden (Argawal 2009). Teoretiskt kan man räkna ut åldern på ett visst lager av sedimentet genom att noggrant observera de olika ”årslagren” i ett vertikalt prov från havsbotten (Sanyal et al. 2019). Det finns dock andra metoder, som är mer exakta (Heiri et al. 2001). En mer exakt metod kallas för LOI- metoden. Sequential loss on ignition (LOI) är en vanlig metod för att uppskatta mängden karbonat och organiskt material i ett sediment. Metoden användes först av Dean (1974). Metoden delas in i flera delreaktioner. I delreaktion ett oxideras organiskt material till aska och koldioxid i en temperatur mellan 500 och 550 °C. Den andra delreaktionen går ut på att karbonat bränns i en temperatur mellan 900 och 1 000 °C för att bli av med koldioxiden. Efter delreaktion två finns det endast oxid kvar. Genom att väga samplen både före och efter uppvärmningen får man veta hur mycket vikten av samplet minskar. Viktminskningen korrelerar med mängden karbonat och organiskt

material som sedimentet innehåller (Heiri et al. 2001). Halten av organiskt material korrelerar med åldern av sedimentet.

Växtplankton används ofta inom ekologi och evolution (Ellegaard et al. 2020) för att försöka förstå evolutionen i marina organismer och marina system samt undersöka den ekologiska anpassningen hos marina organismer. Inom återuppväckningsekologi (eng. Resurrection ecology) studerar man hur akvatiska och terrestra arter utvecklas, överlever och sprids när miljöförhållandena förändras på grund av till exempel mänsklig aktivitet (Kerfoot et al. 1999). Forskningsfältet kombinerar ekologi, paleobiologi och evolutionsbiologi och undersöker effekten av långtidsförändringar på organismer som sker under åtminstone flera decennier. För att kunna studera långtidsförändringar kan man använda sig av organismer som inte påverkats av förändringen tidigare. I marina miljöer handlar det ofta om vilostadier av arter eller organismer som har sedimenterats på havsbotten under en lång tidsperiod och som har förmågan att hållas levande i sedimentet. Genom att jämföra forna och nuvarande celler av samma organism kan man undersöka hur arten i fråga reagerar på miljöförändringar (Kerfoot et al. 1999; Brendonck och De Meester. 2003). Genom att återuppväcka vilostadier av växtplankton har man också en ypperlig chans att undersöka skillnader mellan fenotyper av organismer från en tidsperiod som är längre än medellivslängden av en människa (Ellegaard et al. 2020).

För att kunna väcka upp vilostadier av växtplankton behövs gynnsamma miljöförhållanden, vilket för kiselalger betyder tillräckligt med näring, varmt vatten, normal syrehalt (>2 mg/l) och en salthalt kring 6 psu (eng. practical salinity units) i fallet av Östersjö-arter. Återuppväckningsprocessen för vissa arter som *S. marinoi* är långsam och mängden av återuppväckta vilostadier är oftast låg. För att öka återuppväckningsraten av vilostadier har tidigare forskning använt sig av hormonell stimulering. Ett använt hormon är melatonin men också till exempel gibberrellinsyra har använts (Paster och Abbot 1970). Enligt Paster och Abbot (1970) skulle en gibberrellinsyrakoncentration på 10^{-7} mol/liter öka tillväxten på *Gymnodinium breve*, vilket är en toxisk encellig dinoflagellat. Gibberrellinsyrakoncentration på mer än 5×10^{-7} mol/liter inhiberar istället tillväxten av *G. breve*.

1.2 Melatonin

Melatonin, N-acetyl-5-methoxytryptamin, ($C_{13}H_{16}N_2O_2$) är ett hormon som vanligen bildas av tallkottkörteln hos människan. Melatoninets främsta uppgift är att hjälpa människan att somna och sova. Om inte människokroppen bildar tillräckligt med melatonin kan personen ha

svårigheter att sova och då kan melatonin ges i tablettform som sömnmedicin. En studie av Delebecq et al. (2020) visade att tillsatt melatonin ledde till ökade mängder av uppväckta vilostadier. Delebecq et al. (2020) visade att melatonin leder till en positiv stimulering av vilostadier av dinoflagellater i melatoninkoncentrationer på 1, 10 och 100 μM men inte för melatoninkoncentration på 1000 μM . Andrisano et al. (2000) visade att melatonin mister sin effekt om det är i kontakt med ljus de första 12 timmarna efter att experimentet satts i gång. Melatonin mister alltid sin effekt om det är i ljus och man ska försöka vara snabb när man handskas med melatonin. Melatonin, som används till experiment, skall förvaras i en temperatur på $-20\text{ }^\circ\text{C}$ och i mörkt när det inte används.

Melatonin är med vid livscykel-övergångar hos flera arter av dinoflagellater som till exempel *Gonyaulax polyedra* (också kallad *Lingulodinium polyedrum*) (Balzer och Hardeland 1996). Den traditionella förståelsen var att melatonin bara finns hos vertebrater men forskning har visat att melatonin också finns i evertebrater, som insekter, och växtplankton (Pandi-Perumal et al. 2006). Den första dinoflagellaten som melatonin hittades i var *Gonyaulax polyedra* (Poeggeler et al. 1991). Tills idag har man hittat melatonin i flera andra dinoflagellater och även syntes av melatonin i dessa dinoflagellater har identifierats (Hardeland och Poeggeler 2003). Melatonin bidrar till att dinoflagellater bildar vegetativa celler. Detta skulle kunna vara en av orsakerna till att melatonin kan tänkas förbättra tillväxtraten av dinoflagellater. Dinoflagellater och andra växtplanktongrupper har undersökts redan på 1960-talet. Även om melatonin har undersökts i dinoflagellater redan för cirka 50 år sedan är det först nu på 2020-talet som melatoninets effekt på vilostadier av dinoflagellater samt uppväckningsförmågan av dess vilostadier undersökts (Delebecq et al. 2020).

1.3 Målsättningar, frågeställningar och hypoteser

Målsättningen med denna avhandling är att återuppväcka vilostadier av olika växtplanktonarter från sedimentlager som är från 1963 och 2019, samt undersöka om molekyllär stimulering har en effekt på den procentuella mängden vilostadier som vaknar upp. En annan målsättning är att undersöka om stimuleringen påverkar tillväxtraten av dessa uppväckta vilostadier eller om man med molekyllär stimulering kan få cellerna att återgå till vilostadiet. Tidigare försök som gjorts med sedimentet som användes här har resulterat i väldigt låga rater av uppvaknande hos andra arter än *S. marinoi* (Sjöqvist, pers.komm). Denna undersökning kan potentiellt leda till nya sätt att väcka upp vilostadier av växtplankton från äldre sedimentlager. De utförda experimenten kunde också resultera i att vi får systematisk kontroll över kiselalgerna och lära

oss att manipulera bildandet av olika celltyper mer effektivt. Detta vore värdefullt för den pågående forskning som handlar om att jämföra populationer och växtplanktonsamhällen från olika tidsperioder med hjälp av vilostadier från sedimentkärnor samt undersöka deras förmåga att anpassa sig till förväntade framtida miljöförhållanden.

Frågeställningar:

- 1) Påverkar tillsatt melatonin återuppväckningsraten av vilostadier hos olika växtplanktonarter? Enligt Delebecq et al. (2020) borde tillsatt melatonin leda till en ökad återuppväckning av vilostadier.
- 2) Påverkas tillväxtraten hos *S. marinoi* av tillsatt melatonin? Enligt Delebecq et al. (2020) skulle tillsatt melatonin inverka på tillväxtraten. Hurdan effekten är beror på melatoninkoncentration.
- 3) Kan tillsats av melatonin och borttagning av kväve leda till bildande av nya vilostadier hos *S. marinoi*? Ellegaard och Ribeiro (2018) förklarar olika aspekter som leder till bildning av vilostadier och tillsatts av molekyler och avlägsning av kväve nämns.

Hypoteser:

Hypotes 1. Tillsatt melatonin har en positiv effekt på återuppväckningsraten av vilostadier hos olika växtplanktonarter.

Hypotes 2. Tillväxten av vegetativa celler hos *S. marinoi* påverkas av tillsatt melatonin.

Hypotes 3. Melatonin tillsammans med NO₃-fattiga förhållanden leder till att nya vilostadier bildas hos *S. marinoi*.

2 Material och metoder

2.1 Insamling av sediment

Sedimentkärnan samlades in i april 2019 från ett område intill Haverö (Figur 2) ytterom Nagu (60.23053°N 22.0425°Ö). Området där provet samlades in var cirka 20 meter djupt. Sedimentkärnan samlades in med ett rör som var cirka 60 cm långt. Röret hade tyngder i övre delen av repet så att man kunde stänga röret och bilda ett undertryck när röret var så djupt som det gick in i sedimentet (Gareis pro-gradu avhandling 2021). Detta gjorde att sedimentet inte kunde rinna ut ur röret vid upphissning. Sedimentkärnan var totalt 48 cm lång. I experimenten användes ett delprov från 2–4 cm och ett från 46–48 cm ifrån sedimentkärnan (Figur 3).



Figur 2. Bild på Småholmen ytterom Haverö. Bilden är tagen från Velmus karttjänst https://paikkatieto.ymparisto.fi/velmuviewers/Html5Viewer_2_11_1/Index.html?configBase=https://paikkatieto.ymparisto.fi/Geocortex/Essentials/REST/sites/VELMU_karttjanst/viewer/s/HTML5/virtualdirectory/Resources/Config/Default&locale=sv-fi besökt 5.12.2021.



Figur 3. Bild på en sedimentkärna där man ser de olika årslagren. Bildkälla: Conny Sjöqvist

Efter provtagning delades sedimentkärnan in i 2 cm tjocka ”skivor/delprov”. För att undvika kontaminering av olika skivor så gröptes endast mitten av varje lager ur med en sked. Sedimentskivorna förvarades kallt (ca +4 °C) och mörkt tills analysen av proven påbörjades. Sedimentet hålls i mörker så att inte vilostadier av växtplankton vaknar till liv i förväg. Sedimentet som användes i denna undersökning användes enligt rekommendation från Delebecq et al. (2020) 9–17 månader efter insamling för att motverka degradering och minskad tillväxtrat och återuppväkningsrat.

2.2 Åldersbestämning

Åldersbestämningen av sedimentet gjordes med en LOI-analys (se inledning). Cirka 1 gram sediment per sedimentlager sattes i en degel och torkades i cirka 20 timmar i 105 °C.

Sedimentet brändes sedan i brännugn i en temperatur på 550 °C i två och en halv timme och kylades ned i en timme i en torkanordning. Efter varje steg vägdes degeln för att få ett estimat på våtvikt, torrsvikt och slutlig vikt efter avlägsning av organiskt material. Resultaten av analysen kunde jämföras och korreleras med resultaten av en annan sedimentkärna från samma provtagningspunkt, vilken hade analyserats med LOI- och ^{137}Cs -metoden (Jokinen et al. 2018). En kombination av LOI och ^{137}Cs -metoden tillät mig att få reda på åldern av delprovet från 46-48 cm djup och från 2-4 cm djup i sedimentkärnan.

2.3 Molekylär biostimulering med melatonin

I detta experiment undersöks ifall melatonin kan öka på återuppväckningsraten av vilostadier hos olika växtplanktonarter i jämförelse med kontrollbehandling. Tre olika koncentrationer av melatonin användes (10 μM , 100 μM och 1000 μM) och en kontroll där inget melatonin tillsattes. Koncentrationerna valdes enligt Delebecq et al. (2020) som använde liknande koncentrationer.

Tillväxtmedium $\text{F}_2 + \text{Si}$ framställdes enligt Guillard och Ryther (1962) (hittas i Guillard 1975) genom att tillsätta 2 ml NaNO_3 , 2 ml $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2 ml $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 2 ml spårämnen och 1 ml vitaminblandning (B_{12} , tiamin och biotin) i 2 liter sterilfiltrerat vatten. Denna näringsämnesmängd är onaturligt hög för kiselalger och för experimentella studier kan tillväxtmediet därför spädas ut. $\text{F}_{16} + \text{Si}$ framställdes genom att 1500 ml $\text{F}_4 + \text{Si}$ blandades med 500 ml $\text{F}_2 + \text{Si}$. F_2 bildas då de ovannämnda ämnena blandas i de ovannämnda mängderna. När F_2 späds ut en gång kommer tillväxtmediet att bli F_4 vilket är hälften svagare än F_2 . När F_2 späds ut fyra gånger fås F_{16} vilket alltså är fyra gånger svagare än F_2 . Endast F mediet innehåller inte kisel (Si), vilket är nödvändigt för tillväxten av kiselalger, när kisel tillsätts i tillväxtmediet skrivs det ut som $\text{F} + \text{Si}$.

92,5 mg melatonin blandades med 400 ml $\text{F}_{16} + \text{Si}$ -tillväxtmedium i en 1 liters glasflaska för att få melatoninkoncentrationen 1000 μM . 40 ml från den flaskan blandades med 360 ml $\text{F}_{16} + \text{Si}$ för att få melatoninkoncentrationen 100 μM . För att få melatoninkoncentrationen 10 μM blandades 40 ml från flaskan med koncentrationen 100 μM med 360 ml $\text{F}_{16} + \text{Si}$.

Algcellerna i detta experiment kom från två olika djup (2-4 cm och 46-48 cm) (mer om insamlingen av sediment i kap. 2.1) i sedimentkärnan vilket motsvarar åren 2019 och 1963 (mer om åldersbestämning i inledningen och kap. 2.2). Sedimentmängden uppskattades och vägdes upp i plastburkar. De exakta värdena för mängden sediment från 2-4 cm:s djup var

0,7549 g; 0,7528 g; 0,7535 g och 0,6608 g. De exakta värdena för mängden sediment från 46–48 cm:s djup var 0,7506 g; 0,7533 g; 0,7522 g och 0,6649 g.

Från flaskorna med melatoninkoncentrationerna 10 μM , 100 μM och 1000 μM togs 150 ml i två 250 ml glasflaskor var. 132 ml av endast $\text{F}_{16} + \text{Si}$ sattes i två 250 ml glasflaskor för kontroll. I samtliga flaskor med melatonin tillsattes ungefär 0,75 g sediment och i kontrollerna utan melatonin tillsattes ungefär 0,66 g sediment. Samtliga flaskor skakades för att bli av med klumpar.

Experimentet utfördes i åtta 6-hålsplattor och med sex replikat av varje sedimentbehandlingskombination. Samtliga brunnar fylldes med 11 ml vätska var (koncentrationen av melatonin per brunn valdes ut slumpmässigt). Flaskorna skakades om mellan påfyllning av varje brunn. När samtliga brunnar i en 6-hålsplatta var fyllda lades parafilm runt kanten av plattan för att undvika avdunstning. Samtliga plattor placerades i en låda med lock och sattes i $+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ i cirka tolv timmar. Melatoninet förstörs om det är i kontakt med ljus de tolv första timmarna efter tillsättning i experimentet (för mer info se inledningen). Efter tolv timmar hade plattorna en ljus-mörkercykel på tolv timmar och en temperatur på $+8\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3.1 Kvalitativ bestämning av vegetativa celler

Samtliga brunnar analyserades med ett mikroskop varannan dag i 31 dagar. Under analysens gång hölls plattorna på is för att undvika temperaturvariationer. 1 ml suspenderat delprov från varje brunn analyserades i en Utermöhl-kammare. För analysen av delproven användes ett inverterat ljusmikroskop av modellen Nikon Diaphot och en 200 gångers förstoring.

Den kvalitativa förekomsten av vegetativa celler i varje delprov analyserades i en lodrät transekt. Efter att en brunn analyserats pipetterades vattnet tillbaka i brunnen som det tagits från. Efter att Utermöhl-kammaren använts tvättades den under rinnande vatten och torkades av med papper för att undvika kontaminering mellan brunnarna.

2.4 Tillväxtexperiment med melatonin

I detta experiment undersöks ifall melatonin påverkar tillväxtraten av vegetativa celler av *S. marinoi* i jämförelse med kontrollbehandling. I detta experiment användes levande cellkultur av *S. marinoi*. Innan själva experimentet påbörjades uppskattades mängden celler som skulle användas.

En 500 ml:s kulturflaska fylldes med 500 ml filtrerat havsvatten och i flaskan tillsattes 500 μl NaNO_3 , 500 μl $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 500 μl $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 500 μl spårämnen och 250 μl vitaminblandning (B_{12} , thiamin och biotin) för framställning av $\text{F}_2 + \text{Si}$ enligt Guillard och Ryther (1962). I flaskan sattes också 5 ml cellkultur av *S. marinoi*. Mängden algceller räknades ut med ett ljusmikroskop och en Sedgewick-Rafter-kammare. 1,1 ml från 500 milliliterskulturflaskan sattes i ett eppendorfrör och Lugol-lösning tillsattes. 1 ml ifrån Eppendorfröret pipeterades i kammaren. Av de 1 000 rutor som fanns i kammaren undersöktes 20 på måfå. I dessa 20 rutor fanns det 774 levande celler av *S. marinoi*. För att räkna ut hur många celler per ml kulturen innehöll togs medeltalet av cellmängden från de 20 undersökta rutorna och detta medeltal togs gånger 1000. Uträkningen gav att kulturen innehöll 38 700 celler per ml. För att uppskatta hur mycket av kulturen som skulle tillsättas i 30 ml $\text{F}_2 + \text{Si}$ användes formeln:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

C_1 är cellkoncentrationen i 1 ml, V_1 är mängden kultur som ska tillsättas, C_2 är den koncentration celler per ml som man slutligen vill ha och V_2 är den slutgiltiga volymen av $\text{F}_2 + \text{Si}$ som cellerna ska tillsättas i. För att uppnå en slutkoncentration på 5000 celler per ml tillsattes ca 3,9 ml cellkultur till experimentflaskan (volym 30 ml).

I tre stycken 1 liters sterila glasflaskor hälldes 130 ml filtrerat havsvatten med följande näringsämnestillsatser: 130 μl NaNO_3 , 130 μl $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 130 μl $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 130 μl spårämnen och 65 μl vitaminblandning. I experimentet användes två melatonin-koncentrationer, 10 μM och 1000 μM . 0,0320 g melatonin tillsattes i en av flaskorna. Ifrån den flaskan togs 1,3 ml för att bilda melatoninkoncentrationen 10 μM . Experimentet utfördes i tolv stycken 40 milliliters kulturflaskor. I experimentet användes fyra replikat av melatoninkoncentrationerna samt kontrollen (koncentrationen per flaska valdes slumpmässigt) och 3,9 ml av den gamla kulturen tillsattes i samtliga flaskor. Den slutliga volymen i varje kulturflaska var 30 ml. Kulturflaskorna inkuberades i 10 °C i en tolv timmars ljus-mörkercykel med start med mörkercykeln.

2.4.1 Kvantitativ undersökning av tillväxt

Tolv brunnar i en 96-hålsplatta fylldes med 300 μl vätska var ur en av kulturflaskorna. I den trettonde brunnen sattes endas tillväxtmedium $\text{F}_2 + \text{Si}$. Plattan sattes i en spektrofotometer av märket TECAN SPARK som mätte *in vivo*-fluorescens av klorofyll a. De exakta

inställningarna för datorprogrammet hittas i bilaga 1. Ett ökat fluorescensvärde mellan mätningar indikerar tillväxt.

Proverna undersöktes spektrofotometriskt varje dag i tio dagar, vilket var tiden som det tog för kulturerna att nå stationär fas. Med stationär fas menas att tillväxten av algcellerna slutar. Efter att plattan använts sköljdes den med kranvatten och läts ligga i milliQ-vatten över natten. Följande morgon sattes plattan i torkugn med en temperatur på cirka 50 °C.

2.5 Experiment för att få cellerna att somna

I detta experiment undersöks om melatonin och NO₃-fattiga förhållanden leder till ökad förekomst av vilostadier. För att få vegetativa celler att bilda vilostadier kan man använda sig av metoder som till exempel att minska på mängden näringsämnen (se inledning). Dessa metoder är dock arts specifika och en metod fungerar inte för alla växtplanktonarter.

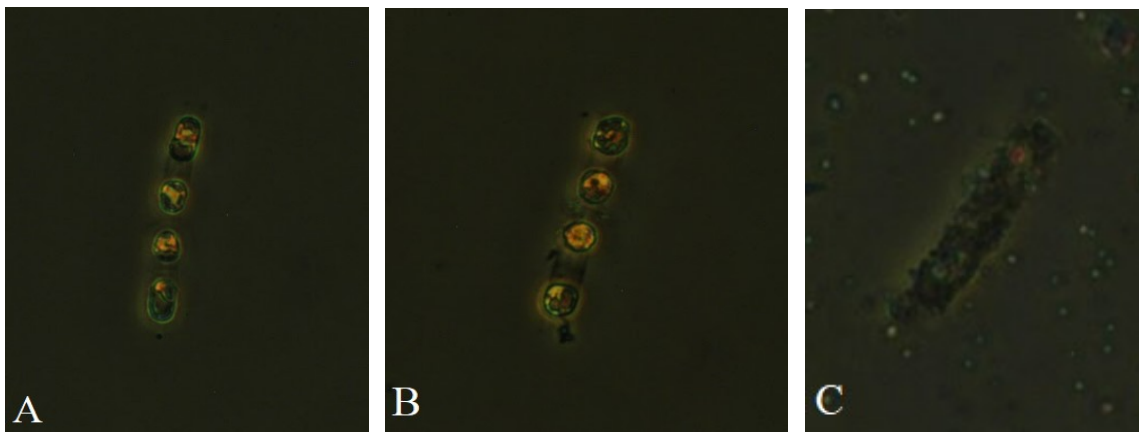
I den kulturflaska som cellerna togs från fanns F₂ + Si-medium innehållande NO₃⁻. För att bli av med så mycket av NO₃⁻ som möjligt centrifugerades kulturen. 25 ml från *S. marinoi*-kulturen sattes i tolv centrifugrör. Samtliga rör centrifugerades i tio minuter med cirka 11 200 rpm. Vid centrifugeringen bildades en pellet med celler och en supernatant. Orsaken till att en pellet bildas är att vid centrifugering separeras partiklar från vätska. *S. marinoi* cellerna är tyngre än vatten och sjunker till botten vilket bildar en pellet.

130 ml milliQ vatten mättes upp i tre 1 liters glasflaskor. I samtliga flaskor tillsattes cirka 0,78 gram havssalt (Instant Ocean), för att nå den normala salthalten i Östersjön (cirka 6 psu). De exakta saltvärdena blev: 0,7803 g; 0,7814 g och 0,7827 g. När man blandar milliQ vatten med havssalt bildas artificiellt havsvatten (eng. artificial seawater). Artificiellt havsvatten framställs för att bli av med kvävet som härstammar från det filtrerade havsvattnet. I samtliga flaskor tillsattes 130 µl NaH₂PO₄ · H₂O, 130 µl Na₂SiO₃ · 9H₂O, 130 µl spårämnen och 65 µl vitaminblandning enligt F₂ + Si-recept.

0,0337 gram melatonin tillsattes i en av flaskorna. Ifrån den flaskan togs 1,3 ml till en annan flaska för att få melatoninkoncentrationen 10 µM. I tolv 40 milliliters kulturflaskor hälldes 30 ml vätska. I detta experiment användes fyra replikat för melatoninkoncentrationerna och fyra replikat för kontrollen (koncentrationen i varje kulturflaska bestämdes slumpmässigt). I samtliga kulturflaskor tillsattes pelleten från ett av centrifugrören. Flaskorna inkuberades i 10 °C med en ljus:mörker cykel på tolv timmar med start i mörker.

2.5.1 Kvalitativ analys av celltyp

Ett delprov på 1 ml ifrån samtliga kulturflaskor fixerades med Lugol. För analysen användes ett inverterat ljusmikroskop av modellen Nikon Diaphot och en 200 gångers förstoring. 1 milliliter från ett delprov sattes i en Utermöhl-kammare. Delprovet undersöktes genom att på måfå välja 25 kedjor av *S. marinoi* och avgöra om cellerna i kedjan i fråga var vegetativa (Figur 4A), i vilostadie (Figur 4B) eller döda (Figur 4C). Som vilostadier tolkades celler som var runda i sin form. Totalt undersöktes prover från nio dagar.



Figur 4. En figur som förklarar vad som tolkats som vegetativ- vilo- och dödcell. A= Vegetativ cellkedja, B= Cellkedja med vilostadier (de två mittersta cellerna tydligast i vilostadie) och C= En cellkedja med döda celler.

Dataanalys

För återuppväcknings-experimentet gjordes inte några statistiska analyser eftersom inga skillnader mellan de olika behandlingarna kunde ses. Om det skulle ha funnits skillnader så skulle datat ha varit ett så kallat närvaro-frånvaro data (eng. presence-absence data) vilket betyder att endast informationen om arter i fråga var närvarande eller frånvarande undersöktes. Det finns statistiska verktyg för närvaro-frånvaro data.

Datat för tillväxtexperimentet analyserades med R version 4.1 (R Core Team (2022)). För att få fluorescensvärden till tillväxtrat användes 'growthrates' paketet i R och funktionen many_spline_fits (hela skriptet som bilaga 2). Funktionen använde fluorescensvärden från de olika experimentdagarna för att räkna ut tillväxtraten. Datat för tillväxtrat testades för normalfördelning och homogena varianser med Shapiro-Wilks test respektive Levene's test för att kunna köra en ANOVA. Datat mötte inte kraven för ANOVA och Kruskal-Wallis icke-parametriska test kördes i stället. Som beroende variabel användes medeltalet av tillväxten för

de fyra replikaten under hela experimentets gång och som oberoende variabel användes de olika behandlingarna. För att få reda på mellan vilka behandlingar som det fanns en signifikant skillnad i fråga om tillväxt kördes Tukey's HSD post-hoc test.

För kvalitativ analysering av datat från sömnexperimentet användes R version 4.1. (R Core Team (2022)). Datat testades först för normalfördelning och homogena varianser med Shapiro-Wilks test respektive Levene's test. Som beroende variabel användes medeltalet av mängden av bildade vilostadier från de fyra replikaten under hela experimentets gång och som oberoende variabel användes de olika behandlingarna. För att kunna köra en ANOVA måste datat vara normalfördelat och ha homogena varianser. I detta fall uppfylldes inte dessa krav och Kruskal-Wallis icke parametriska test kördes i stället. Resultatet från Kruskal-Wallis testet berättade om det fanns signifikanta skillnader mellan någon av de testade behandlingarna och för att få veta mellan vilka behandlingar det fanns en signifikant skillnad i fråga om mängden bildade vilostadier kördes ett Tukey's HSD post-hoc test. I detta experiment gjordes två analyser: för dag ett och nio och endast för dag ett för att undersöka om melatonin kunde ha använts upp redan efter en dag.

4 Resultat

4.1 Återuppväcknings-experiment

I fem av sex kontrollbrunnar från 1963 fanns levande *Coscinodiscus sp.*, *Cyclotella sp.* och *Chlamydomonas sp.* I alla brunnar med koncentrationen 10 μM från 1963 fanns levande *Coscinodiscus sp.* och *Cyclotella sp.* Förutom det fanns det levande *Chlamydomonas sp.* i tre av sex brunnar. I fem av sex brunnar med koncentrationen 100 μM från 1963 fanns levande *Coscinodiscus sp.*, *Cyclotella sp.* och *Chlamydomonas sp.* Av de sex brunnarna med koncentrationen 1000 μM från 1963 fanns det levande *Coscinodiscus sp.*, *Cyclotella sp.* och *Chlamydomonas sp.* i tre av brunnarna. En av de sex brunnarna innehöll bara *Coscinodiscus sp.*, och *Cyclotella sp.*, och en av brunnarna innehöll bara *Coscinodiscus sp.* och *Chlamydomonas sp.* se Tabell 1.

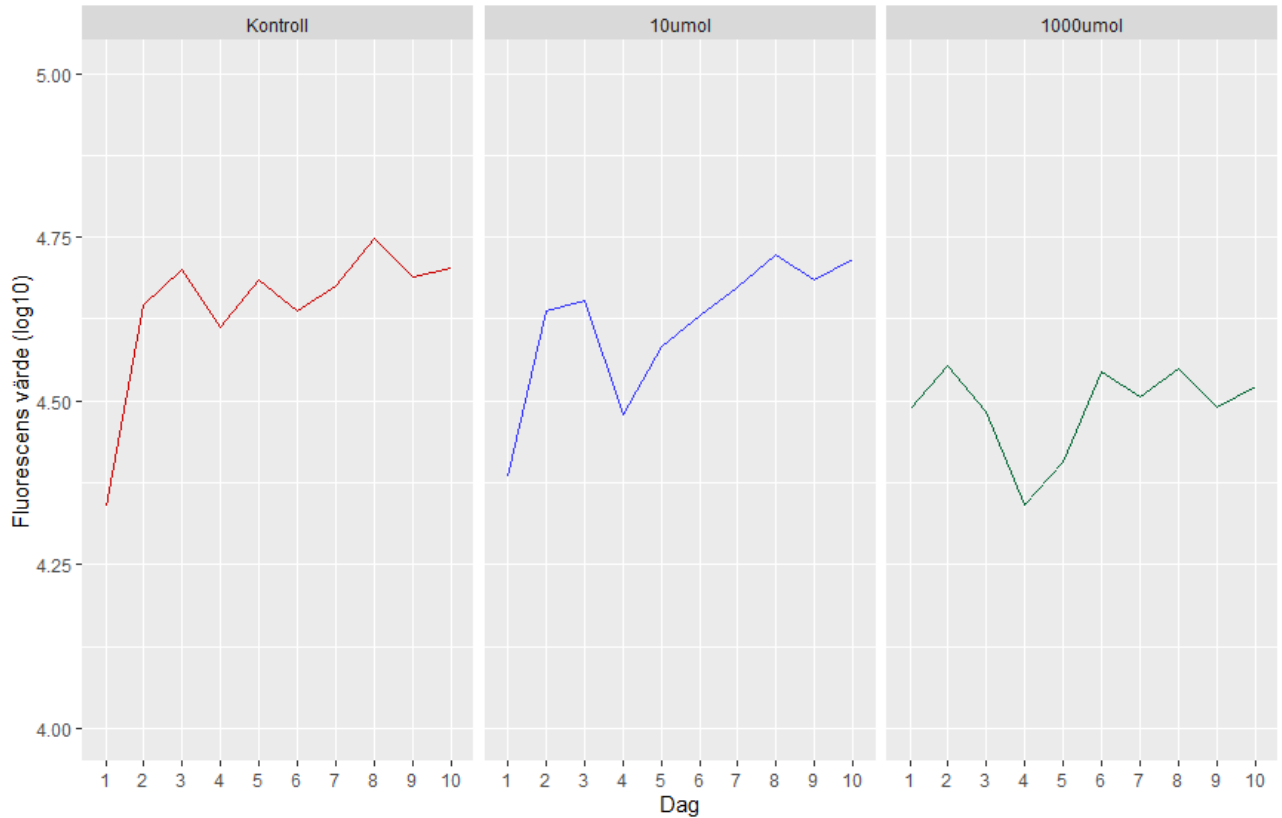
Tabell 1. Tabellen visar det kombinerade resultatet från de olika sedimentbehandlingskombinationerna för hela experimentets gång. Ett X i de olika cellerna i Tabell 1 betyder att arten i fråga sågs levande i ifrågavarande behandling.

Species	1963 (46-48 cm)	1963 (46-48 cm)	1963 (46-48 cm)	1963 (46-48 cm)	2019 (2-4 cm)	2019 (2-4 cm)	2019 (2-4 cm)	2019 (2-4 cm)
	Kontroll	10 µmol	100 µmol	1000 µmol	Kontroll	10 µmol	100 µmol	1000 µmol
<i>Amphora sp.</i>								
<i>Chaetoceros sp.</i>								
<i>Coscinodiscus sp.</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Entomoneis sp.</i>								
<i>Melosira arctica</i>								
<i>Melosira moniliformis</i>								
<i>Melosira varians</i>								
<i>Skeletonema marinoi</i>								
<i>Surirella sp.</i>								
<i>Fragillaria sp.</i>								
<i>Cymbella sp.</i>								
<i>Cyclotella</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Navicula sp.</i>								
<i>Chlamydomonas sp.</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Tabellaria sp.</i>					X			

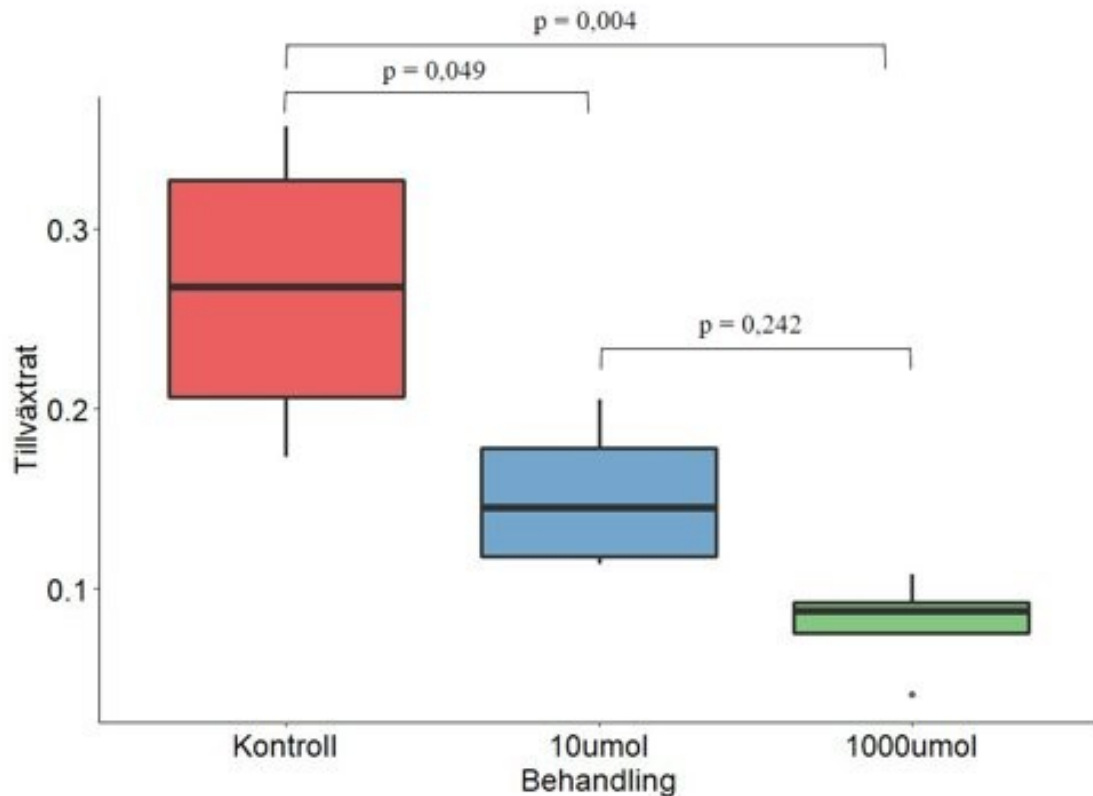
På grund av att det inte fanns några skillnader i artsammansättningen i de olika behandlingarna kördes inga statistiska analyser från detta experiment.

4.2 Tillväxtexperiment

Resultaten visar att de högsta fluorescensvärdena finns i kontrollbehandlingen medan fluorescensvärdet avtar med ökande melatoninkoncentration (Figur 5). Tillväxtraten (Figur 6) i kontrollbehandlingen är högst. Analysen av tillväxtraten gav ett statistiskt signifikant resultat (Kruskall-Wallis chi-squared = 9.2692, df = 2, p-värde = 0.00971).



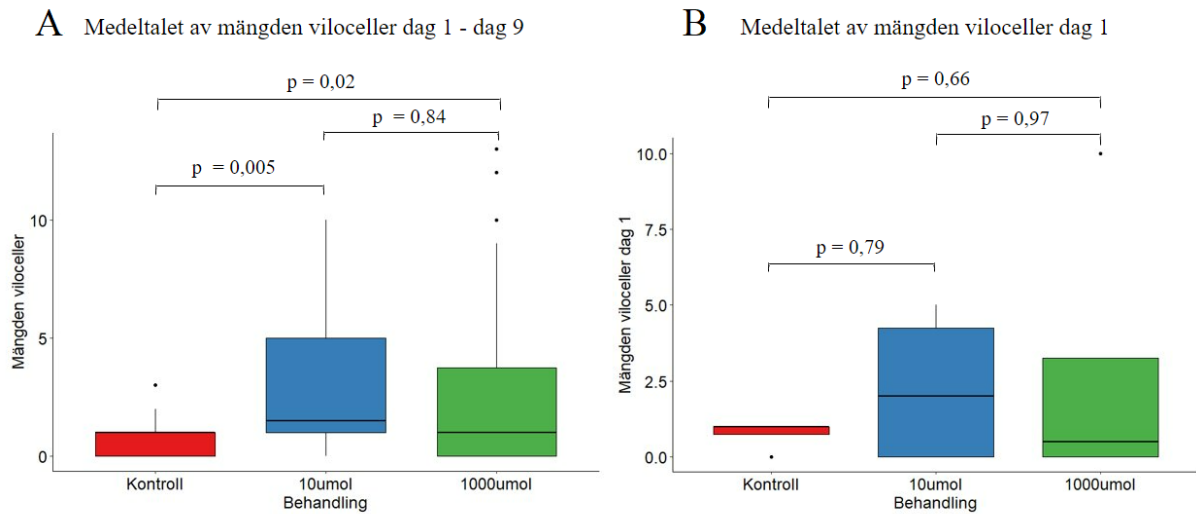
Figur 5. Figur på hur fluorescensvärdet ändras under experimentets gång i de olika behandlingarna. På x-axeln finns dagarna som experimentet kördes och på y-axeln finns medeltalet av de fyra replikatens fluorescensvärden. Fluorescensvärden är log10 transformerade.



Figur 6. Figuren visar tillväxtraten i de olika behandlingarna. På x-axeln finns behandlingarna och på y-axeln finns medeltalet av tillväxtraten av de fyra replikaten av varje behandling för hela experimentets gång (dag ett till tio). P-värdena ovanför varje behandlingskombination är resultatet från Tukey's HSD post-hoc test.

4.3 Effekten av melatonin på bildande av vilostadier

Mängden vilostadier var som högst i behandlingen med den låga melatoninkoncentrationen och som lägst i kontrollbehandlingen (Figur 7). Resultatet från analys av endast dag ett gav inte ett signifikant resultat (Kruskall-Wallis chi-squared= 0.032227, df=2, p-värde=0.984). Analysering av mängden vilostadier för alla dagar tillsammans gav ett signifikant resultat (Kruskal-Wallis chi-squared = 7.4101, df = 2, p-värde = 0.0246).



Figur 7. Figuren visar mängden bildade vilostadier under 9 dagars tid (A) för de olika behandlingarna jämfört med mängden bildade vilostadier dag 1 (B). På x-axeln finns behandlingarna och på y-axeln mängden vilostadier från 0-10. Mängden vilostadier är medeltalet av mängden vilostadier från dag ett till dag nio för de olika behandlingarna och replikaten respektive medeltalet för de fyra replikaten för varje behandling dag ett. P-värdena ovanför varje behandlingskombination är resultatet från Tukey's HSD post-hoc test.

5 Diskussion

5.1 Molekylär biostimulering med melatonin

Min hypotes att melatonin skulle ha en positiv effekt på återuppväckningsraten av vilostadier stämde inte. I stället kunde inte några skillnader ses mellan kontrollbehandlingen och melatoninbehandlingarna. Enligt Delebecq et al. (2020) skulle melatonin ha en positiv effekt på återuppväckningen av vilostadier men mina resultat visade som sagt ingen skillnad mellan melatoninbehandlingarna och kontrollbehandlingen. Det fanns dock skillnader i metoderna och valet av studieorganism som använts vilket potentiellt kunde vara orsaken till de avvikande resultaten. Delebecq et al. (2020) studerade hur melatonin inverkar på återuppväckningen av dinoflagellater medan i denna avhandling undersöktes kiselalger. I Delebecq et al. (2020) användes K medium i stället för F medium som tillväxtmedium vilket innehåller lite olika komponenter.

F medium använder nitrat (NO_3) som kvävekälla medan kvävekällan i K medium är ammonium (NH_4^+). Nitrat är den mer använda kvävekällan i tillväxmedium men ammonium är i vissa fall till och med bättre att använda eftersom växtplanktonen inte behöver reducera ammoniumet innan aminosyrasyntesen (Probert och Klaas 1999). Ammoniumhalter över $24 \mu\text{M}$ har visat sig vara toxiska för växtplankton. I en liter K medium finns det $8.82 \times 10^{-4} \text{ M}$ ammonium (Keller och Guillard 1985, Keller et al. 1987) (finns i DOC-050.000 (2020)). F medium använder oorganiskt fosfat (PO_4) som fosforkälla medan fosforkällan i K medium är glycerofosfat ($\text{C}_3\text{H}_7\text{Na}_2\text{O}_6\text{P}$). Glycerofosfat är organiskt till skillnad från fosfat som är oorganiskt. Fosfat är den mer använda fosforkällan i tillväxtmedium. För att växtplankton ska kunna använda en organisk fosforkälla måste de ha förmågan att bilda fosfatasenzym på cellytan, en egenskap som de flesta växtplankton har (Probert och Klaas 1999). Också vilka spårämnen som F och K medium använder skiljer sig, men skillnader i spårämnen har inte lika stor betydelse för slutresultatet som till exempel val av kvävekälla. Både F och K medium innehåller samma vitaminer. Enligt Probert och Klaas (1999) är cyanocobalamin (B_{12}) den viktigaste vitaminen för de flesta växtplankton. Enligt Band-Schmidt et al. (2004) skulle tillväxtraten av dinoflagellaten *G. catenatum* vara högre när K medium har använts i jämförelse med F medium. Det var potentiellt valet av kvävekälla (nitrat eller ammonium) som ledde till de avvikande resultaten i mitt experiment i jämförelse med Delebecq et al. (2020).

En av orsakerna till att några större skillnader mellan de olika koncentrationerna av melatonin inte kunde ses kunde vara att sedimentet hade oxiderats i kontakt med syre. Det finns syre inuti sedimentet som gör det möjligt för infauna, alltså organismer som lever inuti sedimentet, att andas och hållas levande. Genom att förvara sedimentet i syrefria förhållanden, vilket i mitt fall betydde förvaring i återförslutbara påsar, minskas risken att sedimentet kunde oxidera (Hargrave 1972). Sedimentet hade också förvarats i kallt och mörkt innan experimentet kördes för att inte vilostadierna skulle vakna upp tidigare än planerat (Delebecq et al. 2020).

En annan orsak till resultaten kunde ha varit att melatonin hade utsatts för ljus för länge innan plattorna satts i mörker vilket kunde ha lett till att melatonin skulle ha tappat sin effekt. En tredje orsak kunde ha varit att det emellanåt var svårt att avgöra om arten var i liv eller i vilostadie. Också endast en transekt från varje brunn undersöktes på grund av att det annars inte skulle ha varit möjligt att gå igenom varje brunn under en dag. Eftersom bara en transekt undersöktes per brunn kunde en del av resultaten som fåtts vara felaktiga eller ofullständiga. Vissa arter var också svåra att se för de var så små och det är möjligt att jag tolkat någon art fel.

I en studie av Mcquoid et al. (2002) undersöktes vilostadier från en fjord i Sverige. De försökte väcka upp vilostadier av växtplankton genom att använda endast tillväxtmedium $F_2 + Si$ och olika temperaturer (3, 10 och 18 °C). De undersökte djup mellan 2 och 50 cm. Artsammansättningen av uppväckta vilostadier var låg i de djupaste sedimentlagren, vilket stämde med resultaten från mitt experiment. Skillnaden var att mängden uppväckta arter i sedimentlagret från 2 cm:s djup var större än vad mitt experiment kom fram till. I studien av Mcquoid et al. (2002) vaknade olika arter av *Chaetoceros sp.* upp medan i mitt experiment påträffades inte uppväckta vilostadier av *Chaetoceros sp.* Enligt Mcquoid et al. (2002) skulle en temperatur på 10 °C vara optimal för återuppväckning av vilostadier av kiselalger. Experimentet som körts för denna gradu utfördes i en temperatur på 8 °C vilket potentiellt kunde ha inverkat på återuppväckningsraten av vilostadierna.

5.1.1 Melatonin och dess inverkan på marina och terrestra växter

Melatonin finns i naturen och har hittats i arter av encelliga eukaryoter, bakterier, terrestra växter, makroalger, vertebrater och evertrebrater (Pandi-Perumal et al. 2006). Melatonin sägs fylogenetiskt sett vara en av de äldsta biologiska signaleringsmekanismerna i organismer. Melatonin har upptäckts syntetiseras i flera olika arter av dinoflagellater, cyanobakterier, alphaproteobakterier, euglenofyter, brunalger, eukaryota grönväxter och rödalger (Hardeland 2015). Tidig forskning om melatoninets effekter på växter undersökte ifall melatonin hade en inverkan på dygnsrytmen, om melatonin fungerade som en ”renare” av fria radikaler eller om melatonin signalerade ”mörker”. Dessa effekter undersöktes för att melatonin hade visats ha dessa effekter hos evertrebrater och vertebrater. Enligt forskning skulle växter innehålla mer melatonin om de växte i mörker i jämförelse med ifall de växte i ljus. Ljus är en viktig aspekt för tillväxt hos växter men forskning har visat att exponering av väldigt höga våglängder av synligt ljus eller, ännu tydligare, exponering av ultraviolett ljus kan bilda en ökad mängd med väteperoxid (H_2O_2) och fria radikaler samt skada fotosystemen. Också till exempel hög salthalt, extrema höga- och låga temperaturer och torra har visats vara stressande förhållanden för växter. Alla dessa aspekter kan potentiellt ha en negativ inverkan på växten. Forskning har visat att melatonin bildas i högre grad i förhållanden där växterna är utsatta för stressande förhållanden och kan potentiellt skydda växterna emot skador som orsakas av dessa förhållanden (Zhang et al. 2015). Melatonin har också visats minska på skador orsakade av stress hos grönalgen *Ulva sp.*, där de största orsakerna till stress har visats vara tungmetaller, som zink, kadmium och bly samt temperatur. Melatonin har visats ha den största positiva effekten emot stress, hos grönalger, orsakad av kadmium (Zhang et al. 2015).

5.1.2 Biostimulering som metod

Biostimulering betyder att man med tillsats av näringsämnen försöker förbättra miljön och detta är en av huvudmetoderna inom ämnet biosanering. Med biosanering menas effekter för att minska på toxiciteten av omgivningen och med hjälp av biologiska processer försöka få miljön tillbaka i sitt originaltillstånd. För att man ska förstå hur biosanering kan förbättra miljön måste man acceptera att det inte skulle finnas någon kemisk förening som inte kunde nedbrytas av mikroorganismer. Detta har visat sig stämna men vissa ämnen nedbryts så långsamt att de inte har någon större betydelse för biosaneringen. Forskning har visat att för terrestra växter som blivit biostimulerade med till exempel olika kvävekällor, som nitrat och ammonium, innehåller en ökad mängd av nedbrytarbakterier. Biostimulering används mest för biosanering av föroreningar i kolväten (Hazen 2009). Studier har också visats att celler av växtplankton som cyanobakterier kunde fungera som biostimulerare av odlingsmark (Marks et al. 2019). Man har undersökt om växtplankton kunde användas som biogödsel för odlingsgrödor och dessa resultat tyder på att detta kunde vara möjligt.

Biostimulering betyder också behandling av organismer med en molekyl. Biostimuleringens effekt på återuppväkningsraten av vilostadier hos växtplankton har undersökts av till exempel Delebecq et al. (2020), som använde hormonen melatonin och gibberrellinsyra för att undersöka ifall återuppväkningsraten av vilostadier hos dinoflagellater kunde öka med hjälp av biostimulering. Resultatet blev att vissa arter och släkten av dinoflagellater som till exempel *Alexandrium minutum*, *Gymnodiniales sp.*, *Heterocapsa minima* och *Margalefidinium polykrikoides* återuppväcktes endast när melatonin eller gibberrellinsyra hade tillsats. Detta tyder att biostimulering skulle vara en bra metod för återuppväckning av vilostadier.

5.2 Tillväxtexperiment med melatonin

Min hypotes att det skulle finnas en skillnad i tillväxtraten mellan kontrollbehandlingen och melatoninbehandlingarna stämde. Enligt mina resultat har melatonin en negativ effekt på tillväxten av vegetativa celler. En orsak till att följande resultat har framkommit kunde vara att de använda melatoninkoncentrationerna varit för höga för att ha en positiv effekt. I efterhand hittades en artikel som visar att melatoninkoncentrationer över 10 μM påverkar tillväxten av kiselalger negativt. Enligt Delebecq et al. (2020) skulle melatoninkoncentration på 1000 μM potentiellt vara toxiskt för algcellerna och på det sättet ha en inhiberande effekt på tillväxten. Annat som kunde vara orsaken för den negativa tillväxteffekten kunde vara att melatoninet inverkat på metabolismen av de vegetativa cellerna så att de i stället bildat vilostadier. Denna

reaktion har påträffats i forskning (Hardeland et al. 2007). Enligt Delebecq et al. 2020 skulle allt över 10 μM koncentration av melatonin ha en negativ effekt på tillväxten. Mina resultat skulle dock tyda på att redan en melatoninkoncentration på 10 μM är så hög att den har en negativ effekt på tillväxten.

Melatoninets effekt på tillväxten av växter har undersökts och melatonin har visats främja tillväxt hos högre växter som till exempel havre, vete och lupin (Arnao och Hernández-Ruiz 2014). Melatonin har också visats fungera som en aktivator av olika slags växtfrön. Enligt Arnao och Hernández-Ruiz (2006) skulle melatonin gynna tillväxt och blomning av växer upp till en melatoninkoncentration på 100 μM därefter har melatonin visats ha en svagt inhiberande effekt. Dessa resultat är liknande som de resultat som ses i tillväxtrat hos kiselalger i mitt experiment.

5.3 Sömnexperiment

Min hypotes att nya vilostadier bildas när melatonin tillsätts stämde. Man kan se en statistiskt signifikant skillnad mellan melatoninbehandlingarna och kontrollbehandlingen. I experimentet där vilostadier försökte bildas fanns det mest vilostadier i behandlingen med melatoninkoncentrationen 10 μM och minst i kontrollbehandlingen. Detta resultat tyder på att under kvävestress skulle bildandet av vilostadier gynnas av melatonin till en viss mängd medan effekten inte är lika stark i förhållanden där melatoninkoncentrationen är hög. Enligt Hardeland och Poeggeler (2003) skulle det bildas vilostadier hos växtplankton i förhållanden där utsättningen för solljus är låg och temperaturen är 15 °C också utan tillsats av melatonin. De tydligaste effekterna på bildandet av vilostadier orsakade av melatonin har påträffats i förhållanden där temperaturen är över 15 °C. I dessa förhållanden ökar mängden av 5-methoxytryptamin ($\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$), vilket är en framkallare av vilostadier. 5-methoxytryptamin har visats bilda vilostadier i vilken temperatur som helst och är inte heller kopplad till solljus. Enligt Hardeland et al. (2007) skulle bildandet av vilostadier som en följd leda till en lägre pH halt i cytoplasman. Detta fenomen har också påträffats i till exempel ofertiliserade ägg av djur och sporer av både svampar och bakterier.

En aspekt som kunde förklara resultaten var att man inte lyckats avlägsna all kväve från algkulturen. När algkulturen centrifugerades användes en annan centrifug än i pilot experimentet. I denna centrifug användes lite andra centrifugrör som var runda och bredare i botten. Som en följd bildades inte en pellet som satt hårt fast i botten av röret. Vid avlägsning av supernatanten fanns det en risk att pelleten kunde komma med så exakt all supernatant kunde

inte avlägsnas. I supernatanten fanns kväve, i form av nitrat, och kvävet kunde vara orsaken till den väldigt låga sömnraten av cellerna. I det fallet skulle kvävet gynnat de vegetativa cellerna. Forskning har visat att kväve i form av nitrat skulle leda till en minskad bildning av 5-methoxytryptamin (Hardeland et al. 2007). Enligt dessa resultat skulle nitrat indirekt ha en inhiberande effekt på bildandet av vilostadier av till exempel dinopflagellater (Hardeland et al. 2007), vilket också skulle stämma överens med den låga insomningsraten i mina resultat.

Experimentet kördes i tolv timmar ljus och tolv timmar mörkt medan pilot experimentet, där alla celler somnade in, kördes endast i mörker. Detta kunde ha en inverkan på resultaten, på grund av att forskning visat att det bildas mest 5-methoxytryptamin i mörker (Hardeland et al. 2007). En potentiell orsak till resultaten kunde också varit att all melatonin blivit använd redan dag 1 och att det inte fanns någon melatonin kvar till resten av experimentet. Efter analysering kommer man dock fram till att detta inte kan stämma på grund av att analysering av endast dag 1 inte gav ett statistiskt signifikant resultat (Kruskal-Wallis chi-squared=0.032227,df=2,p-värde=0.984), medan analysering av alla dagar gav det (Kruskal-Wallis chi-squared = 7.4101, df = 2, p-värde = 0.0246).

5.4 Växtplankton i Östersjön och deras anpassning till miljöförändringar

Växtplankton behöver gynnsamma miljöförhållanden, som för vissa arter av växtplankton betyder tillräckligt med näring, för att blomningen ska lyckas. Skärgårdshavet, där sedimentet är taget ifrån, brukar kallas för jordbrukets hotspot och har höga näringsämneshalter ledande till kraftiga övergödningar (HELCOM 2009). Kraftiga övergödningar förknippas ofta med syrebrist i botten, ökande växtplanktonblomningar och minskning i djuputbredning för till exempel blåstången (*Fucus vesiculosus*). På grund av mestadels jordbruk har syrehalten i Skärgårdshavet minskat drastiskt sedan 1970-talet (Jumppanen och Mattila 1994). Syrebrist leder till så kallade döda bottenar som innehåller lite syre (hypoxiska) eller inget syre alls (anoxiska). Under slutet på 1990-talet fanns det stora syrefria områden också i djupbottenar (Hansson et al. 2011). På grund av förbättrad vattenrening har dock situationen förbättrats i Åbo trakten. Mänsklig aktivitet som jordbruk och överfiske har ökat på mängden växtplankton i Östersjön. Jordbruket har ökat mängden kväve och fosfor i Östersjön vilket gynnat blomningen av växtplankton. Överfiske av större fiskar i sin tur har gjort att mesopredatorer ökat i mängd och konsumerat en stor del av djurplanktonen. När mängden djurplankton minskar finns det mindre mängd med konsumenter av växtplanktonen vilket leder till en ökad mängd växtplankton.

Fram till år 2100 förväntas vattentemperaturen i Östersjön öka med 3-5 °C, vilket antagligen kommer att leda till en förlängd blomningsperiod av växtplankton (Jonsson et al. 2018). Klimatförändringen kommer också indirekt öka övergödningsgraden genom att ökade kraftiga regnskurar leder till erosion från åkrarna (Jonsson et al. 2018). En ökad mängd växtplankton ökar också mängden vilostadier för näringen används upp och räcker inte hur länge som helst. Vid slutet av blomningsperioden sedimenteras vilostadierna i botten. Genom att undersöka hur återuppväckta kiselalger tål miljöförhållandena som förväntas 2100 kan man få en tanke om hur Östersjön kommer att se ut 2100. Med detta menas att man potentiellt kunde få en idé om vilka arter som kommer att finnas kvar och vilka som inte kommer att tåla de förväntade förhållandena. Uppväckta vilostadier av växtplankton från flera år har visat att det förekommer generationsöverlappningar av de olika åldersklasserna till en viss del. Genom att upprätthålla en frö bank av uppväckta vilostadier av växtplankton kan man försäkra att vi kommer att kunna upprätthålla ett diverst samhälle också under tidsperioder när miljöförhållanden är ogynnsamma eller då det sker naturkatastrofer som till exempel oljeolyckor (Ellegaard et al. 2017).

5.5 Förbättringsförslag för fortsatta studier

En aspekt som kunde ha gjort avgörandet om cellerna var vegetativa eller i vilostadie enklare skulle ha varit att använda sig av fluorescensmikroskopi. I fluorescensmikroskopi lyser klorofyllet i vegetativa celler klarrött medan det inte gör det i vilostadier. För att utföra fluorescensmikroskopi behövs ett skilt fluorescensmikroskop, vilket är dyr utrustning.

Som kommit fram på flera ställen i denna avhandling har de använda melatoninkoncentrationerna inte varit de mest lämpliga för att besvara de frågor som sattes upp. För att vara säker på att man använder de mest lämpliga koncentrationerna borde man göra en gradient av melatoninkoncentrationer och testa de en åt gången. I detta fall fanns det inte tid eller resurser för det.

De körda experimenten har till största delen testats på endast en art, *S. marinoi*, vilket antagligen inte ger hela sanningen av hur kiselalger påverkas av melatonin. I fortsättningen skulle rekommenderas att köra samma experiment på till exempel dinoflagellater eller någon annan encellig organismgrupp. Liknande experiment har gjorts på till exempel dinoflagellater och bakterier (Delebecq et al. 2020., Jiau et al. 2016).

6 Slutsatser

Enligt mina resultat skulle melatonin inte påverka återuppväckningen av vilostadier, ha en negativ effekt på tillväxten av vegetativa celler och ha en positiv inverkan på bildandet av nya vilostadier. Som slutsatser skulle jag använda melatonin för att bilda nya vilostadier men skulle inte rekommendera att använda melatonin, åtminstone de använda koncentrationerna, för återuppväckning av vilostadier eller för att öka tillväxten av vegetativa celler. Det behövs ytterligare forskning för att få en tydlig slutsats. Detta ämne är ganska nytt och det har inte gjorts många forskningar om detta. Detta är första gången som melatoninets effekt på vilostadier av kiselalger från Östersjön har testats.

7 Tackord

Först och främst vill jag tacka min handledare Conny Sjöqvist för all hjälp och allt stöd som jag fått under hela gradu processens gång. Tack Conny för att jag fått vara en del av ett superintressant och roligt projekt och för att du har funnits med hela vägen från start till slut. Jag har aldrig behövt vara orolig för att fråga hjälp eller fråga potentiellt dumma frågor vilket har varit en trygghet. Jag har lärt mig en massa under denna gradu process och fått ett stort intresse för växtplankton. Bättre handledare får man söka efter!

Jag vill också tacka Janni Heikkinen för hjälpen som jag fick i början av labb processen när jag var helt nybörjare med labbande och mikroskoperande. Jag har också alltid kunnat fråga hjälp om jag behövt det. Vill också tacka resten av medlemmarna i det som jag kallar för "plankton group", ni vet vilka ni är :), för alla väldigt intressanta diskussioner och all konstruktiv feedback som jag fått från er. Slutligen vill jag tacka Husö Biologiska station för möjligheten att slutföra mina experiment där. Det nya mikrolabbet är ypperligt för denna typs experiment.

8 Referenslista

- A. Andersson, H.E.M. Meier, M. Ripszam, O. Rowe, J. Wikner, P. Haglund, K. Eilola, C. Legrand, D. Figueroa, J. Paczkowska, E. Lindehoff, M. Tysklind och R. Elmgren. 2015. Projected future climate change and Baltic Sea ecosystem management. *Ambio*: 44: 345–356
- V. Andrisano, C. Bertucci, A. Battaglia och V. Cavrini. 2000. Photostability of drugs: photodegradation of melatonin and its determination in commercial formulations. *J. Pharm. Biomed.*: 23: 15-23
- S.C. Argawal. 2009. Factors Affecting Spore Germination in Algae — review. *Folia Microbiol.*: 54: 273-302
- M.B. Arnao och J. Hernández-Ruiz. 2006. The Physiological Function of Melatonin in Plants. *Plant Signal. Behav.*: 1: 89-95

- M.B. Arnao och J. Hernández-Ruiz. 2014. Melatonin: plant growth regulator and/or biostimulator during stress? *Trends Plant Sci.*: 19: 789-797
- I. Balzer och R. Hardeland. 1996. Melatonin in Algae and Higher Plants - Possible New Roles as a Phytohormone and Antioxidant. *Plant Biol.*: 109: 180-183
- C.J. Band-Schmidt, L. Morquecho, C.H. Lechuga-Devéze och D.M. Anderson. 2004. Effects of growth medium, temperature, salinity and seawater source on the growth of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) from Bahía Concepción, Gulf of California, Mexico. *J. Plankton Res.*: 26: 1459–1470
- L.E. Brand. 1981. Genetic Variability in Reproduction Rates in Marine Phytoplankton Populations. *Evol.*: 35: 1117-1127
- L. Brendonck och L. De Meester. 2003. Egg banks in freshwater zooplankton: evolutionary and ecological archives in the sediment. *Hydrobiologia*: 491: 65-84
- V.A. Chepurinov, D.G. Mann, K. Sabbe och W. Vyverman. 2004. Experimental studies on sexual reproduction in diatoms. *Int. Rev. Cytol.*: 237: 91-154
- E. Costas, S. Gonzalez Gil, A. Aguilera och V. Lopez Rodas. 1993. An apparent growth factor modulation of marine dinoflagellate excystment. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*: 166: 241-249
- G. Delebecq, S. Schmidt, A. Ehrhold, M. Latimier och R. Siano. 2020. Revival of ancient marine dinoflagellates using molecular biostimulation. *J. Phycol.*: 1-13
- DOC-050.000. 2020. K medium. Bigelow (Natural Center for Marine Algae and Microbiota): 1-3
- M. Ellegaard och S. Ribeiro. 2018. The long-term persistence of phytoplankton resting stages in aquatic ‘seed banks’. *Biol.*: 93: 166-183
- M. Ellegaard, M.R.J. Clokie, T. Czypionka, D. Frisch, A. Godhe, A. Kremp, A. Letarov, T.J. McGenity, S. Ribeiro och N.J. Anderson. 2020. Dead or alive: sediment DNA archives as tools for tracking aquatic evolution and adaptation. *Commun. Biol.*: 3:169: 1-11
- M. Gareis. 2021. Anpassning hos kiselalgen *Skeletonema marinoi* till stigande vattentemperaturer under 1900-talet (Pro-gradu avhandling). Hittas från Doria <https://urn.fi/URN:NBN:fi-fe202201031085>
- A. Godhe, A. Kremp och M. Montresor. 2014. Genetic and Microscopic Evidence for Sexual Reproduction in the Centric Diatom *Skeletonema marinoi*. *Protist*: 165: 401-416
- R.R.L. Guillard. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates i boken Culture of Marine Invertebrate Animals av W.L.Smith och M.H.Chansley. *Plenum Press, New York, USA*: 26-60
- M. Hansson, L. Andersson och P. Axe. 2011. Areal Extent and Volume of Anoxia and Hypoxia in the Baltic Sea, 1960-2011. *Rep. Oceanogr.*: 42: 1-76
- R. Hardeland och B. Poeggeler. 2003. Non-vertebrate melatonin. *J. Pineal Res.*: 34: 233-241
- R. Hardeland, S.R. Pandi-Perumal och B. Poeggeler. 2007. Melatonin in Plants – Focus on a Vertebrate Night Hormone with Cytoprotective Properties. *Funkt. Plant Biol.*: 1-14
- R. Hardeland. 2015. Melatonin in plants and other phototrophs: advances and gaps concerning the diversity of functions. *J. Exp. Bot.*: 66: 627-646

B.T. Hargrave. 1972. Aerobic decomposition of sediment and detritus as a function of particle surface area and organic content. *Limnol. Oceanogr.*: 17: 583-586

T.C. Hazen. 2009. Biostimulation. *Springer Verlag, United states*: 4517-4530

HELCOM, 2009 Eutrophication in the Baltic Sea – An integrated thematic assessment of the effects of nutrient enrichment and eutrophication in the Baltic Sea region. *Balt. Sea Environ. Proc.* No. 115B

O. Heiri, A.F. Lotter och G. Lemcke. 2001. Loss on ignition as a method for estimating organic and carbonate content in sediments: reproducibility and comparability of results. *J. Paleolimnol.*: 25: 101-110

K. Härnström, M. Ellegaard, T.J. Andersen och A. Godhe. 2011. Hundred years of genetic structure in a sediment revived diatom population. *PNAS*: 108: 1-6

J. Jiao, Y. Ma, S. Chen, C. Liu, Y. Song, Y. Qin, C. Yuan och Y. Liu. Melatonin-Producing Endophytic Bacteria from Grapevine Roots Promote the Abiotic Stress-Induced Production of Endogenous Melatonin in Their Hosts. *Front. Plant Sci.*: 7: 1-13

S.A. Jokinen, J.J. Virtasalo, T. Jilbert, J. Kaiser, O. Dellwig, H.W. Arz, J. Hänninen, L. Arppe, M. Collander, och T. Saarinen. 2018. A 1500-year multiproxy record of coastal hypoxia from the northern Baltic Sea indicates unprecedented deoxygenation over the 20th century. *Biogeosciences*: 15: 3975-4001

P.R. Jonsson, J. Kotta, H.C. Andersson, K. Herkül, E. Virtanen, S.A. Nyström och K. Johannesson. 2018. High climate velocity and population fragmentation may constrain climate-driven range shift of the key habitat former *Fucus vesiculosus*. *Diversity and Distributions*. 24: 892-905

K. Jumppanen och J. Mattila. 1994. Saaristomeren tilan kehitys ja siihen vaikuttavat tekijät. *Lounais-suomen vesiensuojeluyhdistys R.Y. upplaga 82 Turku*: 5-197

W.C. Kerfoot, J.A. Robbins och L.J. Weider. 1999. A new approach to historical reconstruction: Combining descriptive and experimental paleolimnology. *Limnol. Oceanogr.*: 44: 1232-1247

E.A.N. Marks, O. Montero och C. Rad. 2019. The biostimulating effects of viable microalgal cells applied to a calcareous soil: Increases in bacterial biomass, phosphorus scavenging, and precipitation of carbonates. *Sci. Total Environ.*: 692: 784-790

M. McQuoid, A. Godhe och K. Nordberg. (2002) Viability of phytoplankton resting stages in the sediments of a coastal Swedish fjord. *Eur. J. Phycol.*: 37: 191-201

S.R. Pandi-Perumal, V. Srinivasan, G.J.M. Maestroni, D.P. Cardinali, B. Poeggeler och R. Hardeland. 2006. Melatonin Nature's most versatile biological signal? *FEBS J.*: 273: 2813-2838

Z. Paster och B.C. Abbott. 1970. Gibberellic Acid: A Growth Factor in the Unicellular Alga *Gymnodinium breve*. *Science*: 169: 600-601

- B. Poeggeler, I. Balzer, R. Hardeland och A. Lerchl. 1991. Pineal Hormone Melatonin Oscillates Also in the Dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Naturwissenschaften*: 78: 268-269
- I. Probert och C. Klass. 1999. Microbial culturing Practical notes from the culturing short course held in Caen, nofwords62201417cale100: 1-12
- R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- F.E. Round, R.M. Crawford och D.G. Mann. 1990. The Diatoms. *Cambridge University Press, Cambridge*: 1-741
- A. Sanyal, J. Larsson, F. van Wirdum, T. Andrén, M. Moros, M. Lönn och E. Andrén. 2019. Not dead yet: Diatom resting spores can survive in nature for several millennia. *bioRxiv preprint*: 1-31
- V. Saravanan och A. Godhe. 2010. Physiologic differentiation and genetic heterogeneity among seasonally separated clones of *Skeletonema marinoi* (Bacillariophyceae) in Gullmar Fjord, Sweden. *European Journal of Phycology*: 45: 177-190
- Seili.xlsx. Exeltabell gjord av flera forskare runtom Östersjön.
- U. Sommer (2002). Competition and Coexistence in Plankton Communities. I: Competition and Coexistence. *Ecological Studies*, vol 161. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-56166-5_4
- K. Spilling, A. Kremp och T. Tamelander. 2006. Vertical distribution and cyst production of *Peridiniella catenata* (Dinophyceae) during a spring bloom in the Baltic Sea. *J. Plankton Res.*: 28: 659-665
- M.M Suplińska och Z. Pietrzak-Flis. (2008). Sedimentation rates and dating of bottom sediments in the Southern Baltic Sea region. *Nukleonika*: 53, suppl. 2: 105-111
- E. Swift och E.G. Durbin. 1971. Similarities in the asexual reproduction of the oceanic dinoflagellates, *Pyrocystis fusiformis*, *Pyrocystis lunula*, and *Pyrocystis noctiluca*. *J. Phycol.*: 7: 89-96
- R.L. Taylor, K. Abrahamsson, A. Godhe och S-Å. Wängberg. 2009. Seasonal variability in polyunsaturated aldehyde production potential among strains of *Skeletonema marinoi* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*: 45: 46-53
- S-T. Tsim, J.T.Y. Wong och Y.H. Wong. 1997. Calcium ion dependency and the role of inositol phosphates in melatonin-induced encystment of dinoflagellates. *J. Cell Sci.*: 110: 1387-1393
- N. Zhang, Q. Sun, H. Zhang, Y. Cao, S. Weeda, S. Ren och Y-D. Guo. 2015. Roles of melatonin in abiotic stress resistance in plants. *J. Exp. Bot.*: 66: 647-656
- N. Wasmund, G. Nausch och W. Matthäus. 1998. Phytoplankton spring blooms in the southern Baltic Sea—spatio-temporal development and long-term trends. *J. Plankton Res.*: 20: 1099-1117

9 Bilagor

Bilaga 1: Inställningarna på dataprogrammet för TECAN SPARK spektrofotometern

Fluorescence intensity

Name: FL

Mode: Top

Fluorophore: Other

Excitation wavelength [nm]: 430 (20)

Emission wavelength [nm]: 680 (30)

Flashes: 30

Gain: Extended dynamic range

Mirror: AUTOMATIC

Z-position [μm]: Calculated from well A1

Settle time [ms]: 10

Multiple reads per well: User defined

Type: Circle

Size: 4x4

Border [μm]: 550

Bilaga 2: Från fluorescensvärden till tillväxtrat

```
library(growthrates)
#check data
xyplot(FL ~ day|as.factor(treatment), data = FL_test_mean,
       groups = treatment, pch = 16, cex = 0.5)

#calculate growth rates
many_spline_fits <- all_splines(FL ~ day | replicate + treatment,
                               data = FL_test_mean, spar = 0.5)

#extract results
many_spline_res_all <- results(many_spline_fits)

#check results
many_spline_res_all
write.table(many_spline_res_all, "growth_rates.txt")
```

Bilaga 1: R skriptet som använts för att få fluorescensvärdena till tillväxtrat.