

Tartu Ülikool
Loodus- ja tehnoloogiateaduskond
Ökoloogia ja Maateaduste instituut
Botaanika õppetool

Mihkel Ristimäe

**Funktsionaalse mitmekesisuse roll fütoplanktoni koosluse
vastupanul oksüdatiivsele stressile**

Magistritöö

Juhendaja: Ph.D Kalle Olli

Tartu 2015

Sisukord

SISSEJUHATUS	3
1. BIOLOOGILINE MITMEKESISUS	4
FÜTOPLANKTONI MITMEKESISUS	4
2. FUNKTSIONAALNE MITMEKESISUS	6
FUNKTSIONAALSED TUNNUSED.....	6
FÜTOPLANKTONI FUNKTSIONAALSED TUNNUSED.....	7
FÜTOPLANKTONI FUNKTSIONAALSED RÜHMAD.....	8
FUNKTSIONAALSE MITMEKESISUSE VÄLJENDAMISEKS KASUTATAVAD INDEKSID	9
3. ÖKSÜDATIIVNE STRESS	11
ROS MÕJU VEEKOGUDE ÖKOSÜSTEEMILE JA FÜTOPLANKTERILE	12
4. MATERJAL JA MEETODID	13
4.1 EKSPERIMENDI ÜLESEHITUS	13
3.2 MÕÕTMISED.....	15
3.3 KATSETE TEOSTUS	16
3.3.1 Pilootkatse.....	16
3.3.2 Lõppkatsete teostus	16
3.4 STATISTILISED MEETODID	18
5. TULEMUSED	19
5.1 STRESSORI AKUUTNE MÕJU MONOKULTUURIDELE	19
5.2 STRESSORI PIKAAJALINE MÕJU MONOKULTUURIDELE	20
5.2 STRESSORI PIKAAJALINE MÕJU POLÜKULTUURIDELE	22
6. ARUTELU	27
KOKKUVÕTE	31
SUMMARY	32
TÄNUSÕNAD	33
KASUTATUD KIRJANDUS	34
LISAD	38

Sissejuhatus

Oksüdatiivset stressi põhjustavad reaktiivsed hapnikuühendid, mis on tekkinud ultraviolettkiirguse ja loodusliku orgaanilise aine omavahelisest interaktsioonist ning võivad veekogudes kasvada suurte kontsentratsioonideni (Xenopoulos, Bird, 1997). Kõige püsivamaks reaktiivseks hapnikuühendiks on vesinikperoksiid (H_2O_2), mis on võimeline liikuma läbi rakumembraani (Lesser, 2012), tekitades sellega kahjustusi makromolekulidele (DNA, RNA, lipiidid, proteiinid; Xenopoulos & Bird, 1997) ja klorofüllile. See omakorda mõjutab fütoplanktoni fotosünteesiaparaati, fotosünteesi efektiivsust ja läbi selle ka eluiga ning produktiivsust (Lesser, 2012; Wong *et al.*, 2002).

Varasemalt on teostatud akuutseid katseid, mis uurivad oksüdatiivse stressi negatiivseid mõjusid fotosünteesi efektiivsusele, kuid neid on vähe ja valdav osa neist keskendub sinivetikatele, mille tundlikus stressorile on suur (Xenopoulos & Bird, 1997). Akuutse mõju uurimiseks on enamasti kasutatud mitme stressifaktori koosmõju (ultraviolettkiirguse ja vesinikperoksiidi mõju) fotosünteesi efektiivsusele, mistõttu on andmed ainult oksüdatiivse stressori kohta tihti vasturääkivad ja ebapiisavad (Xenopoulos & Bird, 1997; Barrington and Shadouan, 2008).

Bioloogilise mitmekesisuse ja liigirikkuse seisukohast on oluline teada, mis on oksüdatiivse stressori pikaajaline toime ning kuidas see mõjutab ökosüsteemi funktsioneerimist ja stabiilsust (Loreau *et al.*, 2001). Pikaajalise toime ennustamine on aga keeruline, sest plankterite vesinikperoksiidi lagundamise kiirused on liigiti varieeruvad. Teada on, et sinivetikatele võib juba väike doos osutada letaalseks ning rohe- ja ränivetikad on stressi suhtes resistentsemad, kuid millest see on tingitud, pole teada (Drabkova *et al.*, 2007; Xenopoulos & Bird, 1997; Lesser, 2012).

Käesoleva uurimustöö eesmärk on anda ülevaade uurimustest, mis on käsitletud fütoplankterite biodiversiteeti, funktsionaalset mitmekesisust ja oksüdatiivset stressi. Töö praktilises osas on uuritud oksüdatiivse stressori mõju fütoplankterite fotosünteesi efektiivsusele ja selle sõltuvust funktsionaalsest mitmekesisusest. Töö peamine hüpotees on, et kõrgem funktsionaalne mitmekesisus leevendab oksüdatiivse stressori (vesinikperoksiidi; H_2O_2) mõjusid.

1. Bioloogiline mitmekesisus

Bioloogiline mitmekesisus on ökosüsteemide toimimise üheks oluliseks indikaatoriks, mis võimaldab vaadata muutusi nii ajas kui ruumis. Seda saab kasutada erinevate ökosüsteemide hindamiseks ja seireks (Chiarucci *et al.*, 2011), kuna hõlmab kõiki elusorganisme, nende omavahelisi interaktsioone, kui terveid kooslusi (Mouchet *et al.*, 2010). Mitmekesisus on oluline ka ökosüsteemide stabiilsusele. Suur bioloogiline mitmekesisus toimib looduses puhvrina, stabiliseerides ökosüsteemi funktsioone (näiteks produktsiooni) keskkonna muutlikkuse tingimustes (Loreau *et al.*, 2001).

Bioloogilise mitmekesisuse enim kasutatud indikaatoriks on liigiline mitmekesisus, mis korreleerub tugevasti ka teiste indikaatoritega, nagu geneetiline mitmekesisus ja ökosüsteemi funktsionaalsus (Chiarucci *et al.*, 2011). Olenemata suurest kasutatavusest ökoloogide seas, kaasneb liigirikkuse mõõtmisega komplikatsioone (Chiarucci *et al.*, 2011). Peamiseks puuduseks on just loendusmeetod, mis põhineb erinevate liikide määramisel, jättes arvestamata nende arvukuse (Galotelli & Colwell, 2013; Chiarucci *et al.*, 2011). Usaldusväärsete tulemuste saamiseks on uuringusse vaja kaasata rohkem kui üht muutujat (liikide arv), mistõttu on ökoloogide seas leidnud laialdast kasutust Sahannon-Wieneri ja Simpsoni indeksid. Mõlema indeksi tööpõhimõte lähtub vektorite moodustamisest ja korratuse mõõtmisest, mis võimaldab teha reaalseid hinnanguid uuritava ökosüsteemi liigilisest koosseisust (Masisi *et al.*, 2008). Sellised meetodid võimaldavad hinnata süsteemi entroopiat ehk korratust (Chiarucci *et al.*, 2011).

Fütoplanktoni mitmekesisus

Fütoplankton on polüfüleetiline rühm, mille evolutsioon algas umbes 3,5 miljardit aastat tagasi sinivetikate tekkega. Erinevalt maismaataimedest on tegemist mikroorganismidega, millel puuduvad lehed, varred ja juured ning mis on kohastunud pidevaks eluks vee pindmises kihis, kuhu jõuab fotosünteesiks vajalik päikesevalgus (Lee *et al.*, 2010). Evolutsiooni tulemusena on see mitmekesine organismide rühm jaotunud kaheks suureks grupiks: eukarüootid ja prokarüootid. Prokarüootid on kahest grupist vanim ja tekkis maale umbes 3,5 miljardit aastat tagasi. Prokarüootide ainukeseks oksügeenseks fotoautotroofide rühmaks on tsüaanobakterid ehk sinivetikad (*Cyanobacteria*). Nende nimi (*Cyanobacteria*) rõhutab

fülogeneetilist kuulumist just bakterite hulka, mida kinnitab ka ehituslik olemus ja organellide puudumine (puuduvad plastiidid, mitokonder, Golgi aparaat ja membraaniga ümbritsetud tuum). Oluline areng, mille tulemusena kaks suurt gruppi lahkesid, tuleneb eukariootide ja bakterite omavahelisest endosümbioosist, mis läbi evolutsiooni viis plastiidi (kloroplasti) tekkeni vabalt elavast tsüanobakterist (Lee *et al.*, 2010; Reynolds, 2006). Erinevalt prokarüootidest on eukariöödid päristuumsed, millele on iseloomulik kaksikmembraaniga ümbritsetud rakutuum, mitokondrid, Golgi kompleks ja muud eukariöotsed organellid. Rakku katab rakumembraan, mis reguleerib ja kontrollib protoplasmasse liikuvate ainete sisse- ja väljavoolu. Liikumiseks on osadel fütoplankteritel olemas vibur. (Lee *et al.*, 2010; Reynolds, 2006). Olenemata liigitusest on fütoplankterid väga olulised nii inimesele kui ka loodusele (Giovanni & Stingl, 2005).

2. Funktsionaalne mitmekesisus

Funktsionaalne mitmekesisus (edaspidi FD, mis on tuletatud inglise keelsest mõistest *functional diversity*) on mitmekesisuse komponent, mis mõjutab ja reguleerib ökosüsteemi funktsioneerimise dünaamikat, stabiilsust, produktiivsust, toitainete tasakaalu ja palju teisi aspekte. Erinevalt bioloogilisest mitmekesisusest ei lähtuta FD mõõtmisel mitte liikide arvust, vaid mõõdetavatest tunnustest, mis mõjutavad ühte või mitut ökosüsteemi funktsiooni (Tillman *et al.*, 2001). Tunnuste väärtusi kasutatakse mitmedimensionaalse koordinaatpilve koostamisel, kus iga koordinaat vastab teatud liigile tunnusruumis (Schleuter *et al.*, 2010). Sellise lähenemine võimaldab uurida ökosüsteemide erinevate protsesside, pakutavate teenuste ja keskkondlike muutuste vastastikmehhanisme (Gray, 1997, Laliberte & Legendre, 2010). Eeliseks on ka informatsioon, mis võimaldab luua põhjuslikke seoseid ökosüsteemi funktsioneerimise ja liikide tunnuste vahel. Erinevate seoste ja funktsioonide põhiselt saab uurida keskkonna ja liikide omavahelisi interaktsioone, millest võib teha järeldusi, miks teatud liigiline koosseis on tekkinud (Devictor *et al.*, 2010; Petchey & Gaston, 2002). Kuigi funktsionaalse mitmekesisuse konseptsioon on võrdlemisi kergesti mõistetav, on hiljutised uuringud näidanud, et selle mõõtmine on osutunud keeruliseks (Schleuder *et al.*, 2010).

Funktsionaalsed tunnused

Funktsionaalsed tunnused on fenotüübi osad, mis mõjutavad erinevaid protsesse ökosüsteemis ja määravad ära liikide rolli selle funktsioneerimisel (Petchey & Gaston, 2006; Cadotte *et al.*, 2011). Tunnuseks võib olla ükskõik milline omadus, mis potentsiaalselt mõjutab organismi kohasust. See võib olla füüsiline, biokeemiline, käitumuslik või fenoloogiline (Cadotte *et al.*, 2011; Violle & Jiang, 2009; Verbeck *et al.*, 2013).

Erinevalt taksonoomilisest lähenemisest võimaldavad funktsionaalsed tunnused tuua põhjuslikke seoseid liigi ja keskkonna vahel. Tunnuste põhiselt saab uurida ökosüsteemi poolt pakutavate teenuste (elupaigad, toit) kasutust ning teha järeldusi uuritava piirkonna mitmekesisuse kohta - püsima jäävad liigid, millel on vastava keskkonna suhtes vajalikud adaptatsioonid (Verbeck *et al.*, 2013). Muutused keskkonnas reguleerivad ka ökosüsteemi liigilist ja funktsionaalset koosseisu, sest erinevad looduslikud ja antropogeensed häired võivad muuta väljakujunenud adaptatsioonide olulisust. Ressurside ümberjaotused ja tunnuste muutused on mitmekesisuse seisukohast erakordselt olulised, sest võimaldavad hinnata liikide

ja mitmekesisuse püsijäämist (Verbeck *et al.*, 2013).

Fütoplanktoni funktsionaalsed tunnused

Fütoplanktonite funktsionaalseid tunnuseid määrates lähtutatakse nende morfoloogiast, sest see on tugevasti seotud funktsionaalsete omadustega nagu suurus, vajumise kiirus, toitainete omastamine, herbivooria ja populatsiooni suurus ning selle biomass (Kruk *et al.*, 2010; Litchman *et al.*, 2007).

Toitainete kättesaadavust mõjutab enim just suurus - fütoplanktoni suurus ja kuju määrab ära raku pindala ja ruumala omavahelise suhte, mis otseselt mõjutab toitainete omastamist. Ellujäämise seisukohast on oluline ka fütoplanktonite liikuvus ehk mootorika. Mobiilsed plankterid on võimelised migreeruma soodsamatesse pelaagilistesse kihtidesse, mis tagab neile parema toitumis- ning valgustingimused ja võimaldab vältida settimist. Liikuvus soodustab toitainete kiiremat omandamist, sest selle käigus õheneb difusiooni piirkiht raku ümber (Weithoff, 2003). Ökosüsteemides, kus lämmastik piirab kasvu, saavad eelise sinivetika liigid, mis on võimelised siduma õhulämmatikku (Lee *et al.*, 2010).

Fütoplanktonit mõjutavad oluliselt veetemperatuur ja valgustingimused, mis reguleerivad fotosünteesi kaudu toimuvat süsiniku sidumist ning respiratoorseid vajadusi (Reynolds, 2006; Harvey *et al.*, 2013).

Raku suurus kui oluline tunnus

Väiksemate mõõtmetega plankterid (alla 5 μm) omavad eelist keskkonnas, kus toitained on limiteeritud. Väiksemad rakumõõtmed tähendavad, et raku pindala ja ruumala suhe on toitainete omastamiseks soodsam (Mousing *et al.*, 2014). Kuigi suured rakud ei ole toitainete omastamises nii efektiivsed kui väikesed, esineb neil teatud tunnuseid, mis seda kompenseerivad. Suured mõõtmed on kasulikud olukorras, kus toitainete kättesaadavus on kõiguv, sest vakuoolid on võimelised neid varuma. Kuna mõõtmed reguleerivad ka plankterite vajumist, siis sõltuvalt keskkonnast ja sealsetest häiringutest, võivad need ära määrata elukestvuse (Lichtman *et al.*, 2010). Kuigi väiksemad plankterid omavad eelist toitainete omandamises, on nad kergemini omastatavad zooplankterite poolt (Weithoff, 2003).

Pigmendiline koosseis

Fütoplanktoni rakud neelavad valgust fotosünteesivate pigmentidega. Pigmentid neelavad footoneid kindlatest spektri piirkondadest, peegeldades teisi lainepikkuseid samaaegselt tagasi (Stomp *et al.*, 2004). Peamisteks fotosünteesivateks pigmentideks on erinevad klorofüllid

vormid, fükobiliinid ja karotinoidid, mis on heas kooskõlas fütoplanktoni taksonoomilise kuuluvuse (Lee, 2008).

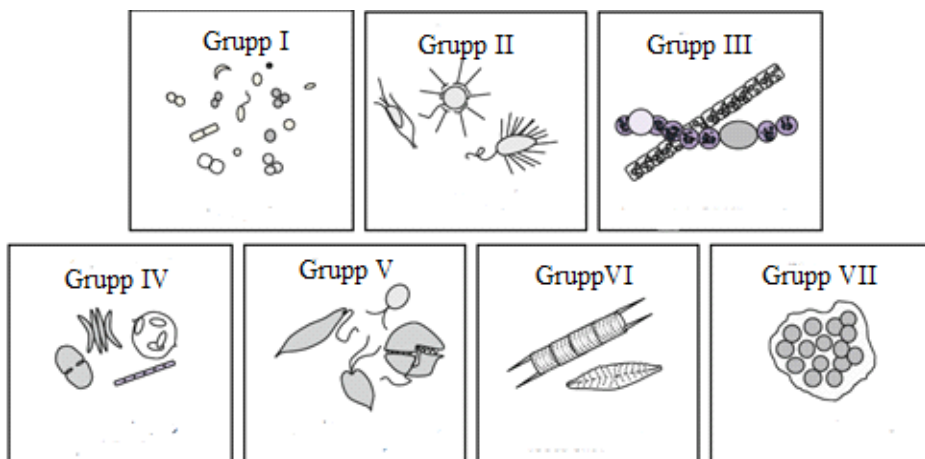
Pigmendilisest koosseisust sõltub millistel lainepikkustel ja intensiivsustel on plankterid võimelised valgust püüdma. Arvestades, et valgustingimused on isegi homogeenes keskkonnas – nagu näiteks meri – ikkagi võrdlemisi vahelduvad, siis liikide mitmekesisuse kujunemisel saab oluliseks just plankterite võime fotosünteesida ka kehvades valgustingimustes (Stockenreiter *et al.*, 2013).

Fütoplanktoni funktsionaalsed rühmad

Funktsionaalse mitmekesisuse mõõtmine on võrreldav tunnuste jaotumisega multidimensionaalses ruumis (Mouchet *et al.*, 2010), mis tähendab, et enne kui FD-d saab mõõta, tuleb kindlaks teha liikide tunnused ning jaotada need rühmadesse (Petchey & Gaston, 2002. Petchey & Gaston, 2006). Rühmadesse jaotatakse liigid, kellel on sarnane mõju ökosüsteemile (Diaz & Cabido, 2001). Selline meetodika ei lähtu klassifitseerimisel taksonoomiast, küll aga võib korreleeruda taskonoomiaga, juhul kui funktsionaalsed tunnused on fülogeneesis konserveerunud (Kruk *et al.*, 2010).

Kruk *et al.* (2010) on fütoplanktonid jaotanud seitsmesse funktsionaalsesse gruppi (joonis 1):

1. väikesed. suure eripinnaga organismid (S/V);
2. väikesed viburiga organismid, mil esinevad rakuvälised ränist struktuurid;
3. suured niitjad aerotoopidega fütoplankterid;
4. keskmise suurusega eritunnuseta organismid;
5. üherakulised viburiga varustatud keskmised kuni suured organismid;
6. ränipantsriga viburita organismid;
7. suured limajad kolooniad.



Joonis 1. Fütoplanktoni seitse morfoloogiapõhist funktsionaalset rühma (Kruk *et al.*, 2010)

Funktsionaalse mitmekesisuse väljendamiseks kasutatavad indeksid

Funktsionaalse mitmekesisuse indeksid uurivad, kui suur osa uuritavast ökosüsteemist on erinevate liikide ja nende tunnuste poolt hõivatud (Schleuter *et al.*, 2010). Mõõtmiseks kasutatakse mitmeid indekseid, mis võimaldavad tunnustepõhiselt anda erinevaid hinnanguid ökosüsteemide kohta (Schleuter *et al.*, 2010; Petchey & Gaston, 2006). Levinuimad on neli erinevat mitmedimensionaalset indeksit, mis koosnevad pidevate tunnuste väärtustest ja kirjeldavad erinevaid FD aspekte: funktsionaalne rikkus (edaspidi FRic, mis on tuletatud inglise keelsest mõistest *functional richness*), funktsionaalne ühtlus (edaspidi FEve, mis on tuletatud inglise keelsest mõistest *functional evenness*), funktsionaalne lahknemine (edaspidi FDiv, mis on tuletatud inglise keelsest mõistest *functional divergence*; Mason *et al.*, 2005) ja funktsionaalne dispersioon (edaspidi FDis, mis on tuletatud inglise keelsest mõistest *functional dispersion*; Laliberte & Legendre, 2010).

FRic ehk funktsionaalse rikkuse indeks mõõdab, kui suur osa niširuumist on mingite koosluste liikide poolt hõivatud (Schleuter *et al.*, 2010). FRic mõõtmisel lähtutakse kas ühest või mitmest tunnusest, mille põhiselt arvutatakse erinevate liikide jaotus tunnuseruumis. Kui uuritavaks on ainult üks tunnus, siis selle väärtus saab olla vahemikus 0-100% (Mason *et al.*, 2005). Mitme tunnuse puhul tuleb kasutada multidimensionaalset mõõdet, mis kaasab arvutusse koosluse erinevad äärmuslikud väärtused. See tähendab, et kui mõne liigi tunnus jääb koosluse miinimumi ja maksimumi vahele, siis ei mõjuta see FRic väärtust (Villegger *et al.*, 2008).

FEve mõõdab liikide ja nende funktsionaalsete tunnuste jaotuse ühtlust. Uuritakse, kas liikide omadused on tunnuseruumis jaotunud regulaarselt ehk omavad sarnaseid väärtuseid lähimate naabritega (Schleuter *et al.*, 2010). Indeksi arvutamisse kaasatakse tunnuste ühtlus nii liigisiselt kui ka liikide vaheliselt, näidates sellega ära ökosüsteemide erinevate nišide hõivatus (mis suurusel, milliste liikide poolt). See tähendab, et kui FEve on madal, siis teatud ökosüsteemide nišides on tunnused jaotunud ebahetlaselt, mistõttu ei kasutata ära nende täit potentsiaali (Villegier *et al.*, 2008).

FDiv mõõdab liikide funktsioonide varieeruvust ja nende jaotust/koondumist tunnuseruumis (Schleuter *et al.*, 2010). FDiv arvutamisel lähtutakse ühest või mitmest tunnusest (Mason *et al.*, 2005). Arvutades seda ühest tunnusest, saadakse teada, kuidas on funktsionaalsete tunnuste arvukus uuritavas ökosüsteemis jaotunud. Mitu tunnust võimaldab vaadata, kuidas on liikide arvukus erinevate funktsionaalsete tunnuste vahel jaotunud (Villegier *et al.*, 2008). Madal divergents tähendab, et arvukamate liikide funktsionaalsed tunnused on populatsiooni keskmisega sarnased, mistõttu on liikide vahelised erinevused väikesed ja konkurentssressursside pärast suur. Suur divergents eeldab aga keskmisest äärmuslikemaid väärtusi, mis annaksid eelise olemusvõitlusel ja tõstaks ressursside kasutamise efektiivsust (Villegier *et al.*, 2008; Mason *et al.*, 2005).

FDis on üksikute ja kõikide tunnuste vaheline keskmine kaugus mitmemõõtmelises tunnuseruumis. See võimaldab arvutada funktsionaalset mitmekesisust, nihutades selleks arvukama liigi väärtust populatsiooni keskmise väärtuse suunas, millest arvutatakse keskmine dispersioon. Keskmise dispersiooni ja üksikute liikide vaheliste kauguste põhiselt mõõdetakse tunnuste väärtust. FDis on keskmise absoluutse kõrvalkalde indeksi (MAD, mis tuleneb inglise keelsest sõnast *mean absolute deviation*) analoog, kus mitmete erinevate muutujate kaasamine võimaldab likvideerida FD arvutamise potentsiaalsed vead, mis on tingitud liigirikkkuse kaasamisest (Laliberte & Legendre, 2010).

3. Öksüdatiivne stress

Looduses esineb aatomeid ja molekule, mis omavad paardumatta elektrone (radikaalid), mis on ebastabiilsed ja väga reaktiivsed, sest moodustavad paare teiste elektronidega. Selline protsess kutsutakse esile hapniku redutseerumise, mis põhjustab oksüdatiivset stressi (seisund, kus oksüdatsioon ületab antioksidandi süsteemi lävendi, muutes sellega nende omavahelist tasakaalu; Yoshikawa & Naito, 2002). Redutseerumine võib toimuda kahel viisil: otsene nelja elektroni redutseerumine hapnikust vette ja kahe elektroni redutseerumine vesinikperoksiidiks. Oksüdatiivne stress kujutab endast suurt ohtu, sest kahjustab rakke, makromolekule (DNA, RNA, lipiidid, proteiinid) ning tapab baktereid (sinivetikad; Xenopoulos & Bird, 1997). Enim levinud oksüdatiivse stressori allikateks looduses on reaktiivsed hapnikuühendid (Xenopoulos & Bird, 1997).

Reaktiivsed hapnikuühendid (edaspidi ROS, tuleneb inglise keelsest sõnast *reactive oxygen species*) kuuluvad molekulide perekonda, mis sisaldavad väga reaktiivseid vabu hapnikuradikaale (nt superoksiidanioon ja hüdroksiülradikaali; Gough & Cotter, 2011). ROS (nt vesinikperoksiid) on tekkinud ultraviolettkiirguse ja loodusliku orgaanilise aine omavahelisest interaktsioonist ning nende sisaldus võib tõusta suurte kontsentratsioonideni, põhjustades oksüdatiivset stressi (Xenopoulos & Bird, 1997).

Reaktiivsete hapnikuühendite toksilisus on tingitud nende ehitusest: nende väliskihis on üks paardumatta elektron. On olemas ka ühendeid, mis omavad paaris molekule (H_2O_2), kuid mida kaasatakse siiski ROS hulka. See on tingitud nende aatomite rühma ebastabiilse O-O sideme tõttu, mille katkemisel vabanevad loodusesse väga reaktsioonivõimelised radikaalid (HO; Lesser, 2012).

Kuigi veekogudes leidub reaktiivseid hapnikuühendeid, siis nende kontsentratsioonid varieeruvad piirkonniti (Sullivan *et al.*, 2005). Varieeruvused on tingitud nii piirkondade eripäradest (kliima) kui ka antropogeensetest mõjudest (Fabry *et al.*, 2008; Harvey *et al.*, 2012). Peamisteks allikateks peetakse fotokeemilisi reaktsioone, atmosfääri depositsiooni ja bioloogilist produktsiooni, millest fotokeemilise osatähtsus on kõige suurem (Wong *et al.*, 2002).

ROS mõju veekogude ökosüsteemile ja fütoplankterile

Looduses esineb veekogusid, kus ROS kontsentratsioonid on kõrged (Wong *et al.*, 2002). Konstratsioonid võivad ulatuda kuni 10 μM , kuid üldiselt on vahemikus 0,5-200 nM merevees ja kuni 800 nM järvedes (Xenopoulos & Bird, 1997). Oksüdatiivne stress veekogus võib põhjustada klorofüllide pleekimist, mutatsioone ja kahjustada rakumembraane, mis omakorda mõjutavad fotosünteesivõimet (Lesser, 2012; Wong *et al.*, 2002).

ROS lagundamise kiirus sõltub nii liigist, pigmendilisest koosseisust kui ka raku suuruselt (Wong *et al.*, 2002). Kuigi erinevad uurimustööd on käsitlenud oksüdatiivset stressi (Wong *et al.*, 2002; . Xenopoulos & Bird, 1997; Barrington & Ghadouani, 2008), siis nendes töödes ei ole uuritud oksüdatiivse stressi mõju fütoplanktoni fotosünteesiaparadaile ning selle sõltuvust funktsionaalsest mitmekesisusest.

4. Materjal ja meetodid

4.1 Eksperimendi ülesehitus

Eksperimendi eesmärk oli uurida oksüdatiivse stressi mõjusid fütoplanktonile ja selle sõltuvust koosluse funktsionaalsest mitmekesisusest. Katses on kasutatud kuut erinevat fütoplanktoni liiki (Tabel 1), kombineerides neid erineva funktsionaalse mitmekesisusega kunstlikeks kooslusteks. Oksüdatiivse stressi tekitajana kasutati apteegist ostetud hüdroperiiti, mis sisaldab vesinikperoksiidi (H_2O_2). Valituks osutus just vesinikperoksiid, sest selle leidumine looduslikes veekogudes on laialdane (Xenopoulos & Bird, 1997).

Oksüdatiivse stressori mõju uurimiseks katseorganismides mõõdetsin fotosünteesi kvantsaagist. Klorofüllü fluorestsents, selle erinevad väärtused ergastunud ja ergastumata olekus, võimaldavad välja arvutada fotosünteesi kvantsaagise ehk fotosünteesilise efektiivsuse (F_v/F_m), olles otseseks indikaatoriks fütoplanktoni füsioloogiale (madal F_v/F_m on indikaatoriks, et rakk on stressis; Schreiber *et al.*, 1998).

Stressori mõju fütoplanktoni fotosünteesiaparaadi toimimise uurimiseks teostati kokku kolm katseseeriat. Selle mõju uuriti ühes lühiajalises ja kahes pikaajalises katses. Lühiajalises katses mõõdeti oksüdatiivse stressori mõju üheliigilistele monokultuuridele. Selleks teostati kokku neli mõõtmiste seeriat erineva vesinikperoksiidi kontsentratsioonidega, mille järel mõõdeti PAM fluromeetriga F_v/F_m suhet iga minuti tagant kokku kümme minutit. Teine ja kolmas katse olid pikaajalisemad katsed, kestes kokku seitse päeva ja fotosünteesi kvantsaagist mõõdeti iga 24 tunni tagant. Teises katses vaadeldi vesinikperoksiidi pikaajalist mõju monokultuuridele, mis võimaldas uurida ka erinevate fütoplanktonite taastumiskiirust individuaalselt. Kolmandas katses kasutati kunstlikult koostatud multikultuure, toomaks välja funktsionaalse mitmekesisuse vastumehhanismi oksüdatiivsele stressile. Kasutatavad multikultuurid koosnesid kolmest, neljast, viiest ja kuuest erinevast liigist. Lühiajalistes katsetes teostati neli ja pikaajalistes katsetes kolm replikaati.

Tabel 1. Fütoplanktoni liigid ja nende funktsionaalsed tunnused. Binaarsed tunnused (0 – tunnus puudub; 1 – tunnus on olemas): Miksotroof – miksotroofia võime. Si – ränist rakuseina moodustamise võime. Liikuvus – viburi olemasolu. Fyco – fükobiliinide sisaldus. Chlb – klorofüll b sisaldus. Pidevad tunnused: Suurus – raku keskmine lineaarne mõõde (μm). S/V raku pindala ruumala suhe.

Liik	Miksotroof	Si (ränist)	Liikuvus	Fyco	Chlb	Suurus	S/V suhe
<i>Brachionas submarina</i> (rohevetikas)	0	0	1	1	0	6,69	1,45
<i>Monoraphidium contortum</i> (rohevetikas)	0	0	1	0	0	4,81	1,504
<i>Rhodomonas salina</i> (krüptomonaat)	0	1	0	0	0	4,44	1,83
<i>Thalassiosira nana</i> (ränivetikas)	0	0	1	0	1	5,45	3,286
<i>Isochrysis galbana</i> (haptofüüt)	0	0	0	0	1	4,62	9,104
<i>Pavlova lutheri</i> (haptofüüt)	1	0	0	1	0	5,90	1,2

Kasvutingimused

Kultuure kasvatati 100 ja 300 ml Erlenmayeri kolbides f/2 söötmes (retsept kättesaadav: <http://weis.science.oregonstate.edu/files/weis/Protocols/Symbiodinium/Algal%20cultures.pdf>) . Kultuuride ettekasvatamine teostati 300 ml kolbides ja eksperimentides kasutati 100 ml kolbe. Söötmed valmistati autoklaavitud ja filtreeritud (Whatman GF/F, klaaskiudfiltrit poori suurus 0,7 μm) Läänemere veest. Hea füsioloogilise seisundi tagamiseks lahjendati kultuure iga

päeva, vahetades välja 20% söötme ruumalast. Katseorganisme kasvatati looduslikku valgust imiteeriva valgustite all valguse pimeduse tsüklis 16:8h. Temperatuur hoiti püsivalt 17 °C juures.

3.2 Mõõtmised

Biomass

Katseorganismide biomassi määramiseks kasutasin osakesteloendurit CASY TT (Schärfe System, Saksamaa), mille tööpõhimõte seisneb elektrilise takistuse mõõtmisel. Veeproovi ruumala ja rakutiheduse määramiseks imetakse rakud läbi mõõtmiskapillaari. Raku kapillaarist läbimine põhjustab elektrilise takistuse tõusu, mille mõõtmise abil proovi rakutiheduse ja iga raku suuruse. Rakkude suurusest ja rakutihedusest on arvatav proovi biomass. Usaldusväärsete tulemuste saamiseks on oluline, et rakud läbiks kapillaari ühe kaupa, mistõttu on enne mõõtmist tehtud katseorganismidele 100-kordne lahjendus osakestevaba isotoonilise lahusega. Kuna katses käsitleti palju erineva tihedusega kultuure, kasutati osakesteloenduril 150 µm kapillaari. Kõiki mõõtmisi viidi läbi neljas korduses.

Fotosünteetilise efektiivsuse mõõtmine

Fotosünteetilise efektiivsuse määramiseks kasutasin analüsaatorit PhytoPam (tuleneb inglisekeelsest sõnast *pulse-amplitude-modulation*), mis kasutab klorofüllil fluorentsentsi määramiseks intensiivseid lühikesi valgussähvatusi. Analüsaator kasutab valgustamise protsessis nelja erineva värvusega diodi: sinine (470nm), roheline (520 nm), punakas (645 nm) ja tumepunane (665 nm). See võimaldab eristada liike nende klorofüllil ja kaaspigmenti põhiselt, sest eri pigmentide ergastumine on erinevatel lainepikkustel varieeruv. Pärast valgustust on klorofüllil seisund ergastunud ning naaseb normaalolekusse, milleks on kolm võimalust: 1) energia eraldumine fluorentsentsina; 2) fotokeemilised reaktsioonid; 3) energia eraldumine soojusena. Termodünaamika esimese seaduse põhjal moodustatud valem võimaldab fluorentsentsi mõõtes määrata fotosünteetilise efektiivsuse ja soojuse eraldumise (fluorentsents + fotokeemilised protsessid + eralduv soojus= 1; Heinz Walz GmbH, Saksamaa, 2003).

Fotosünteesi efektiivsuse mõõtmiseks kasutab PAM lühiajalist pulseerivat valgust, mille käigus ei toimu fotokeemilist sidumist. Katseorganisme valgustatakse lühiajaliselt erksa valgussähvatusiga, mis põhjustab PS II (fotosüsteem II) aktseptorite sulgumist. Tulemuste

saamiseks mõõdab Phyto-PAM fluorentsentsi aktiivsust enne pulseerivat valgust (F), maksimaalst fluorentsentsi väärtust valgussälvatuse ajal (F_m). Kahe mõõtmistulemuse erinevus annab varieeruva fluorentsentsi, s.t. fluorentsentsi tõusu, mis valgustuse ajal leidis aset (F_v=F_m-F). See võimaldab välja arvutada PS II efektiivsuse (F_v/F_m), mis arvutatakse valemiga: $F_v/F_m = (F_m - F)/F_m$ (Heinz Walz GmbH, Saksamaa, 2003). PS II efektiivsus, ehk fluorentsentsi kvantsaagis on rakkude füsioloogilise seisundi ja stressori mõju indikaator.

3.3 Katsete teostus

3.3.1 Pilootkatse

Pikaajaline stressijärgne taastumine

Pikaajaliste pilootkatsete eesmärgiks oli välja selgitada vesinikperoksiidi kogus, mis poleks katseorganismidele letaalne ning võimaldaks vaadata fütoplanktonite fotosünteesi efektiivsuse taastumist ja selle kiirust.

Enne kui uuriti vesinikperoksiidi mõju fotosünteesi efektiivsusele, pidid kõikidel kultuuridel olema sama summaarne ruumala ühes milliliitris, ehk liigi biomass. Pilootkatses oli kultuuride biomassiks 14 mg/L⁻¹, mida kasutati ka lõppkatses. Kuna pilootkatse eesmärgiks oli välja selgitada, millise millise vesinikperoksiidi koguse juures on kultuurid võimelised taastuma, siis teostati katsed, kus kasutati viite erinevat lahust: vesinikperoksiidi kontsentratsioon 0,05%, 0,15%, 0,25%, 0,35 % ja 0,5 %. Valituks osutus doos, kus vesinikperoksiidi kontsentratsioon oli 0,25%, sest polnud kultuuridele letaalne ja võimaldas uurida pikaajalist stressijärgset taastumist.

Akuutne mõju

Lühiajalistes katsetes kasutati ainult monokultuure. Nõuded liigi biomassile olid samad, mis pikaajalistes katsetes. Akuutse mõju uurimiseks panin Phyto-PAMi mõõteküveti 2 ml kultuuri, kus juurdelisatava 2 ml lahuse vesinikperoksiidi kontsentratsioon varieerus: 5%, 3,3%, 2,5%, 1,25% ja 0 % (vesinikperoksiidida kortroll). Enne igat katset vahetati vesinikperoksiidi poolt mõjutatud kultuur värske vastu. Kuna erinevad kontsentratsioonid andsid hea ülevaate, kuidas fotosünteesi efektiivsus on mõjutatud vesinikperoksiidist, siis kasutati neid ka lõppkatses.

3.3.2 Lõppkatsete teostus

Katseks kasutati lähtekultuure, mis võeti eelkasvatuskolbidest. Enne iga katse teostust kontrolliti kultuuride vastavust eelnevalt sätestatud parameetritele: F_v/F_m vähemalt 0,5, liigi biomass 14 mg/L^{-1} . Kui kultuuri biomass oli valitud kriteeriumist suurem, siis seda lahjendati $f/2$ söötmega.

Vajaliku biomassi ja hea tervisega katseorganismidele lisati oksüdatiivset stressorit, mille kontsentratsioon oli lühi- ja pikaajalistes katsetes erinev. Tervet protsessi korrati enne iga katseeset algust kõikide käsitlevate kultuuridega.

Akuutne mõju

Lühiajalistes katsetes lisati Phyto-PAM mõõteküvetti 2 ml katseorganismi raku suspensiooni, pärast mida teostati mõõtmisteseeria, kus Phyto-PAM mõõtis kultuuri fotosünteesi efektiivsust iga 60 sekundi tagant. Esimese mõõtmise järel (aeg 0) lisati mõõtmisküvetti oksüdatiivset stressorit viies erinevas kontsentratsioonis: vesinikperoksiidi 5%, 3,3%, 2,5%, 1,25% ja 0 % (vesinikperoksiidida kontroll). Üks mõõtmisteseeria kestis kokku 10 minutit (10 mõõtmist) ja iga erineva kontsentratsiooniga teostati neli replikaati.

Pikaajaline stressijärgne taastumine mono- ja polükultuuridel

Pikaajalistes katsetes oli kultuuride biomass, ruumala ja doseeritav oksüdatiivse stressori kontsentratsioon kõikides katsetes sama (rakukultuuri biomass 14 mg/L^{-1} , ruumala 40 ml, vesinikperoksiidi kontsentratsioon 0,25%). Mõõtmisteseeriad kestsid seitse päeva ja iga 24 tunni tagant teostati kultuuri fotosünteesi efektiivsuse mõõtmine. Kokku tegin iga katseorganismiga kolm replikaati.

Pikaajaliseid katseid oli kokku kaks. Esimeses katses mõõdeti fotosünteesi efektiivsust pärast oksüdatiivse stressori lisamist kõikidel monokultuuridel eraldi. Teises katses keskenduti multikultuuridele, kus vesinikperoksiidi mõju fütoplanktoni fotosünteesiaparatuurile mõõdeti kolme-, nelja- ja viieliigilistes (kõikide liikidega) koosseisudes. Polükultuuride moodustamiseks kasutati kolme liigirikkuse taset, kus igast tasemest valiti kaks maksimaalse ja kaks minimaalse funktsionaalse mitmekesisusega kooslust.

Monokultuuridega katsetes mõõtsin kultuuride esimese päeva F_v/F_m langust ning maksimaalset ja minimaalset F_v/F_m langust. Uurimaks, kuidas funktsionaalne mitmekesisus mõjutab polükultuuride stressijärgset taastumist, mõõtsin peale stressori lisamist F_v/F_m esimese päeva langust, taastumiskiirust ja taastumise täielikkust seitsemendaks päevaks.

3.4 Statistilised meetodid

Multikultuuridega katsete konstrueerimiseks kasutati programmi R 3.10.1 (R Development Core Team (2012) R: A language and environment for statistical computing R Foundation for Statistical Computing, <http://www.R-project.org>. ISBN: <http://www.R-project.org>).

Mitmeliigiliste koosseisude funktsionaalse mitmekesisuse arvutamiseks kasutati R paketti FD. FD pakett kasutab erinevaid funktsionaalseid tunnuseid (Tabel 1), mis võimaldavad arvutada koosluse funktsionaalse mitmekesisuse erinevaid indekseid. Kasutavateks indeksiteks on: funktsionaalne mitmekülgsus (FRic), tasasus (FEve), divergents (FDiv) ning tunnuste vaheline dispersioon (FDis; Laliberte *et al.*, 2015). Käesolevas töös uuriti oksüdatiivse stressori mõjusid kolme-, nelja-, viieliigilistes kooslustes. Kuna erinevate koosluste moodustamiseks on väga palju erinevaid kombinatsioone, arvutati eelnevalt igal liigirikkuse tasemel (3 – 5) kõigi võimalike liigikombinatsioonide funktsionaalse mitmekesisuse indeksid. Liigikombinatsioonide funktsionaalsed indeksid standardiseriti (keskväärtus = 0, standardhälve = 1) ning arvutati iga liigikombinatsiooni kohta indeksi keskvärtus. Laborikatseteks kasutati kahte kõrgeima ja kahte malalaima funktsionaalse mitmekesisusega kombinatsiooni igal liigirikkuse tasemel. Selline meetod võimaldab uurida, kas oksüdatiivse stressori mõju sõltub funktsionaalsest mitmekesisusest, sõltumatult liigirikkusest.

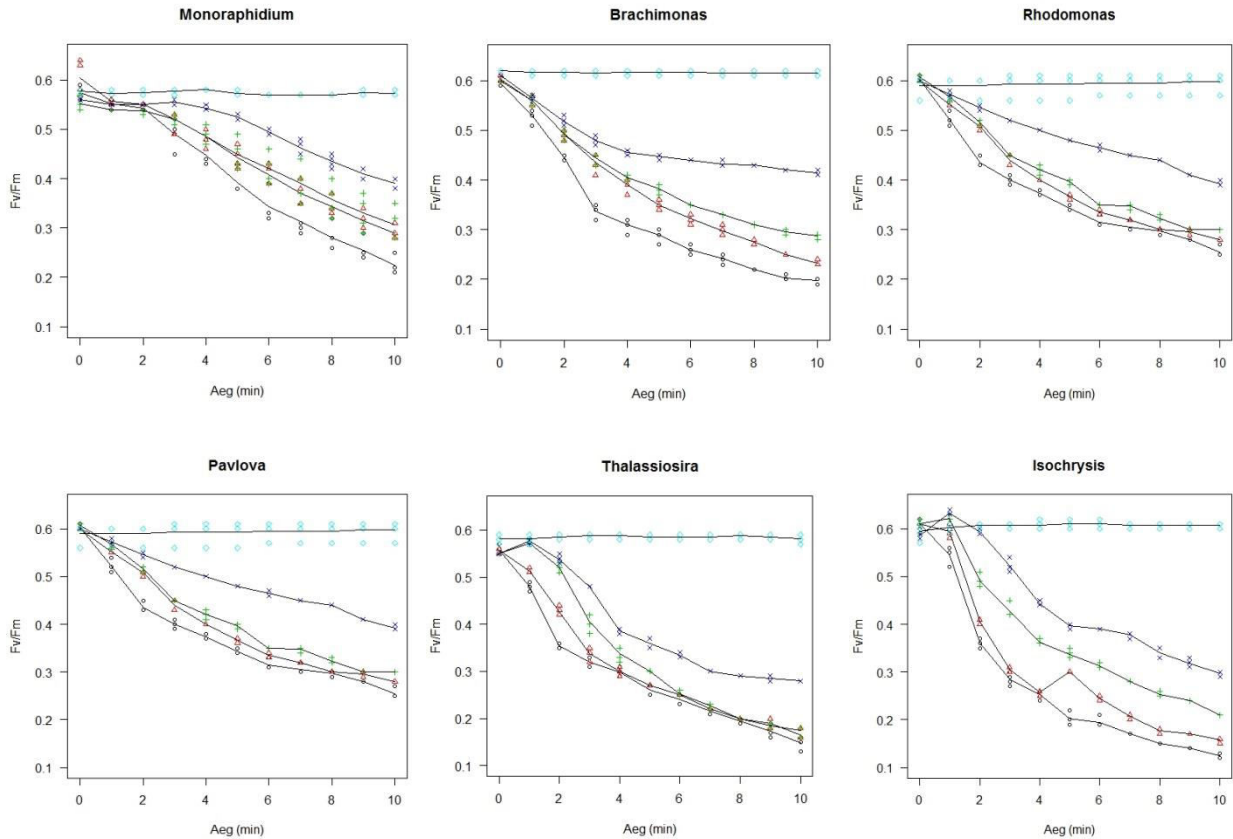
5. Tulemused

Katse tulemused demonstreerivad vesinikperoksiidi (H_2O_2) negatiivset mõju fütoplanktoni fotosünteesi efektiivsusele (F_v/F_m ; joonis 2). Akuutsetes katsetes, kus kasutati monokultuure, ilmnes vesinikperoksiidi negatiivne mõju kiirelt - F_v/F_m langes juba peale esimest mõõtmist (1 minut). Pikaajalistes katsetes omas vesinikperoksiid samuti negatiivset efekti, kuid võrreldes monokultuuridega oli polükultuurides stressijärgne taastumine kiirem (joonised 1-3). See näitab, et funktsionaalne mitmekesisus pärsib vähemalt osaliselt oksüdatiivse stressori mõju fotosünteesi efektiivsusele.

5.1 Stressori akuutne mõju monokultuuridele

Oksüdatiivse stressori kontsentratsiooni tõstmisel langes katseorganismide fotosünteesi efektiivsus (joonis 2). Stressori mõju erinevatel kontsentratsioonidel oli liigiti sarnane. Kuigi tulemused osaliselt kattusid, siis liikide fotosünteesi efektiivsuse langused samadel kontsentratsioonidel varieerusid, mis võimaldab need reastada vastavalt nende tundlikusele - liigispetsiifiline stressori mõju (joonis 2).

Tundlikuse hindamiseks on uuritud vetikaliikide maksimaalset F_v/F_m langust, kus esialgsest F_v/F_m väärtusest (enne vesinikperoksiidi lisamist) lahutatakse maha maksimaalse languspunkti väärtus (joonis 2). Kõige tundlikum kultuur oli selle muutuja alusel *Rhodomonas salina*, mille maksimaalne F_v/F_m langus oli sarnane kõikide vesinikperoksiidide kontsentratsioonide juures. Madala toksiini kontsentratsioonidega (<0,5) katsetes oli kõige väiksema tundlikusega rohevetikad *Monoraphidium* ja *Brachionas*, mille F_v/F_m langus oli madalate vesinikperoksiidi kontsentratsioonide juures väiksem (joonis 2).



Joonis 2. Monokultuuride akuutne reaktsioon oksüdatiivse stressori erinevatele kontsentratsioonidele: vesinikperoksiidi 5%, 3,3%, 2,5%, 1,25% ja 0 % (vesinikperoksiidida kontroll) (vesinikperoksiidida kontroll). Reaktiivse hapnikuühendi kontsentratsiooni ja koguse suurenemise korral kasvab oksüdatiivne stress, millega suureneb negatiivse mõju ulatus ja kiirus (aeg; x - telg) fotosünteesi efektiivsusele (y – telg; Fv/Fm).

5.2 Stressori pikaajaline mõju monokultuuridele

Oksüdatiivse stressori pikaajaline mõju oli liigispetsiifiline. Kõige paremini talusid stressi rohevetikad, mille esimes päeva Fv/Fm suhte langus oli madal ning taastumiskiirus ja taastumise täielikkuse näitajad kõrged.

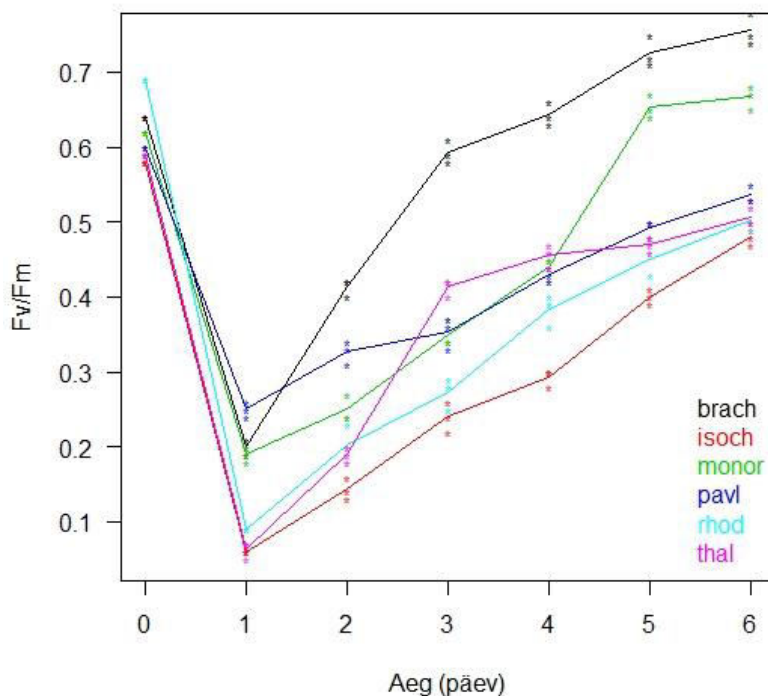
Pikaajalistes katsetes selgus, et katseorganismide esialgne reaktsioon oksüdatiivsele stressorile sarnanes akuutsete katsete andmetega (joonis 2), kus toimus kohene järsk Fv/Fm langus (joonis 3). Tugev negatiivne esialgne mõju esines kolmel fütoplanktoni liigil: *Rhodomonas salina*, *Thalassiosira nana* ja *Isochrysis galbana*, mille esimese päeva Fv/Fm langes vastavalt

0.6, 0.54 ja 0.52 ühikut. Rohevetikad *Brachionas submarina* ja *Monoraphidium contortum* omasid esimese päeva languses sarnaseid väärtusi. Kõige vähem langes esimesel päeval Fv/Fm haptofüüdil *Pavlova lutheri* (joonis 3).

Rohevetikad olid ainukesed kultuurid, mis suutsid täielikult taastuda ja isegi tõsta enda Fv/Fm taset esialgsest. Kõige kehvemini taastus stressist krüptomonaat *Rhodomonas*, mille esialgne reaktsioon stressorile oli ka kõige negatiivsem. Haptofüüdid *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri* ja ränivetikas *Thalassiosira nana* ei saavutanud enda esialgset Fv/Fm taset uuritud ajavahemikus. Samas omasid need kultuurid sarnaseid väärtusi täielikus taastumises (joonis 3).

Stressijärgne taastumine oli kiireim rohevetikatel. Huvitavaks oli asjaolu, et *Monoraphidiumi* stressijärgne taastumine kuni viienda päevani oli aeglane, peale mida aga toimus hüppeline Fv/Fm suhte tõus. Teiste kultuuride taastumine oli sarnane, omades väikeseid varieeruvusi- aeglaseim taastumine *Rhodomonas salina*'l, mille tundlikkus stressorile oli suurim ka lühiaajalistes katsetes. Katsest oli ka näha, et esimese päeva väike Fv/Fm langus ei taga kultuuri kiiret taastumist (*Pavlova lutheri*; joonis 3).

Monokultuuride pikaajaline stressijärgne taastumine



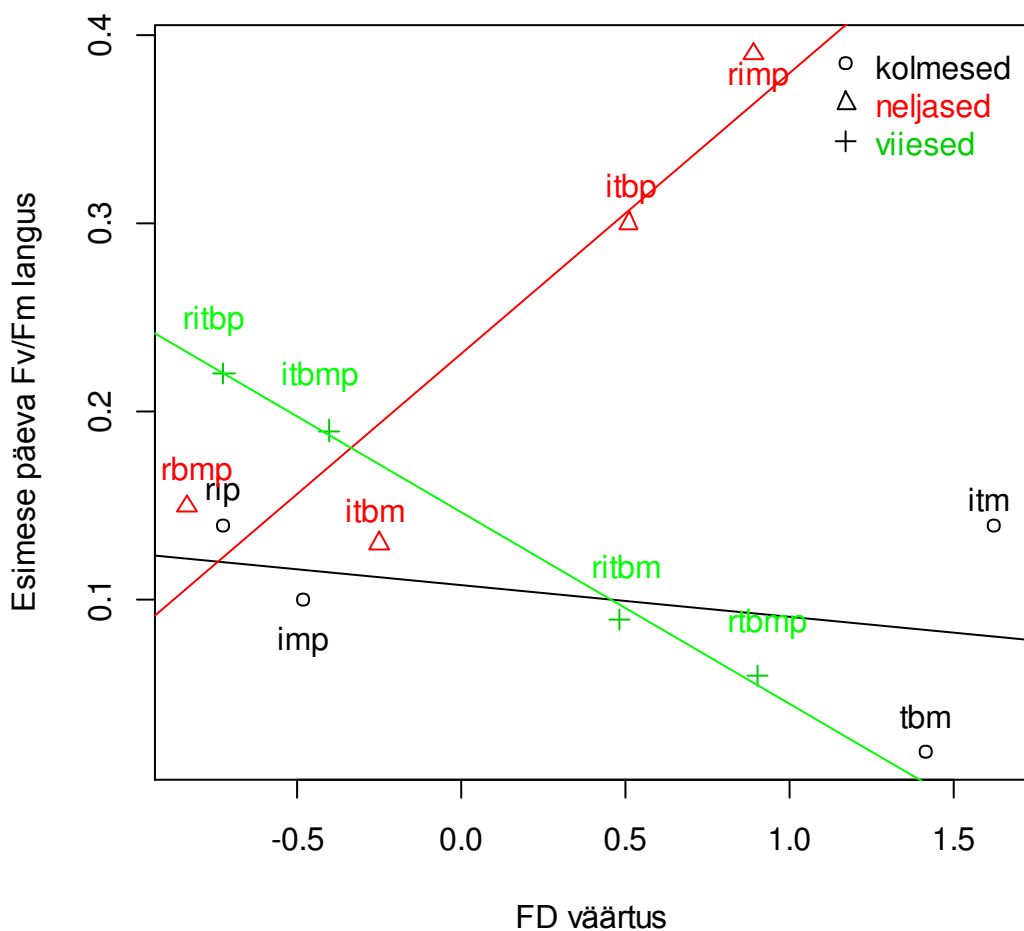
Joonis 3. Monokultuuride pikaajalise stressijärgne taastumine oksüdatiivsest stressorist (rohevetikad *Brachionas submarina* ja *Monoraphidium contortum*, krütomonaad *Rhodomonas salina*, ränivetikas *Thalassiosira nana* ja haptofüüdid *Isochrysis galbana* ja *Pavlova lutheri*).

5.3 Stressori pikaajaline mõju polükultuuridele

Katsete andmeid analüüsides selgus, et kõrgem funktsionaalne mitmekesisus teatud koosseisudes, ei taganud täielikku stressijärgset taastumist (joonis 6) ja väiksemat esimese päeva fotosünteesi efektiivsuse langust (joonis 4). Samas stressijärgne taastumine oli kiirem just polükultuurides, kus FD väärtus oli kõrgem (joonis 5).

Esimese päeva Fv/Fm langus vähenes FD väärtuste suurenemisel kolme- ja viieliigilistes kooslustes. Neljaliigilistes koosseisudes oli tulemus vastupidine, kus FD väärtuste suurenemisega kaasnes kõrge Fv/Fm väärtuse langus. Statistiliselt oluline seos esimese päeva Fv/Fm languse ja funktsionaalse mitmekesisuse väärtuse vahel oli nelja- ja viieliigilistes kooslustes (joonis 4; tabel 2).

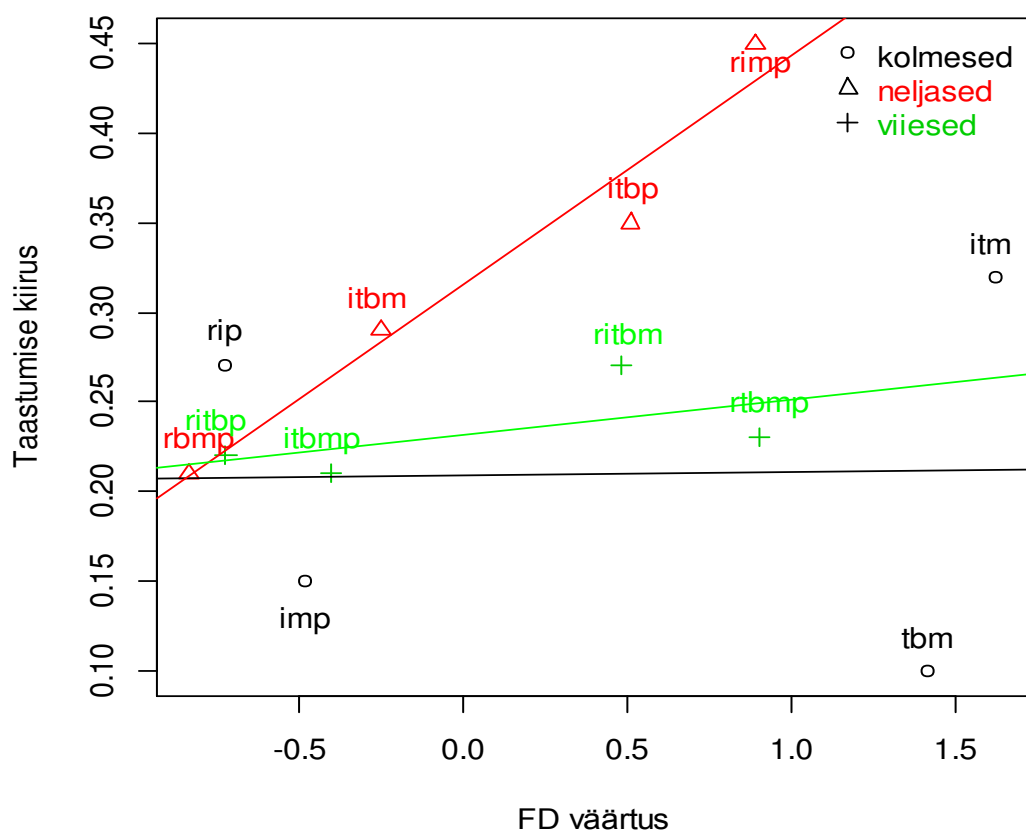
FD ja algse Fv/Fm languse lineaarne regressioon



Joonis 4. Polükultuuride keskmine normaliseeritud FD ja esimese päeva Fv/Fm languse vaheline lineaarne regressioon. Legendil olevad tähised) kajastavad polükultuuride kolme replikaadi keskmisi väärtusi, mille sisesed varieeruvused olid väga väikesed.

Suurem funktsionaalne mitmekesisus tagas parema taastumiskiiruse kõikides polükultuuride koosseisudes, kuid kolme- ja viieliigilistes ei olnud see statistiliselt oluline. Kõige paremini on seda näha neljaliigiliste polükultuuridega teostatud katsetes, kus taastumise kiiruse ja FD väärtuse vahel esines ka statistiliselt oluline seos. Kõige väiksem FD ja taastumise vaheline keskvaartuste sõltuvus üksteisest oli kolmeliigilistes polükultuurides, kus sarnaste FD väärtuste juures oli taastumiskiirus väga erinev (joonis 5; tabel 2).

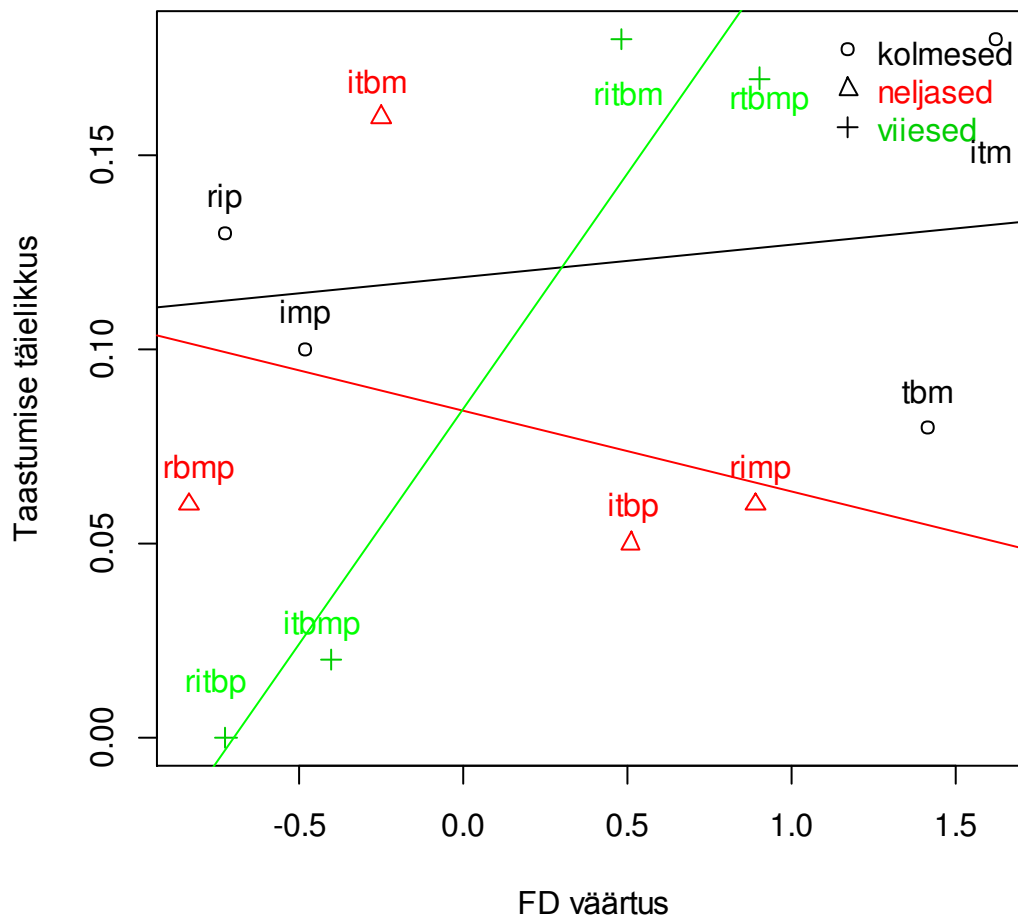
FD ja taastumise kiiruse lineaarne regressioon



Joonis 5. Polükultuuride normaliseeritud FD ja taastumise täielikkuse vaheline lineaarne regressioon.

Kolme- ja viieliigiliste polükultuuride taastumise täielikkuse ja FD väärtuse vahel esines positiivne seos, kus FD suurenemisega tõusis ka taastumise täielikkus. Statistiliselt oluline seos FD väärtuse ja taastumise vahel esines katsetes, kus oli kasutatud viieliigilisi polükultuure. Neljaliigilistes koosseisudes oli taastumise täielikkus parem just madalama FD-ga polükultuuridel (joonis 6; tabel 2).

FD ja taastumise täielikkuse lineaarne regressioon



Joonis 6. Polükultuuride normaliseeritud FD ja taastumiskiiruse vaheline lineaarne regressioon.

Tabel 2. Polükultuuride normaliseeritud FD ja esimese päeva Fv/Fm languse, taastumiskiiruse ja taastumise täielikuse vaheline lineaarne regressioon.

FD ja esimese päeva Fv/Fm suhte languse vaheline lineaarne regressioon.		
Kolmesed	Neljased	Viiesed
$y = -0,007x + 0,09$	$y = 0,15x + 0,23$	
$R^2 = 0,018$	$R^2 = 0,86$	$R^2 = 0,99$
$p = 0,87$	$p = 0,044$	$p = 0,003$
FD ja taastumiskiiruse vaheline lineaarne regressioon		
Kolmesed	Neljased	Viiesed
$y = 0,002x + 0,21$	$y = 0,13x + 0,31$	$y = 0,02x + 0,23$
$R^2 = 0,0005$	$R^2 = 0,95$	$R^2 = 0,32$
$p = 0,98$	$p = 0,0233$	$p = 0,43$
FD ja taastumise täielikkuse vaheline lineaarne regressioon.		
Kolmesed	Neljased	Viiesed
$y = 0,001x + 0,12$	$y = -0,021x + 0,01$	$y = 0,12x + 0,09$
$R^2 = 0,06$	$R^2 = 0,01$	$R^2 = 0,92$
$p = 0,3$	$p = 0,69$	$p = 0,04$

6. Arutelu

Käesolevas töö eesmärgiks oli uurida oksüdatiivse stressori mõjusid fotosünteesi efektiivsusele akuutselt, pikaajaliselt ja kuidas see sõltub fütoplanktoni tehislake koosluste funktsionaalsest mitmekesisusest. Monokultuuridega teostatud akuutsetes ja pikaajalistes katsetes oli näha, et vesinikperoksiidi negatiivne mõju on kiire, sõltub kontsentratsioonist ning on liigispetsiifiline. Näiteks olid rohevetikate võimelised kiiremini ja täielikult taastuma. Töös uuritud peamine hüpotees, et kõrgem funktsionaalne mitmekesisus tagab tugevama vasupanu oksüdatiivse stressori mõjule, andis vastuolulisi tulemusi. Regressioonianalüüsi andmeid võrreldes selgus, et funktsionaalse mitmekesisuse roll esimese päeva fotosünteesi efektiivsuse langusele ja taastumise täielikkusel oli polükultuuride koosseisudes varieeruv. Funktsionaalse mitmekesisuse positiivne mõju avaldus kõikide koosseisude taastumiskiiruses, mis oli parem kõrgemate FD väärtuste juures. Samuti oli kõikide polükultuuride esimese päeva fotosünteesi efektiivsuse langus võrreldes monokultuuridega väiksem.

Oksüdatiivset stressi põhjustavad reaktiivsed hapnikuühendid, mida leidub kõikides looduslikes veekogudes (Xenopoulos & Bird, 1997; Yoshikawa & Naito, 2002; Wong *et al.*, 2002). Madalatel kontsentratsioonidel ei pruugi nende mõju olla tajutav, kuid tõustes võib see põhjustada klorofüllide pleekimist, mutatsioone ja kahjustada makromolekule (DNA, RNA, lipiidid, proteiinid) ning rakumembraane, mis omakorda mõjutavad fotosünteesivõimet (Lesser, 2012; Wong *et al.*, 2002; Xenopoulos & Bird, 1997). Kuna ultraviolettkiirgus põhjustab lahustunud orgaanilise aine kiiremat lagundamist, läbi mille vabanevad looduslikesse veekogudesse ka reaktiivsed hapnikuühendid nagu seda on vesinikperoksiid, siis oksüdatiivse stress võib tulevikus kujutada reaalselt ohtu veekogude ökosüsteemile ja fütoplanktonile (Xenopoulos & Bird, 1997).

Varasemalt on oksüdatiivse stressori mõjusid uuritud pikaajalisemalt, kus mõõtmised toimuvad 24 või rohkema tunni tagant (Drabkova *et al.*, 2007). Akuutse mõju uurimiseks kasutatavaid võrdlusandmeid on vähe, sest valdavalt uuritakse katseorganismide võimet oksüdatiivset stressorit (vesinikperoksiidi) lagundada (Xenopoulos & Bird, 1997). Lühiajaliste katsete eeliseks on asjaolu, et vesinikperoksiidi lagundamine on väga väike, mis võimaldab uurida oksüdatiivse stressori mõjusid sõltuvalt selle kontsentratsioonist. Akuutsed katsed lasevad kiirelt ka uurida, kas vesinikperoksiidi negatiivne mõju varieerub katseorganismide vahel, mis võimaldab reastada kultuure nende tundlikuse alusel. Negatiivseks asjaoluks

akuutsetes katsetes on looduslike keskkonnatingimustega (valgus) mitte arvestamine, mistõttu ei ole saadud andmed lõplike järelduste tegemiseks piisavad. Nimelt põhjustab suurem ja pikem ekspositsioon valgusele kiiremat vesinikperoksiidi lagundamist, läbi mille vabanevad ohtlikud radikaalid, mis suurendavad oksüdatiivset stressi (Drabkova *et al.*, 2007). See võis olla ka põhjuseks, miks fotosünteesi efektiivsuse esimese päeva langus oli suurem just pikaajalistes katsetes, kus vesinikperoksiidi kontsentratsioon võrreldes akuutse katsega oli mitu korda madalam.

Vesinikperoksiidi liigispetsiifiline mõju oli oodatav, sest kõikides katsetes esines liike, kes olid vesinikperoksiidi mõju suhtes vastupidavamad (rohevetikad) ja liike, kes olid vähem vastupidavamad (Drabkova *et al.*, 2007; Xenopoulos & Bird, 1997; Lesser, 2012; joonis 2). Varieeruv tundlikkus on tõenäoliselt tingitud liikide erinevatest vesinikperoksiidi lagundamiskiirusest. Varasemad uuringud (Drabkova *et al.*, 2007) on näidanud, et rohevetikate tundlikkus oksüdatiivse stressile võrreldes räni- ja sinivetikatega on madalam. Liigispetsiifilisi teadmisi on kasutatud ka veepuhastusjaamades teostatud katsetes, kus vesinikperoksiidi kasutati sinivetikate vohamise likvideerimiseks. Juba väike doos vesinikperoksiidi oli sinivetikatele letaalne, kuid tekitas teistele kultuuridele oksüdatiivset stressi, millest need olid võimelised taastuma (Barrington and Shadouan, 2008). Kultuuride tundlikust mõjutab ka nende rakumembraani ehitus (vesinikperoksiid on rakumembraanides väga liikuv), ensüümid ja pigmendiline kosseis. Ensüümid reguleerivad taastumiskiirust, sest asendavad kahjustatud geneetilist materjali (Xenopoulos & Bird, 1997). Pigmendilisest kosseisust sõltub millistel lainepikkustel ja intensiivsustel on plankterid võimelised valgust püüdma. Arvestades, et valgustingimused on isegi homogeenes keskkonnas – nagu näiteks meri – ikkagi võrdlemisi vahelduvad, siis kehvades valgustingimustes on teatud liikide fotosünteesi efektiivsus suurem (Stockenreiter *et al.*, 2013). See tähendab, et vähese valgusega keskkonnas, kus vesinikperoksiidide lagundamine on aeglane (Drabkova *et al.*, 2007) on teatud fütoplanktonid siiski võimelised fotosünteesima.

Kõige paremini talusid oksüdatiivset stressi just rohevetikad. Nimelt suutsid rohevetikad *Brachionas submarina* ja *Monoraphidium contortum* uuritavas ajavahemikus enda fotosünteesi efektiivsust võrreldes algusega isegi parandada. Parem fotosünteesi efektiivsus võrreldes algusega võis olla tingitud asjaolust, et esialgses koosluses võis olla kehv füsioloogia ja madala kvantsaagisega rakke, mis peale vesinikperoksiidi doseerimist hukkusid.

Nende klorofüll ei andnud katseeria lõpus PAM`ile signaali, mistõttu populatsiooni summaarne kvantsaagis tõusis kõrgemale katse eelsega võrreldes. Samuti oli nende taastumiskiirus võrreldes teiste katseorganismidega kiirem. Analoogne stressijärgne pikaajaline taastumine rohevetikatel võis olla tingitud nende sarnastest tunnustest. Nimelt võisid nende sarnased rakustruktuurid ja pigmendiline koosseis tagada ka sarnase vesinikperoksiidi lagundamise ja stressitaluvuse (Choo *et al.*, 2004).

Polükultuuridega katsetes kasutati kunstlikult koostatud kooslusi, toomaks välja oksüdatiivse stressi mõju sõltuvust funktsionaalsest mitmekesisusest. Funktsionaalne mitmekesisus on heaks parameetrik, sest võimaldab uurida ökosüsteemide erinevate protsesside, pakutavate teenuste ja keskkonnamuutuste (oksüdatiivse stress) vastumehhanisme (Gray, 1997, Laliberte & Legendre, 2010). See informatsioon võimaldab luua põhjuslikke seoseid ökosüsteemi funktsioneerimise ja liikide tunnuste vahel. Erinevate seoste ja funktsioonide põhiselt saab uurida keskkonna ja liikide omavahelisi interaktsioone, millest võib teha järeldusi, miks teatud liigiline koosseis on tekkinud (Devictor *et al.*, 2010; Petchey & Gaston, 2002).

Praeguseni ei ole uuritud vesinikperoksiidi mõju sõltuvust fütoplanktoni funktsionaalsest mitmekesisusest, mistõttu puuduvad võrdlusandmed. Eeldus oli, et suurema FD väärtustega polükultuuride koosseisudes on oksüdatiivse stressori mõju väiksem, mida vastuoluliste tulemuste tõttu ei saanud väita. Kõige vastuoluliseimaid tulemusi andsid neljaliigilised polükultuurid, kus funktsionaalse mitmekesisuse suurenedes kasvas esimese päeva Fv/Fm langus, suurenes taastumiskiirus ja langes taastumise täielikkus. Põhjuseks võib olla ka limiteeritud või lühike mõõteperiood. Nimelt olid antud koosseisus kõige kiiremini taastuvad just kõrgema FD-ga polükultuurid, mis pikema ajavahemiku jooksul oleks ka ilmselt saavutanud parema taastumise täielikkuse – madala funktsionaalse mitmekesisusega kultuurid saavutasid enda lävendi juba seitsme mõõtmispäeva jooksul. Samuti oleks tulevikus mõistlik kasutada suuremat kulture koosluste valikut. Praegune katse ülesehitus piirdus töömahukuse tõttu vaid nelja kunstliku kooslusega.

Positiivseks oli aga FD mõju taastumiskiiruses, kus kõikide koosseisude taasumise kiirus kasvas suurema funktsionaalse mitmekesisusega. Kahjuks pole sellelaadseid uuringuid varem tehtud, mistõttu saab ainult järeldada, et suurem funktsionaalne mitmekesisus soodustab stressijärgset kiiret taastumist. Vastuoluliste tulemuste põhiselt võib ka järeldada, et

oksüdatiivse stressori sõltuvus liigispetsiifilistest omadustest endast on suurem, kui koosluse funktsionaalsest mitmekesisusest. Stressijärgne taastumine võis sõltuda ka liigirikkusest – erinevalt monokultuuridest, suutsid kõik polükultuurid täielikult taastuda ning nende esialgne Fv/Fm langus oli madalam. Vastuoluliste tulemuste üheks põhjuseks võib olla ka asjaolu, et mõõdetud funktsionaalsetel tunnustel ei ole seost vastupanuvõimega oksüdatiivsele stressile.

Kokkuvõte

Töö peamine hüpotees oli, et oksüdatiivse stressori negatiivne mõju fotosünteesi efektiivsusele sõltub funktsionaalsest mitmekesisusest. Katsetest saadud andmed olid ebaveenvad, mistõttu ei saa sellist üldistust toetada. Funktsionaalse mitmekesisuse ainuke kindel positiivne mõju esines polükultuuride taastumiskiiruses, kus funktsionaalse mitmekesisuse suurenemisega see kasvas. Samuti olid polükultuurid, võrreldes monokultuuridega, siiski vastupidavamad vesinikperoksiidi negatiivsele toimele.

Akuutsetes katsetes oli näha vesinikperoksiidi kiiret negatiivset mõju fotosünteesi efektiivsusele, mis kontsentratsioonide suurendamisega ka kasvas. Üldiselt olid varieeruvused erinevate dooside juures väikesed, kuid võimaldasid siiski uurida liigispetsiifilisi reaktsioone stressorile.

Pikaajalistes katsetes leidis kinnitust väide, et oksüdatiivse stressori mõju fütoplanktonile on liigispetsiifiline. Taastumiskiirus ja taastumise täielikkus oli parem rohevetikatel, mis stressijärgse taastumise lõpus suutsid endi esialgset fotosünteesi efektiivsust isegi tõsta.

Tulemuste adekvaatseks tõlgendamiseks oleks tulevikus vaja teostada katseid, mis mõõdavad erinevate kultuuride vesinikperoksiidi lagundamiskiirust ning ka funktsionaalseid tunnuseid, mis seda enim mõjutavad. Need teadmised võimaldaks matemaatiliste mudelite abil prognoosida, millised liigilised koosseisud võivad oksüdatiivse stressori kontsentratsiooni tõusmisel tekkida ning luua põhjuslikke seoseid ökosüsteemi funktsioneerimise ja liikide tunnuste vahel.

The Role of Functional Diversity on the Resistance of Phytoplankton to Oxidative Stress

Summary

The main hypothesis is that the negative effect of oxidative stressor on effectiveness of the photosynthesis depends on the functional diversity. However, the data gathered from the tests were vague and therefore it cannot be argued with certainty. The only certain positive effect occurred in terms recovery rate of the polycultures: the rate grew higher as the functional diversity increased. Polycultures in overall were more resilient to oxidative stress than monocultures.

The negative effect of peroxide on the effectiveness of photosynthesis was noticeable in the acute tests: it grew with the increase of concentrations. In general, the variability between different dose amounts was small. The data made it possible to analyse the species-specific reactions on the stressor.

The long-term tests confirmed that the oxidative stressors impact on the phytoplankton is species-specific. The rate and totality of recovery was higher in case of green algae, which could even increase the original effectiveness of photosynthesis after post-stress recovery.

To interpret the results more adequately in the future, it would require to carry out the tests measuring the rate of decomposition of different cultures and also functional characteristics that effect it the most. These data would help predict which composition of species might evolve with the increase of oxidative stressor concentration and create causal relations between the function of the ecosystem and the characteristics of species.

Tänuõnad

Soovin tänada enda juhendajat Kalle Ollit tema hea ja oskusliku juhendamise eest.

Kasutatud kirjandus

Barrington, D., Shoudan, A. 2008. Application of Hydrogen Peroxide for the Removal of Toxic Cyanobacteria and Other Phytoplankton from Wastewater. – *Environmental Science Technology*, 42: 8916–8921.

Cadotte, M., Carscadden, K., Mirotchnick, N. 2011. Beyond species: functional diversity and the maintenance of ecological processes and services. - *Journal of Applied Ecology*, 48: 1079–108.

Choo, K.S., Snoeijs, P., Pedersen, P. 2004. Oxidative stress tolerance in the filamentous green algae *Claudophora glomerata* and *Enteromorpha ahlnneriana*. – *Journal of experimental Marine Biology and Ecology*, 298: 111-123.

Chiarucci, A., Bacaro, G. & Scheiner, S.L. 2011. Old and new challenges in using species diversity for assessing biodiversity. - *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 366: 2426-37.

Devictor, V. & Mouillot, D. et al. 2010. Spatial mismatch and congruence between taxonomic, phylogenetic and functional diversity: the need for integrative conservation strategies in a changing world. - *Ecology Letters*, 13: 1030-40.

Diaz, S., Cabido, M. 2001. Vive la difference: plant functional diversity matters to ecosystem processes. - *TRENDS in Ecology & Evolution*, 16:11.

Drábková, M., Maršálek, B., Admiraal, W. 2007. Photodynamic therapy against cyanobacteria. – *Environmental Toxicology*, 22: 112-115.

Fabry, V., Seibel, B., Feely, R., Orr, J. 2008. Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. – *ICES Journal of Marine Science*, 65: 414–432.

Galotelli, N., Colwell, A. 2013. Measuring and Estimating Species Richness, Species Diversity, and Biotic Similarity from Sampling Data. In: Levin S.A. (ed.) *Encyclopedia of Biodiversity*, 5: 195-211.

Gough, D., Cotter, T. 2011. Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule. - *Cell Death and Disease* 2.

- Giovanni, S., Sting, U., 2005. Molecular diversity and ecology of microbial plankton. – Nature, vol. 437.
- Gray, S., 1997. Marine biodiversity: patterns, threats and conservation needs. - Biodiversity and Conservation, 6: 153-175
- Harvey B, Gwynn-Jones D, Moore P (2013) Meta-analysis reveals complex marine biological responses to the interactive effects of ocean acidification and warming. - Ecology and Evolution, 3: 1016–1030.
- Kruk, C., Vera, L., Huszar, V., Peeters, Bonilla, S., Costa, L., Lüring, M., Reynolds, C., Scheffer, M. 2010. A morphological classification capturing functional variation in phytoplankton. - Freshwater Biology, 55: 614-627.
- Laliberte E, Legendre P, 2010. A distance-based framework for measuring functional diversity from multiple traits. Ecology, 91: 299–305.
- Lesser, P., 2012. Oxidative Stress in Tropical Marine Ecosystems. - Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems, First Edition.
- Lee, R., 2008. Phycology Fourth edition. - Colorado State University, USA.
- Litchman, E., Klausmeier, C., Schofield, O., Falkowski, P. 2007. The role of functional traits and trade-offs in structuring phytoplankton communities: scaling from cellular to ecosystem level. - Ecology Letters, 10: 1170–1181.
- Loreau, M., Naeem, S., Inchausti, P., Bengtsson, J., Grime, J. P., Hector, A., Hooper, D. U., Huston, M. A., Raffaelli, D., Schmid, B., Tilman, D., Wardle, D. A. 2001. Biodiversity and Ecosystem Functioning: Current Knowledge and Future Challenges. - *Science*, 294, 804.
- Mason, N. W. H., Mouillot, D., Lee, W. G. and Wilson, J. B. 2005. Functional richness, functional evenness and functional divergence: the primary components of functional diversity. – Oikos, 111:112-118.
- Masisi, L., Nelwamondo, V., Marwala, T. 2008. The use of entropy to measure structural diversity. - Computational Cybernetics, 3: 41-45.
- Mouchet, A., Vileger, S., Mason, N., Mouillot, D. 2010. Functional diversity measures: an overview of their redundancy and their ability to discriminate community assembly rules. - Functional Ecology, 24: 867–87.

- Mousing, A. Ellegaard, M., Richardson, K. 2014. Global patterns in phytoplankton community size structure—evidence for a direct temperature effect. - *Marine ecology progress series*, 497: 25–38
- Petchey, O. & Gaston, K. 2002. Functional diversity (FD), species richness and community composition. - *Ecology Letters* 5: 402–411.
- Petchey, O.L. & Gaston, K.J. 2006. Functional diversity: back to basics and looking forward. - *Ecology Letters*, 9: 741-58.
- Reynolds, C. 2006. *Ecology of Phytoplankton*. - Cambridge University Press, USA
- Schleuter, D., Daufrense, M. & Massol, F. 2010. A user's guide to functional diversity indices. - *Ecological Monographs*, 80: 469–484.
- Stockenreiter, M., Haupt, F., Graber, A., Maximilians, L., Seppäälä, J., Spilling, K., Tamminen, T., Stibor, H. 2013. Functional group richness: implications of biodiversity for light use and lipid yield in microalgae. - *Phycol.*, 49: 838–847.
- Tillmann, U. Reich, P., Knops, J., Wedin, D., Mielke, T., Lehman, C. 2001. Diversity and Productivity in a Long-Term Grassland Experiment. – *Science*, 294: 843.
- Verbeek, w. C. E. P., Noordwijk, C. G. E., Hildrew, A. G., 2013. Delivering on a promise: integrating species traits to transform descriptive community ecology into a predictive science. - *Freshwater Science*, 32:531-547.
- Villegger, S., Mason, N., Mouillot, D. 2008. New multidimensional functional diversity indices for a multifaceted framework in functional ecology. – *Ecology*, 89:2290-301.
- Violle, C., Jiang, L., 2009. Towards a trait-based quantification of species niche. - *Journal of Plant Ecology*, 2: 87–93.
- Weithoff, G. 2003. The concepts of 'plant functional types' and 'functional diversity' in lake phytoplankton – a new understanding of phytoplankton ecology? – *Freshwater biology*, 48: 1669-1675.
- Wong, G., Dunstan, W., Kim, D. 2003. The decomposition of hydrogen peroxide by marine phytoplankton. - *Oceanologica Acta*, 26: 191–198.

Xenopoulos, M., Bird, D. 1997. Effect of Acute Exposure to Hydrogen Peroxide on the Production of Phytoplankton and Bacterioplankton in a Mesohumic Lake. - Photochemistry and Photobiology, 66(4): 471-478.

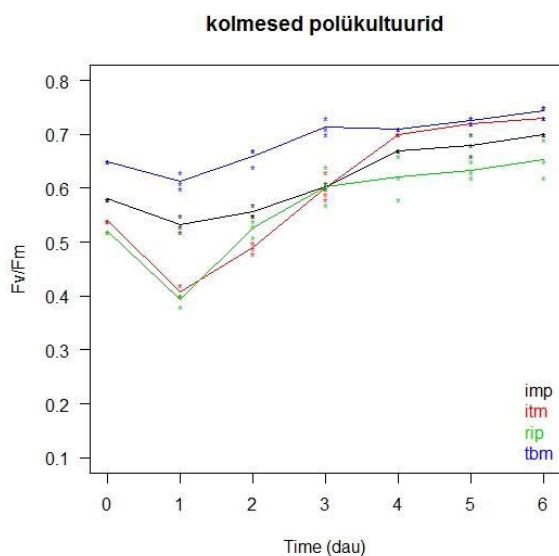
Yoshikawa, T., Naito, Y. 2002. What is oxidative stress? – JMAJ, 45: 271–276.

Internetiallikad

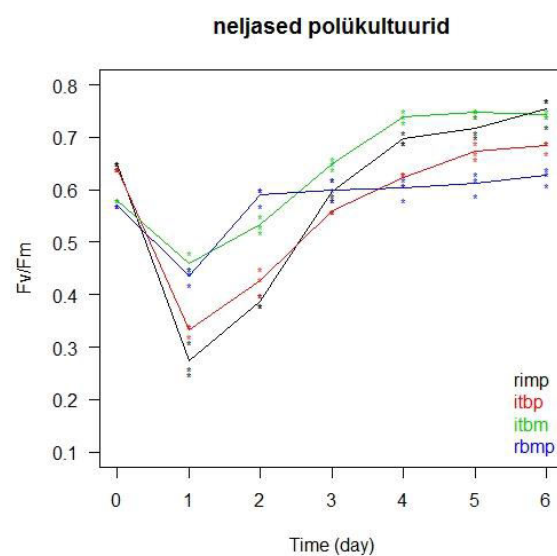
<http://weis.science.oregonstate.edu/files/weis/Protocols/Symbiodinium/Algal%20cultures.pdf>

<http://www.R-project.org>. ISBN: <http://www.R-project.org>

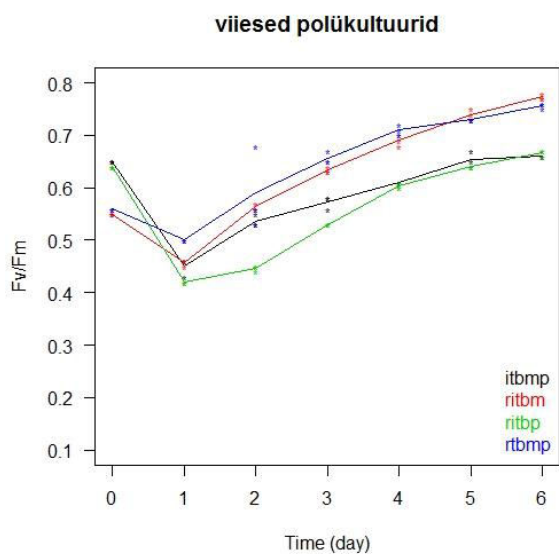
Lisad



Joonis 1. Oksüdatiivse stressori pikaajaline mõju kolmeliigilistele polükultuuridele



Joonis 2. Oksüdatiivse stressori pikaajaline mõju neljaliigilistele polükultuuridele



Joonis 3. Oksüdatiivse stressori pikaajaline mõju viieliigilistele polükultuuridele

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Mihkel Ristimäe
(sünnikuupäev: 27.05.1989)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose Funktsionaalse mitmekesisuse roll fütoplanktoni koosluse vastupanul oksüdatiivsele stressile, mille juhendaja on Kalle Olli,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus _____